



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Strukturbestimmung sowie Untersuchung der
enzymkatalysierten Hydrolyse von Naturstoffen mit
Glycosidstruktur aus der Pflanzengattung *Psychotria* L.

Verfasser

Hannes Klaus Faßhuber

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, Januar 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt: Chemie

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Ass. Privatdoz. Dipl.-Chem. Dr. Lothar Brecker

*Wenn man die Grenzen einmal überschritten hat,
gibt es keine Beschränkungen mehr*

Alphonse Allais (1854-1905)¹

Dank

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, dass Sie immer an mich geglaubt hat, egal welchen Weg ich auch eingeschlagen habe. Im Besonderen möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mir während des Studiums stets einen familiären und finanziellen Rückhalt gegeben haben.

Meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. Lothar Brecker danke ich für seinen freundschaftlichen und hilfsbereiten Umgang während der gesamten Diplomarbeit. Weiters möchte ich mich bei Ihm bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, viele verschiedene chemische Fragestellungen mit unterschiedlichen Methoden zu untersuchen. Dies ist sicherlich nicht als eine Selbstverständlichkeit anzusehen. Auf seine fachlichen Kompetenzen, die er mir im Rahmen dieser Arbeit jederzeit zur Verfügung stellte, kann man sich immer verlassen.

Großer Dank geht auch an Prof. Dr. Peter Wolschann für seine Bereitstellung der Dockingsimulationsprogramme sowie seiner Hilfestellung bei der Interpretation der Simulationsergebnisse.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Zentrums für Biodiversität, Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung, Arbeitsgruppe Phytochemie an der Universität Wien für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials sowie für die nette Betreuung während meiner Diplomarbeit.

Für die Bereitstellung des Enzyms CelB und für die netten kollegialen Hilfestellungen möchte ich mich beim Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik der Technischen Universität Graz bedanken. Besonderer Dank gilt hier Dr. Regina Kratzer, die mir bei der Suche nach dem geeigneten Homologen sehr behilflich war.

Für die netten Gespräche und Diskussionen möchte ich mich bei der gesamten NMR-Arbeitsgruppe bedanken. Besonderer Dank gilt hier Ing. Susanne Felsinger, die mir während der Diplomarbeit in allen möglichen Dingen stets geholfen hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden Elisabeth Bernhart, Christian Rauch, Kurt Zach, Alicia Zach und Oliver Bixner für ihre Hilfe und ihre aufmunternden Worte während des Studiums bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	11
1.1 PFLANZEN	11
1.2 STRUKTURBESTIMMUNG.....	13
1.3 NMR-EXPERIMENTE.....	17
1.4 DOCKINGSIMULATION	17
AUFGABENSTELLUNG DIESER ARBEIT	18
2. ANGEWANDTE METHODEN.....	19
2.1 METHODEN ZUR ISOLATION VON PFLANZENINHALTSSTOFFEN	19
2.1.1 Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen	19
2.1.2 Chromatographie von Pflanzeninhaltsstoffen	20
2.2. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER PFLANZENINHALTSSTOFFE.....	21
2.2.1 HPLC-Methode	21
2.2.2 NMR-Methode.....	21
2.2.3 Massenspektrometrie-Methode	22
2.3 METHODEN ZUR TEILWEISEN REINIGUNG VON ENZYMEN	23
2.5 METHODEN FÜR IN SITU NMR-SPEKTROSKOPIE	25
2.6 METHODEN ZU DOCKING-SIMULATIONEN	27
3. EXPERIMENTELLER TEIL	31
3.1 EXTRAKTION VON NATURSTOFFEN AUS PFLANZEN	31
3.1.1 Psychotria elata	31
3.1.1.1 Isolierung der Substanz S1.....	34
3.1.1.2 Isolation der Substanzen Z1/Z2	35
3.1.1.3 Isolation der Substanzen A1/S2.....	35
3.2 BESTIMMUNG DER CHEMISCHEN STRUKTUREN VON ISOLIERTEN NATURSTOFFEN	39
3.3 EXTRAKTION UND PARTIELLE REINIGUNG VON ENZYMEN.....	41
3.3.1 Extraktion eines Enzymgemisches aus Mandeln.....	41
3.3.2 Enzym CelB	41
3.4 IN SITU NMR MESSUNGEN VON ENZYMEN	42
3.4.1 In situ MNR Messungen mit dem Enzym CelB	42
3.4.2 In situ MNR Messungen mit der Mandelglucosidase.....	43
3.5 STD-MESSUNGEN.....	44
3.5.1 STD-Messungen mit CelB	44
3.6 DOCKINGSIMULATION	45
3.6.1 Dockingsimulation von Strictosidine mit CelB.....	45
4. ERGEBNISSE	46
4.1 ERGEBNISSE DER STRUKTURBESTIMMUNG VON DEN ISOLIERTEN SUBSTANZEN	46
4.1.1 Isolation und Bestimmung der Substanz S1	46
4.1.1.1 Bestimmung der Substanz S1	46
4.1.1.2 Ergebnis der Massenspektrometrie	47

4.1.2 Isolation und Bestimmung eines Gemisches bestehend aus den Substanzen Z1/ Z2.....	49
4.1.2.1 Bestimmung der Substanzen Z1/Z2	49
4.1.2.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie	50
4.1.3 Isolation und Bestimmung der Substanz A1	52
4.1.3.1 Bestimmung der Substanzen A1	52
4.1.4 Isolation und Bestimmung der Substanz S2.....	52
4.1.4.1 Bestimmung der Substanz S2.....	52
4.2 STRUKTURBESTIMMUNG DER SUBSTANZEN AUS DER PFLANZENGATTUNG PSYCHOTRIA. L	53
4.2.1 Strukturbestimmung der Substanz S3	53
4.2.1.1 Bestimmung der Substanz S3:.....	53
4.2.1.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	53
4.2.2 Strukturbestimmung der Substanz S4:	55
4.2.2.1 Bestimmung der Substanz S4.....	55
4.2.2.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	55
4.2.3 Strukturbestimmung der Substanz S5	57
4.2.3.1 Bestimmung der Substanz S5.....	57
4.2.3.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	57
4.2.4 Strukturbestimmung der Substanz S6	59
4.2.4.1 Bestimmung der Substanz S6.....	59
4.2.4.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	59
4.2.5 Strukturbestimmung der Substanz S7	61
4.2.5.1 Bestimmung der Substanz S7.....	61
4.2.5.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	61
4.2.6 Strukturbestimmung der Substanz D1.....	63
4.2.6.1 Bestimmung der Substanz D1	63
4.2.6.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	63
4.2.7 Strukturbestimmung der Substanz D2.....	65
4.2.7.1 Bestimmung der Substanz D2	65
4.2.7.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	65
4.2.8 Strukturbestimmung der Substanz D3.....	67
4.2.8.1 Bestimmung der Substanz D3	67
4.2.8.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	67
4.2.9 Strukturbestimmung der Substanz I1	69
4.2.9.1 Bestimmung der Substanz I1	69
4.2.9.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	69
4.2.10 Strukturbestimmung der Substanz I2	71
4.2.10.1 Bestimmung der Substanz I2	71
4.2.10.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	71
4.2.11 Strukturbestimmung der Substanz I3	73
4.2.11.1 Bestimmung der Substanz I3	73
4.2.11.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	73
4.2.11.1 Bestimmung der Substanz A2	75
4.2.11.2 Ergebnis der Massenspektrometrie.....	75
4.2.12 Darstellung aller interpretierten Substanzen	77
4.3 <i>IN SITU</i> NMR ERGEBNISSE.....	78

4.3.1 <i>In situ</i> NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Cellobiose durch CelB Katalyse	78
4.3.2 <i>In situ</i> NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Strictosidin durch CelB Katalyse	78
4.3.3 <i>In situ</i> NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Cellobiose durch Mandel-glucosidase Katalyse	79
4.3.4 <i>In situ</i> NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Strictosidine durch CelB Katalyse	79
4.4. STD-NMR ERGEBNISSE	83
4.4.1 STD-NMR Untersuchung der beiden anomeren Glucoseformen in Gegenwart von CelB	83
4.4.2 STD-NMR Untersuchung von Cellobiose in Gegenwart von CelB	83
4.4.4 STD-NMR Untersuchung der beiden anomeren Glucoseformen in Gegenwart der Mandel-glucosidase	85
4.4.5 STD-NMR Untersuchung von Cellobiose in Gegenwart der Mandelglucosidase	85
4.4.6 STD-NMR Untersuchung von Strictosidine in Gegenwart der Mandel-glucosidase	85
4.5 DOCKINGERGEBNISSE	87
4.5.1 Dockingsimulation der Lage von Glucose im aktiven Zentrum	87
4.5.2 Dockingsimulation der Lage von Cellobiose im aktiven Zentrum	88
4.5.3 Dockingsimulation der Lage von Strictosidine im aktiven Zentrum	89
5. DISKUSSION	91
6. ZUSAMMENFASSUNG	94
7. ABSTRACT	95
8. LITERATURVERZEICHNIS	96

1. Einleitung

1.1 Pflanzen

Die Heilung von Krankheiten durch Naturprodukte zeigt in der Geschichte der Menschheit eine nicht wegzudenkende Rolle. Wirft man einen Blick in die Vergangenheit, so sieht man, dass das Wissen über die heilenden Pflanzen in allen Hochkulturen der Erde einen hohen Stellenwert einnahm. Das Bestreben der Wissenschaft, einen immer tieferen Einblick in die Vorgänge der Natur zu bekommen, veranlasst immer wieder neue und bessere Analysemethoden zu entwickeln.² Dies hat zur Folge, dass man nicht nur die möglichen Verwendungszwecke einer Pflanze untersuchen kann, sondern auch deren Pflanzeninhaltsstoffe, die eine heilende Wirkung hervorrufen. Mit diesem Gebiet der Forschung beschäftigen sich vor allem naturwissenschaftliche Forschungszeige. So ist für die Biologie nicht nur die Erforschung der Biosynthesewege der Pflanzeninhaltsstoffe von großer Bedeutung, sondern auch deren biologischer Stellenwert in der Natur.³ Die Chemie beschäftigt sich zum Einen mit der Analyse der molekularen Strukturen und zum Anderen damit, diese Moleküle durch geeignete Synthesen herzustellen. Die Zweige der Medizin und der Pharmazie untersuchen die gewonnen Substanzen hinsichtlich ihrer medizinischen Verwendungszwecke. Wie man sieht, trägt das Wissen über Pflanzen und deren Inhaltsstoffe auch in unserer heutigen Gesellschaft einen großen Stellenwert. Alle in dieser Arbeit vorkommenden Pflanzen werden in lateinisch und die vorkommenden Substanzen mit ihren englischen Namen beschrieben.

Eine wichtige Pflanzengattung ist die *Psychotria* L. (Brechsträucher),⁴ die aus mehr als 1500 Arten zusammengestellt wird. Sie ist weltweit pantropisch verbreitet und kommt in Form von kleinen Bäumen, Sträuchern und Lianen vor. Ihre bedeutendsten Vertreter sind die *Psychotria viridis*⁵ und die *P. ipecacuanha*.⁶ Die *P. viridis*, bekannt durch ihren halluzinogenen Pflanzeninhaltsstoff Tryptamin-Alkaloid *N,N*-Dimethyltryptamine (Abb. 1), wird im südamerikanischen Raum mit der Rinde der Liane *Banisteriopsis caapi*⁷ zur Herstellung des Ayahuasca verwendet.⁸ Dieses Ayahuascageetränk wird für rituelle Zeremonien bei den Amazonas-Indianern verwendet, um einen Kontakt mit ihren Göttern herstellen zu können. Die *P. ipecacuanha*, auch als Brechwurzel in Europa bekannt, hat große Bedeutung in der Behandlung der Ruhr im 17. Jahrhundert erfahren.⁹

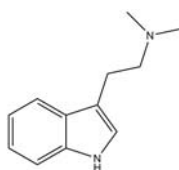


Abbildung 1: Struktur von *N,N*-Dimethyltryptamine.

Aufgrund aktueller genetischer Untersuchungen¹⁰ ist die wie oben besprochene Einteilung der Pflanzengattung *Psychotria* L. nicht mehr haltbar. Diese neuen Ergebnisse aus der Genforschung werden durch phytochemische Untersuchungen überprüft. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten. Hierbei zeigt sich ein Trend, dass die Pflanzengattung *Psychotria* L. voraussichtlich in vier Zweige aufgesplittet werden kann. Ein Zweig umfasst die Terpen-Tryptophan-Alkaloid haltigen Pflanzen, ein weiterer die Terpen-Dopamin-Alkaloid haltigen. Im Fall der Terpen-Tryptophan-Alkaloidbiosynthese spielt die Strictosidine-Synthase eine entscheidende Rolle, da sie das vom Tryptophan abstammende Tryptamin mit dem von Terpen-Biosynthese erzeugte Secologanin unter einer Pictet-Spengler Reaktion verbindet.¹¹ Das hierdurch entstehende Produkt Strictosidine ist Ausgangspunkt für alle in diesen Pflanzen entstehenden Terpen-Indol-Alkaloide.

Eine weitere Abspaltung von der Pflanzengattung *Psychotria* besteht aus Pflanzenarten, die vermutlich eine inaktive Strictosidine-Synthase besitzen.¹² Diese Pflanzen produzieren Iridoid-Glycoside aus dem gebildeten Secologaninmolekül. Vertreter dieser Substanzklasse sind zum Beispiel Asperulosid-derivate.

Beim vierten Zweig handelt es sich um Pflanzen, die polymerartige Strukturen anreichern. Eben genannte werden in dieser Arbeit untersucht, können aber noch nicht hinsichtlich ihrer Struktur bestimmt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen stammen alle aus dem Esquinas Regenwald in Costa Rica (Abb. 2). Aufgrund der Initiative „Verein zur Förderung der Rettung des Esquinas Regenwaldes in Costa Rica“ von Michael Schnitzler konnte ein Stück dieses Regenwaldes gekauft und eine Tropenstation für Wissenschaftler errichtet werden. Dies ermöglicht Materialien aller Art aus diesem Gebiet für wissenschaftliche Zwecke nach Österreich zu importieren.



Abbildung 2: Landkarte des Esquinas Regenwaldes¹³

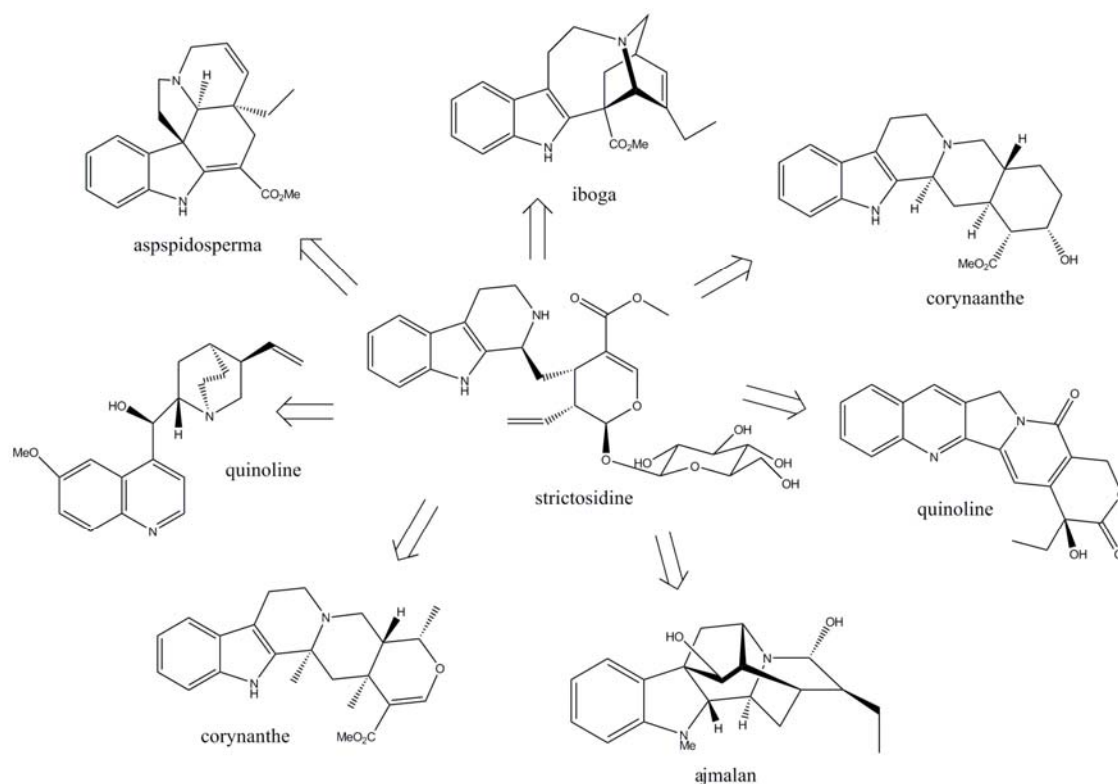
Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Pflanzen untersucht worden: *P. elata*, *P. accuminata*, *P. racemosa*, *P. officinalis*, *P. borucana*, *P. suerrensis*, *P. chagrensis*, *P. hoffmania* und *P. poeppigiana*.

1.2 Strukturbestimmung

Um die Struktur einer isolierten Substanz bestimmen zu können, benötigt man viele verschiedene Analysemethoden. Diese reichen von der Infrarot-, Ultraviolett/Visible-, Massen- und Röntgen- bis hin zur Nuclear Magnetic Resonance-Spektroskopie.

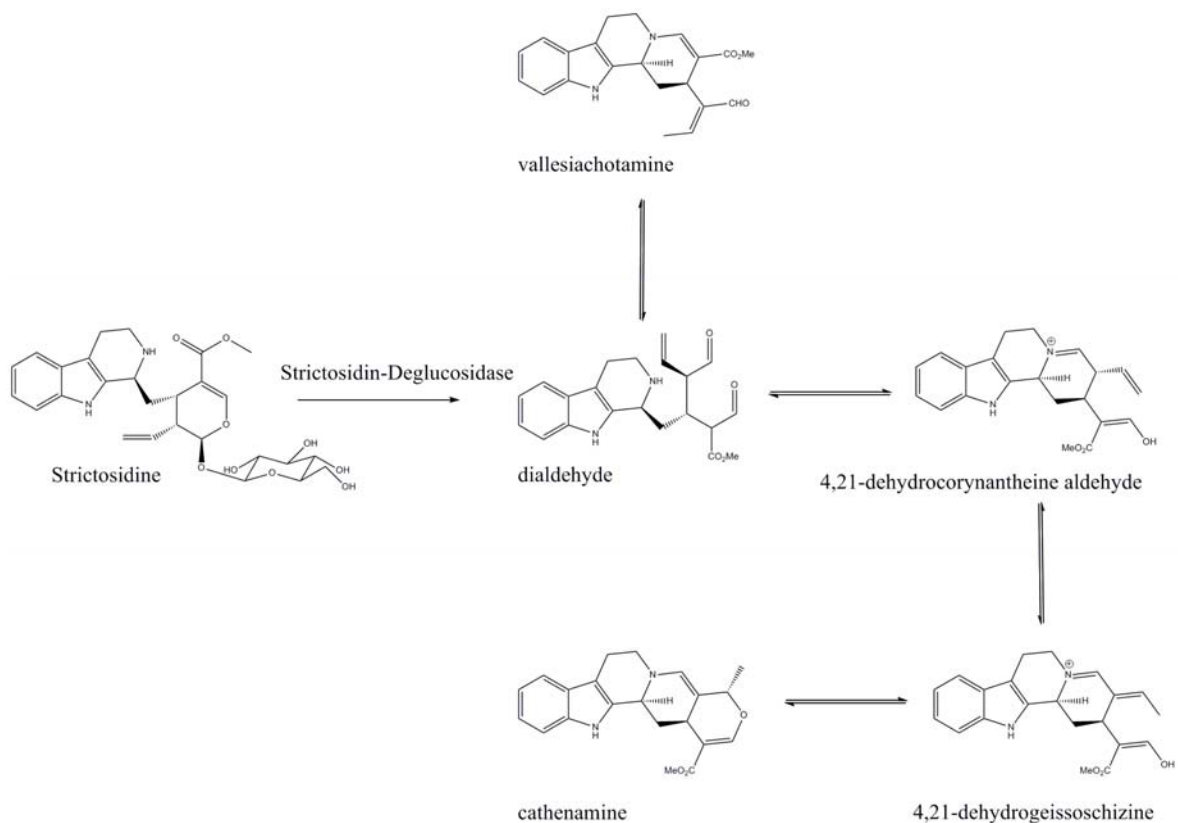
Am historischen Beginn der Strukturbestimmung von Naturstoffen standen den Naturwissenschaftlern nicht alle diese Methoden zur Verfügung. Funktionelle Eigenschaften von Molekülen konnten nur durch geeignete chemische Reaktionen bestimmt werden. Die ungefähre Masse der Substanzen wurde mit thermodynamischen Methoden bestimmt. Aufgrund der Entdeckung der Röntgenspektroskopie Anfang des 20. Jahrhunderts, war man in der Lage Strukturen von Einkristallen zu untersuchen. Durch Weiterentwicklungen, insbesondere in der Elektro- und in der Lasertechnik, wurden neue Analysemethoden entwickelt und alte hinlänglich ihrer Empfindlichkeit verbessert. Dieser Fortschritt brachte eine deutliche Besserung der Strukturbestimmung von Molekülen. Zu den beiden wichtigsten Analysemethoden dieser Zeit in den 1960er Jahren gehören die Infrarot- und die UV/VIS-Spektroskopie. Bei der Infrarotspektroskopie können Molekülschwingungen durch Absorption von elektromagnetischen Wellen im Wellenlängenbereich von Mikrometern untersucht werden. Diese Methode dient im Wesentlichen dazu, einen Überblick zu bekommen, ob die Substanz funktionelle Gruppen besitzt oder nicht. Enthält das Molekül einen Chromophor, kann dieser mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie nachgewiesen werden. Hierbei werden Valenzelektronen durch elektromagnetische Wellen angeregt und deren Fluoreszenz- bzw Phosphoreszenzspektrum aufgenommen. Der letzte entscheidende Meilenstein in der Strukturbestimmung war die Entwicklung der NMR-Spektroskopie. Mit ihr war man nun in der Lage, Naturstoffe in gelöster Form zu messen, sowie deren Struktur zu bestimmen. Um den Strukturvorschlag der Substanz auch verifizieren zu können, benötigt man zudem die Analyse ihrer Masse. Dies erfolgt mit Hilfe der Massenspektrometrie.

Wie im obigen Kapitel beschrieben, hat das Molekül Strictosidine eine herausragende Sonderstellung im Biosyntheseweg von monoterpenoiden Indol-Alkaloiden. Durch Abspaltung des β -D-Glucopyranosids durch das Enzym Strictosidine- β -D-glucosidase und weiter folgenden enzymatischen Umsetzungen, können die wichtigsten Hauptklassen der Terpen-Indol-Alkaloide beschrieben werden (Schema 2).¹⁴ Viele Moleküle dieser Hauptklassen werden bereits für medizinische Zwecke verwendet. Sie finden z. B. Einzug bei der Behandlung von Krebserkrankungen (Vincristine),¹⁵ Herzrhythmusstörungen (Ajmaline)¹⁶ und in der Schmerztherapie (Chinonanthine).¹⁷



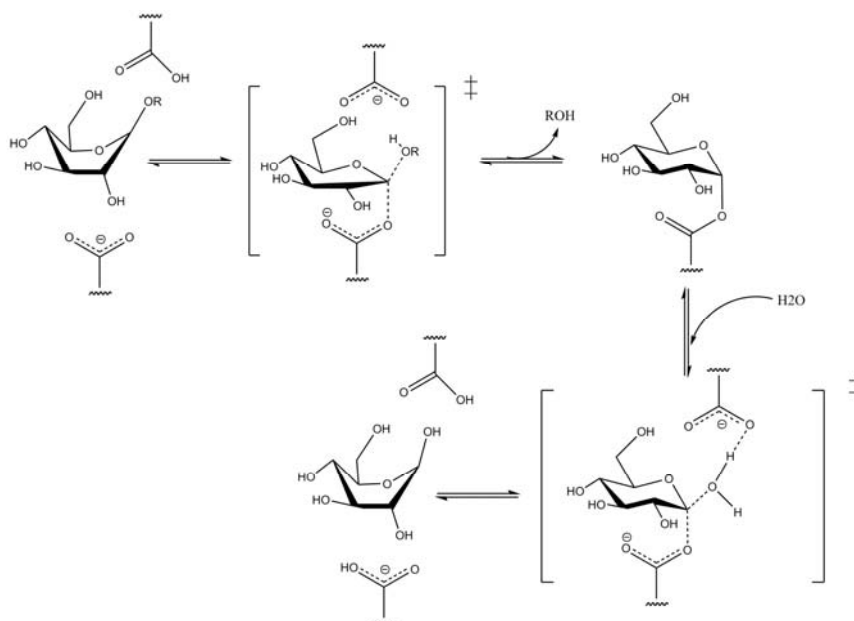
Schema 1: Biosynthetische Darstellung der Hauptklassen der Terpen-Indol-Alkaloide aus Strictosidine¹⁴

Eine besondere Bedeutung bei der Untersuchung der Biosynthese von monoterpenoiden Indol-Alkaloiden kommt der Abspaltung des β -D-Glucopyranosids vom Strictosidine-molekül zu. Der daraus entstehende Dialdehyd steht aufgrund von intramolekularen Umlagerungen mit vier weiteren Zwischenprodukten im Gleichgewicht (Schema 2), wobei nur das Gleichgewicht zwischen Cathenamine und Dehydrogeissoschizin beobachtet werden kann.¹⁸



Schema 2: Darstellung der Produkte nach der Abspaltung des β -D-Glucopyranosids¹⁴

Wie im Schema 2 gezeigt, spielen Enzyme bei der Herstellung von Pflanzeninhaltsstoffen eine wichtige Rolle. Jedes Enzym ist durch eine bestimmte Aminosäuresequenz, die in der Zelle durch Replikationsprozesse erzeugt wird, aufgebaut. Aufgrund der spezifischen Reihenfolge von Aminosäuren entstehen im Enzym besondere räumliche Gegebenheiten, die sogenannten „aktiven Zentren“. Diese sind in der Lage, ohne hohen Energieaufwand Reaktionen katalytisch zu steuern. Im Rahmen dieser Arbeit werden Glucosidasen, die zur EC 3.2.1.21¹⁹ Klassifizierung gehören und in der Natur eine wichtige Rolle einnehmen, verwendet. Man findet Glucosidasen vor allem in Eukaryoten sowie in Archaeobakterien.²⁰ Der Mechanismus der Glucosidhydrolysereaktion dieser Enzymfamilie kann durch die nucleophilen Eigenschaften der Glutaminsäureeinheiten im aktiven Zentrum verstanden werden. Eben genannte gehen mit dem Glucosid intermediär eine kovalente, glycosidische Bindung ein. Die Reaktion läuft unter einer doppelten Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff des Zuckermoleküls ab. Dies hat zur Folge, dass die Konformation des Zuckers im Produkt beibehalten bleibt (Schema 3).



Schema 3: Allgemein beschriebener Mechanismus der Glucosidhydrolyse²¹

Um den entscheidenden Schritt der β -D-Glucosidspaltung in der Indol-Alkaloidbiosynthese nachvollziehen zu können, wird im Rahmen dieser Arbeit die Strictosidin-Akzeptanz von zwei sehr unspezifisch wirkenden Glucosidasen untersucht. Eine der beiden Glucosidasen wird durch Extraktion von getrockneten Mandelstücken gewonnen.²²

Die zweite Glucosidase wird im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik der Technischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um das Enzym CelB, welches aus dem hyperthermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnen wird, und durch vier analoge monomere Einheiten aufgebaut ist.²³ Jedes Monomer besteht aus 471 Aminosäuren, wobei deren aktives Zentrum durch folgende Aminosäuren definiert wird: Arg77, His150, Asn206, Tyr307, Trp410, Glu207, Glu372. Die beiden zuletzt erwähnten Aminosäuren katalysieren die enzymatische Hydrolyse des Glucosids (Abb. 3).²¹



Abbildung 3: Monomere Einheit des homologen Enzyms 1QVB mit Blick auf das aktive Zentrum^{24,25,26}

1.3 NMR-Experimente

Großes Interesse liegt auch in der Erforschung der Mechanismen von enzymkatalysierten Umsetzungen. Hierzu ist es wichtig, die Lage des Substrates im aktiven Zentrum während der Umsetzung zu bestimmen. Dies kann entweder mit selektiven NMR-Experimenten oder durch theoretische Kalkulationen erfolgen. Pionierarbeit für die Untersuchung von Bindungseigenschaften zwischen Enzym und Ligand leisteten Bernd Meyer und Thomas Peters mit der Entwicklung der Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie (STD-NMR) um die Jahrtausendwende.^{27,28} Durch spezifische NMR Pulssequenzen kann dabei der Übergang von Magnetisierung vom Enzym auf den Liganden gemessen werden und somit die relative Nähe des Liganden zum Enzym bestimmt werden. Bei dieser Methode müssen die Struktur des Enzyms sowie auch die Lage des aktiven Zentrums nicht bekannt sein.^{27,28} Eine weitere Methode, Informationen über enzymkatalysierte Umsetzungen zu erlangen, liegt in der *in situ* Kinetik NMR-Spektroskopie. Mit dieser Untersuchungsart können sowohl Umsatzgeschwindigkeiten als auch Gleichgewichtskonstanten einer Enzymreaktion bestimmt werden.^{27,28}

1.4 Dockingsimulation

Die Erforschung von Enzym-Ligand Wechselwirkungen mit Hilfe von Simulationstechniken ist erst in den letzten dreißig Jahren möglich geworden. Aufgrund neuer theoretischer Methoden und der raschen Entwicklung leistungsfähiger Rechencluster ist man heute in der Lage, solch komplexe Berechnungen durchzuführen.²⁹ Der wesentliche Schritt um diese Systeme berechenbar zu machen liegt in der Verwendung von Kraftfeldern.^{30,31,32} Aufgrund der Kraftfeldtheorie ist es nicht notwendig, Energiekalkulationen von Enzymen mit *ab initio* Methoden zu berechnen. Stattdessen kann die Energie durch Addition von intermolekularen und intramolekularen Wechselwirkungen kalkuliert werden.²⁹

Aufgabenstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen Pflanzeninhaltsstoffe aus den oben genannten Arten der Pflanzengattung *Psychotria* mit den üblichen Reinigungsmethoden isoliert und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Für weitere NMR-Experimente soll ein monoterpenes Indol-alkaoid ausgesucht werden, mit welchem der erste Schritt des Indolalkaloidbiosyntheseweges durch geeignete Glycosidasen nachgestellt werden kann. Diese Enzymumsetzungen sollen mit Hilfe von *in situ* und STD-NMR Messungen untersucht werden. Hierbei soll die Bestimmung der Enzymkinetik sowie die Lage des Substrates im Enzym während der Umsetzung erforscht werden. Um die STD-NMR Ergebnisse verifizieren und visualisieren zu können, soll eine entsprechende Docking-simulation durchgeführt werden.

2. Angewandte Methoden

2.1 Methoden zur Isolation von Pflanzeninhaltsstoffen

Um einen Naturstoff aus einer Pflanze isolieren zu können, benötigt man verschiedene physikalisch-chemische Trennverfahren. Zu den weitverbreitetsten Methoden gehören die Extraktion und die Chromatographie.

2.1.1 Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen

Bei der Extraktion versucht man durch Ausschütteln gelöste Stoffe von der Raffinatphase in die Extraktionsphase zu transportieren. Der physikalische Hintergrund dieses Phänomens liegt in den unterschiedlichen freien Lösungsenthalpien der gelösten Substanzen in den verschiedenen Phasen. Erkannt und beschrieben wurde dieses dynamische Verteilungsgleichgewicht erstmals im Jahre 1891 von Walther Nernst.³³

In den beiden Phasen werden die freien Lösungsenthalpien der Substanzen durch folgende Gleichungen definiert:

Raffinatphase:

$$\Delta G^0(R) = \Delta G_{m,B}^0(R) + RT \ln a(R)$$

Extraktionsphase:

$$\Delta G^0(E) = \Delta G_{m,B}^0(E) + RT \ln a(E)$$

ΔG^0 = Änderung der molaren Gibbs-Energie

$\Delta G_{m,B}^0$ = Änderung der molaren freien Standardbildungsenthalpie

a = Aktivitätskoeffizient

Gleichgewichtsbedingung:

$$\Delta G^0(R) - \Delta G^0(E) = 0$$

Durch Umformen und Entlogarithmieren der Gleichgewichtsbedingung erhält man den Nernstschen Verteilungskoeffizienten k .

$$k = \frac{a(E)}{a(R)} = e^{\frac{\Delta G_{m,B}^0(E) - \Delta G_{m,B}^0(R)}{RT}}$$

2.1.2 Chromatographie von Pflanzeninhaltsstoffen

Das analytische Verfahren der Chromatographie wurde erstmals im Jahre 1903 vom russischen Botaniker Michail Semjonowitsch Tswett angewende.^{34,35} Er trennte einen gefärbten pflanzlichen Chlorophyll-Extrakt mit Hilfe von Ligroin und Inulin.^{34,35} Der grundlegende Aufbau jeder Chromatographie setzt sich aus der mobilen Phase und der stationären Phase zusammen. Die Verteilung einer Substanz zwischen der stationären und der mobilen Phase kann wiederum durch das Nernst-Verteilungsgesetz verstanden werden. Durch die Variationsmöglichkeiten der stationären Phase kann man verschiedene Klassen von Substraten trennen. Häufig verwendete Verfahren zur Trennung von Pflanzeninhaltsstoffen beruhen auf der Polaritätschromatographie sowie der Größenausschlusschromatographie.² Bei der Polaritätschromatographie versucht man mit Hilfe der unterschiedlichen Polaritäten der Substrate eine Trennung zu erhalten. Wie gut und wie lange sich ein Stoff an die stationäre Phase festhalten kann, wird dabei von der Polarität des verwendeten Eluenten beeinflusst. Wird die Größenausschlusschromatographie verwendet, versucht man durch Größenunterschiede der Substanzen eine Trennung zu erhalten. Hier spielt die mobile Phase nur eine untergeordnete Rolle.

Eine sehr hilfreiche Chromatographiemethode ist die Dünnschichtchromatographie (DC). Sie wird hauptsächlich zur schnellen Kontrolle der Probenreinheit oder zum Probenvergleich mit einer bekannten Substanz verwendet. Als stationäre Phase wird vor allem Al_2O_3 oder Kieselgel mit einer Porengröße von 10-100 nm verwendet, welches jeweils entweder auf Glas oder fester Aluminiumfolie aufgetragen wird. Mit dem entsprechenden Trägermaterial kann auch eine reversed-phase-DC oder eine präperative-DC durchgeführt werden.² Die erstgenannte Methode basiert auf Veresterung des Kieselgels mit langkettigen unpolaren organischen Alkoholen. Dieser so entstandene Film auf der stationären Phase bewirkt, dass nun unpolare Substanzen getrennt werden können. Die präperative-DC wird für die Reinigung von kleinen Substanzmengen verwendet. Hierbei wird die Schichtdicke des Kieselgels für das Erlangen einer besseren Trennung erhöht. Bei der analytischen DC liegt das aufgebrauchte Volumen einer schwach konzentrierten Probe im Bereich von einigen Mikrolitern und sollte möglichst punktförmig am Trägermaterial platziert werden. Zur Charakterisierung einer Substanz kann man ihre Retentionszeit berechnen

und diese mit Literaturangaben abgleichen. Durch Variationen des Eluenten kann die Trennleistung stark variiert werden.

Präparative Trennungen werden in der Regel mittels Säulenchromatographie vorgenommen, wobei der Fluss der mobilen Phase durch die Gravitation hervorgerufen wird. Eine weitere Methode der Säulenchromatographie zur Substanztrennung ist die, ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Middle Pressure Liquid chromatographie (MPLC).³⁶ Hierbei wird während der Elution ein Druck zwischen 2 bar und 4 bar angelegt. Nach der Chromatographiesäule ist ein UV/VIS-Detektor angeschlossen, der eine selektive Fraktionierung von fluoreszierenden Substanzen ermöglicht.²

2.2. Methoden zur Charakterisierung der Pflanzeninhaltsstoffe

2.2.1 HPLC-Methode

Wie im vorherigen Abschnitt schon erwähnt, kann die Technik der Chromatographie sehr gut für die Trennung von Stoffen herangezogen werden. Das Prinzip der Chromatographie kann auch zur Charakterisierung von Substanzen verwendet werden. Meistens benützt man hier die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC),² die mit einem spezifischen Detektor gekoppelt ist, mit welchen die austretenden Substanzen erfasst werden können. Aufgrund des Trennverfahrens bekommt man für jede Substanz ihre spezifische Retentionszeit und mit Hilfe des Detektors ein dazugehöriges Spektrum. Nachteile von Detektoren liegen in ihrem beschränkten Anwendungsbereich. Für einen UV/VIS-Detektor gilt zum Beispiel, dass dieser nur Substanzen mit einem Chromophor detektieren kann, alle anderen Substanzen jedoch „unsichtbar“ sind. Dies hat zur Folge, dass man mit dieser Technik nur vergleichende Informationen über die Pflanzeninhaltsstoffe bekommt.

2.2.2 NMR-Methode

Ist eine Probe in hinlänglichem Maße gereinigt und in ausreichenden Mengen vorhanden, ist die Technik der Wahl für die Bestimmung einer Substanz die Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spektroskopie. Mit dieser Spektroskopiemethode kann die Struktur jedes organischen Naturstoffes exakt bestimmt werden. Für die Verifizierung einer Substanz benötigt man jedoch viele verschiedene NMR-Experimente. Diese beinhalten in erster Linie eindimensionale (1D) und zweidimensionale (2D) NMR-Techniken. Zu den 1D-Methoden gehören ¹H und ¹³C- Spektren. Der Umgang mit 2D-Methoden verlangt schon ein tiefer gehendes Verständnis der NMR-Spektroskopie und deren Pulsprogramme. Das Fachgebiet der 2D-NMR beinhaltet im Wesentlichen folgende Messmethoden: COSY, TOCSY, HSQC, HMBC und NOESY.

Die Aufnahmetechnik COSY (Correlated Spectroscopy) gibt uns hauptsächlich Informationen über skalare Wechselwirkungen geminal und vicinal gebundener H-Atome. Besondere Vorsicht gilt bei Ringsystemen, da aufgrund der Karplus Beziehung^{37,38} manche Kopplungen sehr klein sind und zu falschen Schlüssen führen können. Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt auch darin, dass man sogenannte long range Kopplungen ($^4J_{H-H}$ Kopplungen) sehen kann, wenn diese ausreichend große Kopplungskonstanten besitzen. Diese können somit auch zu falschen Interpretationen verleiten.

Mit Hilfe des TOCSY-Spektrums (Total Correlated Spectroscopy)³⁹ kann man einzelne, in sich abgeschlossene, Spinsysteme bestimmen. Ein Spinsystem ist eine kettenartige Aneinanderreihung von z. B. Methylen und/oder Methingruppen, deren Protonen jeweils miteinander Kopplungen zeigen. Sie werden entweder durch einen quaternären Kohlenstoff, ein Kettenende oder durch ein Heteroatom begrenzt.

Die HSQC Methode (Heteronuclear Single Quantum Correlation)³⁹ gehört zu den heteronuklearen Aufnahmetechniken. Bei dieser Technik werden Kopplungen zwischen einem Kohlenstoffatom und dem direkt gebundenen, skalar $^1J_{H-C}$ koppelnden Wasserstoffen gemessen. Mit diesem Experiment kann man somit jedem Wasserstoffatom seinen dazugehörigen Kohlenstoff zuordnen.

Eine weitere heteronukleare spektroskopische Methode ist das HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation).³⁹ Es gibt Auskunft über $^{2,3}J_{H-H}$ -Kopplungen zwischen einem Kohlestoff und einem Wasserstoff. Diese Aufnahmetechnik gehört zu den wichtigsten Methoden für das Zusammenführen unterschiedliche Teilstücke eines Moleküls im Rahmen einer Interpretation.

Die NOESY (Nuclear Overhauser-Effect Spectroscopy)⁴⁰ Methode passiert auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und nicht auf skalar gebundenen Wasserstoffatomen. Diese Analyseform gibt uns Auskunft über die relative Konformation eines Moleküls.

2.2.3 Massenspektrometrie-Methode

Eine weitere wichtige analytische Anwendung für die Charakterisierung von Molekülen ist die Massenspektrometrie. Mit dieser Methode lassen sich Massen von unterschiedlichen Substraten exakt bestimmen. Hierbei werden geladene Teilchen durch Anlegen einer Spannung von 2 bis 10 kV im Vakuum beschleunigt und anschließend in einem starken Magnetfeld abgelenkt.² Die Ablenkung der Flugbahn eines geladenen Teilchens wird durch seine Masse bestimmt. Kleine Moleküle werden sehr stark abgelenkt, schwere Substrate nur sehr leicht. Den physikalischen

Zusammenhang zwischen Ablenkradius der Flugbahn und der Molekülmasse wird durch folgende Formel leicht erkennbar:

Formel:²

$$\frac{m}{Z} = \frac{r^2 B^2}{2U}$$

B = Magnetfeldstärke

U = Beschleunigungsspannung

m = Masse

Z = Ladung der Substanz

r = Ablenkungsradius

In dieser Arbeit werden alle Substanzen mit der ESI-Methode (Elektrospray-Ionisation-Methode)⁴¹ aufgenommen. Hierbei handelt es sich um eine sanfte Ionisationsmethode, wobei das Substrat zu einem positiv oder negativ Ion ionisiert werden kann.

2.3 Methoden zur teilweisen Reinigung von Enzymen

Um Enzyme aus biologischen Materialien isolieren zu können, bedarf es eines großen chemischen und instrumentellen Aufwandes. Neben den bereits prinzipiell beschriebenen chromatographischen Verfahren besteht ein entscheidender Trennvorgang darin, Enzyme in hochkonzentrierten Lösungen auszufällen. In diesem Zustand sind Enzyme inaktiv. Zur Aufreinigung der Proteine benötigt man somit nicht nur die chromatographischen Trennmethode, sondern auch technische Geräte wie eine Zentrifuge. Das physikalische Trennprinzip der Zentrifuge zum Auftrennen von Suspensionen beruht auf der hohen entstehenden Zentripetalkraft.⁴² Diese Kraft verursacht, dass sich schwerere Teilchen aufgrund ihrer höheren Massenträgheit am Boden absetzen.

Formel:⁴³

$$|a| = -R\omega^2$$

a = Zentripetalbeschleunigung

R = Radius

ω = Winkelgeschwindigkeit

Will man in der Folge Experimente mit gelösten Enzymen durchführen (z.B. *in situ* NMR oder STD NMR-Experimente^{27,28}), so benötigt man Pufferlösungen, bei denen das Enzym in

gelöstem Zustand vorliegt. Um dies zu ermöglichen, verwendet man das Prinzip der Dialyse. Dazu wird eine semipermeable Membran zwischen der gewünschten Pufferlösung und der Lösung mit dem Enzym platziert. Da die Pufferlösungen ein unterschiedliches chemisches Potential aufweisen, haben diese das Bestreben, durch Diffusion von Wasser- und Puffermolekülen durch die Membran zu einem chemischen Gleichgewicht mit entsprechend gleichen Konzentrationen zu gelangen. Da der verwendete Dialyseschlauch eine Porendurchlässigkeit von 10.000 Dalton besitzt, diffundieren auch kleine, übriggebliebene Verunreinigungen durch die Membran aus dem Schlauch heraus, nicht jedoch die Enzyme. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass somit nur die gewünschten Enzyme in der Pufferlösung im Schlauch zurückbleiben. Dieser Vorgang der Dialyse wird so lange durchgeführt, bis die beiden chemischen Potentiale ausgeglichen sind.

Um für NMR Messungen das normale Wasser durch deuteriertes Wasser austauschen zu können, verwendet man die Technologie der Gefriertrocknung (Lyophilisation). Hierbei wird das in Pufferlösung gelöste Enzym mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch Anlegen eines Vakuums sublimiert das gefrorene Wasser direkt in die Gasphase. Das entstandene Lyophilisat kann nun mit deuteriertem Wasser aufgenommen werden.²²

2.4 Methoden zur Analyse von Protein-Ligand Bindungen

Die Untersuchung der Lage eines Liganden in einem Rezeptor während einer Enzymumsetzung ist nicht nur von rein chemischem Interesse, sondern ist ein wichtiges Forschungsgebiet in Teilbereichen der Biologie, der Pharmazie und der Medizin. Hierbei ist es von entscheidender Bedeutung, nicht nur die Position des Liganden im Enzym zu bestimmen, sondern auch die Aminosäuren, die für die Bindung und Reaktion verantwortlich sind. Sind diese charakterisiert, kann man ein aktives Zentrum des Proteins definieren, welches von großer Wichtigkeit für die Untersuchung des möglichen Mechanismus des Enzyms ist. Durch zahlreiche Experimente können in weiterer Folge Rückschlüsse über die Rolle des Enzyms im Organismus gezogen werden. Mit den gewonnenen Informationen kann man nun selektiv auch artifizielle, unnatürliche Substanzen mit dem Protein reagieren lassen, um so mögliche Medikamente zu entwickeln, die zur Heilung von Krankheiten beitragen können.

Ein Mittel der Wahl für die Bestimmung der Lage eines Liganden in einem Rezeptor ist die STD-NMR Messung. STD steht für Saturation-Transfer-Difference.^{27,28} Hierbei wird eine katalytische Menge an Enzym mit einem Substrat vereint und in D₂O gelöst. Zur Kontrolle wird von dieser Lösung ein ¹H-Spektrum aufgenommen und archiviert. Im darauffolgenden STD NMR-Experiment wird das Enzym durch selektive Gauss-pulse über einen Zeitrahmen von 2-3 s gesättigt. Da diese Vorsättigungspulse eine Dauer von 45 bis 85 ms besitzen, regen sie ein kleines

Frequenzfenster von wenigen Hertz an. Dieser Sachverhalt zwischen der Länge eines Pulses und seiner beinhalteten Frequenzen kann mit Hilfe der Heisenberg'schen Unschärferelation verstanden werden. Da man nur das Protein und nicht die Substanz anregen will, wird die Frequenz des Pulses so gewählt, dass zum Beispiel die Methylengruppen eines Enzyms angeregt werden. Aufgrund der relativ schnellen Spin-Diffusion, die bei Molekülen ab einer Größe von 10 kDa intensiv auftritt, verteilt sich die Magnetisierung in wenigen Millisekunden auf das ganze Molekül.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme und Substrate zeigt sich, dass die optimale Einstrahlfrequenz der Vorsättigungspulse bei -2.5 ppm liegt. Da die Sättigung des Proteins über einen Zeitraum von ein paar Sekunden erfolgt, kann dieses seine Magnetisierung in der Zwischenzeit durch direkte Dipol-Dipol-Kopplungen auf die Protonen der wechselnden Liganden im aktiven Zentrum übertragen werden. Diese Wechselwirkung steht in Abhängigkeit zu $\frac{1}{r^6}$, somit können nur naheliegende Ligandenfragmente diese inkohärente Magnetisierung erfahren. Die Gesamtmagnetisierung aller Moleküle wird mit Hilfe eines 90° Pulses in die Kohärenz überführt und anschließend detektiert. Diese Art der NMR-Spektroskopie wird als On-Resonance-Spektroskopie bezeichnet.

Bei der direkt danach folgenden Off-Resonance-Aufnahme wird die Frequenz der Gausspulse so platziert, dass weder das Protein, noch der Ligand eine Magnetisierung erfahren. Die Frequenzen solcher Pulse liegen zwischen 20 ppm und 40 ppm.

Nun zieht man das Off-Resonance vom On-Resonance-Spektrum ab und erhält das STD-NMR-Spektrum. Die Intensitäten der einzelnen Signale sind direkt proportional zur Stärke der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Liganden. Sie geben somit Information über die relative Lage des Liganden im Protein.^{27,28}

2.5 Methoden für *in situ* NMR-Spektroskopie

Bei der Untersuchung von biokatalysierten Umsetzungen von organischen Substanzen mit einem Protein, bekommt die *in situ* NMR Spektroskopie einen immer höheren Stellenwert.⁴⁴ Der Grund für ihre breite Anwendung liegt in ihrem nichtinvasiven Charakter. Es können somit biokatalysierte Reaktionen beobachtet werden, ohne in den Vorgang einer Reaktion einzugreifen. Hierzu werden 1D-NMR-Techniken benutzt, die in periodischen Zeitabständen den Ablauf der Reaktion festhalten. Durch Intensitätsvergleiche der aufgenommen Spektren lässt sich die Geschwindigkeit einer Reaktion bestimmen. Wird dieser Vorgang bei unterschiedlichen

Eduktkonzentrationen durchgeführt, kann mit Hilfe der Michaelis-Menten Gleichung der K_m -Wert und der $v_{\max}$ -Wert der Reaktion eruiert werden.

Michaelis-Menten Gleichung

$$v_0 = v_{\max} \frac{[Substrat]}{[Substrat] + K_m}$$

$v_{\max}$ = Maximalgeschwindigkeit der Umsetzung

K_m = Michaelis-Menten-Konstante

Bei entsprechendem Umformen lässt sich die Michaelis-Menten Gleichung graphisch in einem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 4) darstellen.⁴⁵

Formel:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max} [Substrat]}$$

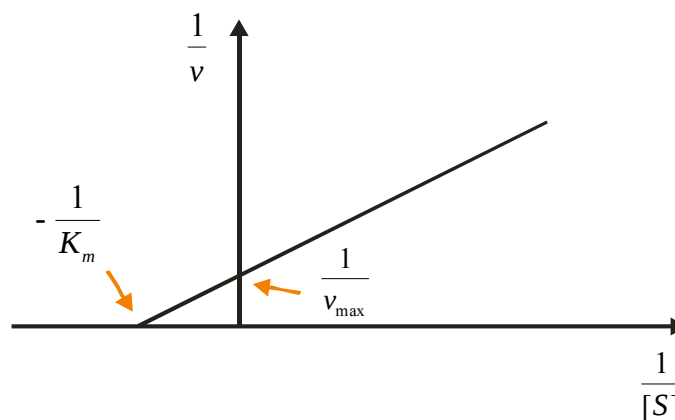


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramm.⁴⁵

Um den K_m -Wert und den $v_{\max}$ -Wert einer Enzymumsetzung aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm bestimmen zu können, werden die Werte der beiden Schnittpunkte an den Achsen berechnet, und so umgeformt, dass man die entsprechenden Werte für K_m und $v_{\max}$ erhält.

2.6 Methoden zu Docking-Simulationen

Um die Energie eines Moleküls ohne ab initio Berechnungen bestimmen zu können, benötigt man die Theorie des Kraftfeldes. Hierzu werden intramolekulare Wechselwirkungen mit Hilfe von empirisch gefundenen Funktionen berechnet. Die dafür notwendigen Parameter erhält man durch physikalisch-chemische Analysemethoden wie zum Beispiel der Röntgenstrukturanalyse, NMR-, Infrarot-, Raman- oder der Rotationsspektroskopie.²⁹

Die Berechnung der Gesamtenergie setzt sich aus folgenden Termen zusammen:

Gesamtenergie:

$$E = \sum E_{\text{Bind}} + \sum E_{\text{Biege}} + \sum E_{\text{Tors}} + \sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{\text{el}} + \sum E_{\text{Kopp}}$$

Der erste Term beschreibt die Bindungsenergie zwischen zwei Atomen in Abhängigkeit des Bindungsabstandes. Sie kann mit Hilfe des Morse-Potentials verstanden werden. Für Konformationsberechnungen eines Moleküls im Grundzustand ist die Anwendung des harmonischen Oszillators ausreichend.

*Morse Potentialenergie:*⁴⁶

$$E_{\text{Morse}}(\Delta R) = D(1 - e^{-\alpha \Delta R})^2$$

D = Dissoziationsenergie

ΔR = Abweichung vom Gleichgewichtsabstand

α = molekularer Parameter

$$\alpha = \sqrt{\frac{k}{2D}}$$

k = Kraftkonstante

Potentialenergie des Harmonischen Oszillators:

$$E_{\text{Harm}}(\Delta R) = k(\Delta R)^2$$

Weiters lässt sich mit Hilfe des harmonischen Oszillators die Energie des Valenzwinkelpotentials gut darstellen.

Valenzwinkelenergie:

$$E_{\text{Biege}}(\Delta\Theta) = k(\Delta\Theta)^2$$

$\Delta\Theta$ = Änderung des Bindungswinkels

Für die Berechnung der Torsionsenergie benötigt man eine periodische Funktion. Sie beschreibt die Energie, die aufgewendet werden muss, um eine Rotation entlang einer Bindung durchführen zu können.

Torsionsenergie:

$$E_{\text{Tors}}(\phi) = \sum_{n=1} V_n \cos(n\phi)$$

ϕ = Torsionswinkel

Die van der Waals-Energie beschreibt die attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen zweier nicht kovalent gebundener Atome in Abhängigkeit des Atomabstandes. Sie kann entweder durch das Lennard-Jones Potential, oder aber durch das Buckingham-Hill Potential erklärt werden, wobei das Lennard-Jones Potential aufgrund der leichteren Handhabung bevorzugt verwendet wird.

*Lennard-Jones Potential:*⁴⁷

$$E_{\text{LJ}}(R) = \varepsilon \left[\left(\frac{R_0}{R} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \right]$$

ε = Tiefe des Potentialminimums

R_0 = Abstand, bei dem das Potential ein Minimum erfährt

R = Abweichung vom Gleichgewichtsabstand

*Buckingham-Hill Potential:*⁴⁸

$$E_{BH}(R) = Ae^{-BR} - \frac{C}{R^6}$$

ABC = Parameter

R = Abweichung vom Gleichgewichtsabstand

Um die elektrostatischen Wechselwirkungen zweier geladener Teilchen oder Molekülgruppen kalkulieren zu können, wird das Coulomb Gesetz verwendet.

Coulomb Gesetz:

$$E_{Coul}(R) = \frac{Q_i Q_j}{4\pi\epsilon_0 R}$$

Q_i, Q_j = Ladungen der Teilchen

R = Abweichung vom Gleichgewichtsabstand

Der letzte Term $\sum E_{Kopp}$ beschreibt Kopplungen zwischen den oben erwähnten intramolekularen Wechselwirkungen. Ein Beispiel hierzu wäre die direkte Proportionalität zwischen der Veränderung des Bindungswinkels mit der dazu folgenden Veränderung der Bindungslänge.

Kopplungsenergie:

$$E_{Bind/Biege} = k(\Delta\Theta)[\Delta R_{i,j} - \Delta R_{j,k}]$$

$\Delta R_{i,j}, \Delta R_{j,k}$ = Änderung des Bindungsabstandes

$\Delta\Theta$ = Änderung des Bindungswinkels

Heutzutage werden, um Moleküle oder Proteine beschreiben zu können, sogenannte universelle Kraftfelder wie AMBER, CHARMM oder CROMOS verwendet.^{30,31,32} Man setzt zur Kalkulation der Gesamtenergie nicht mehr die einzelnen Atomelemente ein, sondern Atomgruppen wie zum Beispiel, COO^- , NH_2 , CH_3 . Diese Approximation führt nicht nur zur Erleichterung der Energieberechnung einer Substanz, sondern auch zu einem gehörigen Gewinn an Computerrechenzeit. Ein Problem der oben erwähnten Kraftfelder liegt darin, dass sie nicht

miteinander kompatibel sind. Dies hat zur Folge, dass man bei der Berechnung ein und derselben Substanz unterschiedliche Energien erhält. Die in dieser Arbeit benutzten Dockingprogramme MOE (Molecular Operating Environment),⁴⁹ GLIDE (Schroedinger®)⁵⁰ sind in der Lage verschiedene Kraftfelder für die gleiche Berechnung zu verwenden. Der wesentliche Unterschied der beiden Programme liegt in ihren Möglichkeiten eine Dockingsimulation durchzuführen. Das GLIDE-Programm ist in der Lage sowohl für den Liganden als auch für den Rezeptor Konformationsänderungen zu kalkulieren. Beim MOE-Programm bleibt der Rezeptor starr und nur durch Konformationsänderung des Liganden kann die Lage zum Protein optimiert werden.⁴⁹

3. Experimenteller Teil

3.1 Extraktion von Naturstoffen aus Pflanzen

3.1.1 Bereitstellung der Pflanzenmaterials

Damit ein Naturstoff aus einer Pflanze möglichst unverändert isoliert werden kann, benötigt man einen sorgsam Umgang mit dem Pflanzenmaterial, um allfällige Reaktionen des Naturstoffs zu vermeiden. Eine solch gewissenhafte Behandlung beginnt mit der richtigen Bestimmung der Pflanze sowie einer genauen Aufteilung des Pflanzenmaterials in Blüten, Blätter und Wurzelmaterial. Um den Befall der Pflanzenbestandteile von Schimmel und anderen Mikroorganismen zu vermeiden, werden die gesammelten Pflanzenmaterialien in einem Trockenschrank sachgemäß getrocknet. Diese Vorarbeiten absolvierten für die in dieser Arbeit untersuchten Materialien Mitarbeiter des Zentrums für Biodiversität, Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung, Arbeitsgruppe Phytochemie an der Universität Wien.

3.1.2 Psychotria elata

3.1.2.1 Durchführung

Das gesammelte Material der Pflanze *Psychotria elata* stammt aus dem Regenwald Esquinas in Costa Rica. Für die Isolierung der Naturstoffe aus der Pflanze werden 50 g der getrockneten Blätter eingewogen. Anschließend werden die Blätter mit einem handelsüblichen Mixer zerkleinert. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wird in 1000 mL Methanol aufgenommen und 72 h lichtgeschützt gelagert. Diese Extraktion wird einmal wiederholt. Die gewonnenen Extrakte werden vereinigt und unter Vakuum bei 35°C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Anschließend wird eine Probe vom Gesamtextrakt genommen und ein UV/VIS-Profil mit Hilfe der HPLC erstellt. Der verbliebene Gesamtextrakt (4,20 g) wird nun in 300 mL CHCl₃ gelöst und mit 300 mL Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wird entnommen und mit 300 mL EtOAc ausgeschüttelt. Alle drei Extrakte werden unter Vakuum bei 35°C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und deren Mengen bestimmt. Nun wird aus jedem der drei trockenen Rückstände eine Stichprobe entnommen und deren Profile mit dem des Gesamtextraktes verglichen.

Dabei zeigt sich, dass sich ein Großteil der Inhaltsstoffe in der wässrigen Phase befindet. Das getrocknete Material (2,532 g) der wässrigen Phase wird in wenig Methanol (ca. 1 mL) gelöst und auf eine kleine Menge grobkörniges Kieselgel (Carl Roth GmbH & Co KG) aufgetragen. Nun lässt man das Methanol verdampfen und trägt das zurückbleibende Material auf die trockene Kieselgelsäule (Carl Roth GmbH & Co KG) auf. Für die Trennung der Substanzen wird der Eluent

gradientiell in 10-% Schritten von reinem EtOAc bis zu reinem Methanol aufgetragen. Das Volumen jeder partiellen Eluatenmischung beträgt 100 mL, wobei nach 50 mL fraktioniert wird. Von jeder dieser aufgefangenen Fraktionen wird ein HPLC-UV/VIS-Profil erstellt. Ein HPLC-Diagramm des Gesamtextraktes ist in Abbildung 5 gezeigt. Weiters wird eine Dünnschichtchromatographie mit allen Fraktionen durchgeführt. Als Eluent wird ein Gemisch aus Butanol, Wasser und Essigsäure in dem Verhältnis 5:4:1 verwendet. Um nichtfluoreszierende und absorbierende Bestandteile detektieren zu können, wird die DC-Platte mit Anisaldehydlösung besprüht (Abb. 6). Dieses Färbungsmittel dient zur Darstellung von Substanzen, die entweder Alkohole, Aldehyde oder Amine als funktionale Gruppen tragen.

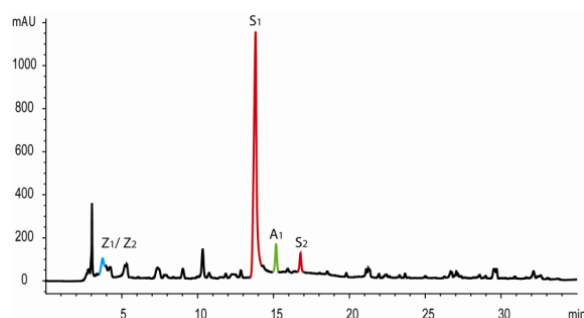


Abbildung 5: HPLC-Profil von *Psychotria elata*, das mit der Eluatenmethode 2 erstellt wurde [s.u.].

Tabelle 1: Volumina der einzelnen Lösungsmittel in den eingesetzten Fraktionen

Fraktionen	EtOAc [mL]	Methanol [mL]
I ₁ -I ₂	100	0
II ₁ -II ₂	90	10
III ₁ -III ₂	80	20
IV ₁ -IV ₂	70	30
V ₁ -V ₂	60	40
VI ₁ -VI ₂	50	50
VII ₁ -VII ₂	30	70
VIII ₁ -VIII ₂	10	90
IX ₁ -IX ₂	0	100
X ₁ -X _G	0	100

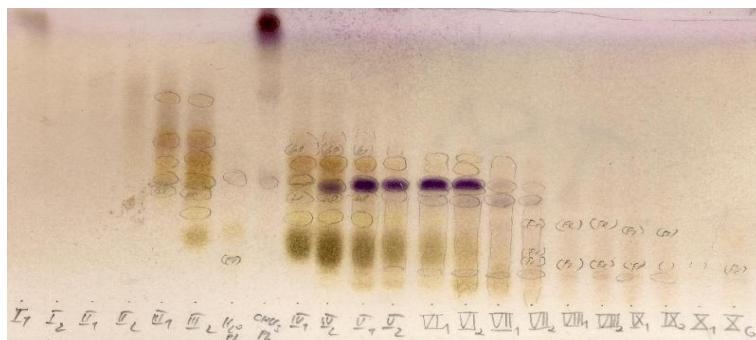


Abbildung 6: DC der gewonnenen Fraktionen.

Zusammensetzung der Anisaldehydlösung:

5 mL Methanol, 10 mL Eisessig, 8 mL konzentrierte. H_2SO_4 , 0.5 mL Anisaldehyd. Die Lösung wird bei 4° C gelagert.

Technische Daten der benutzten Materialien und Gerätschaften:

Kieselgel für präparative Chromatographie:

Kieselgel 60 (0,2-0,5 mm) (Carl Roth GmbH & Co KG)

Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm) (Merck)

DC:

TLC Silica gel 60F254 (Merck)

HPLC:

Gerät:

1100 Series (Agilent)

UV/VIS- Detektor-DC (254 nm-366 nm) (LAMAG)

Säule:

BDS 250 4,6 mm, 5 μ m Korngröße (Hypersil)

Eluierungsgeschwindigkeit:

1 mL/min

Probenmenge:

10 μ L

Elueten:

Methanol (Fisher Scientific)

10 mM NH_4 -Lösung (Carl Roth GmbH & Co KG)

Tabelle 2: Benutzte Eluentenmethode 1

Minuten	10 mM NH₄OAc	Methanol
	[%]	[%]
0	70	30
25-35	0	100

Die Methanolkonzentration steigt vom 0 min bis 25 min gradientiell bis zu 100%igem Methanol an.

Tabelle 3: Benutzte Eluentenmethode 2

Minuten	10 mM NH₄OAc	Methanol
	[%]	[%]
0-12	60	40
12-15	10	90
15-25	0	100

3.1.1.2 Isolierung der Substanz S1

Die Fraktionen von der Trockensäule V₂ bis VI₂ werden vereinigt und unter Vakuum bei 35°C am Rotationsverdampfer eingengt. Das getrocknete Material wird in wenig Methanol (ca. 1 mL) gelöst und auf eine Sephadexsäule LH20 (GE Healthcare) aufgetragen. Als Elutionsmittel dient reines Methanol. Das Volumen jeder aufgefangenen Fraktion beträgt ca. 25 mL. Von jeder gewonnenen Fraktion wird wieder ein HPLC-UV/VIS-Profil erstellt und miteinander verglichen. Weiters wird eine DC mit den oben erwähnten Bedingungen durchgeführt.

Die Fraktionen 3 und 4 zeigen im UV-Spektrum bzw. auf der DC eine ausreichende Reinheit und können somit für die NMR-Messungen bereit gestellt werden.

Menge der isolierten Substanz S1

Fraktion3: 11 mg

Fraktion4: 20 mg

Analog zur Durchführung der Reinigung der Substanz S1 wird mit den Trockensäulenfraktionen IV₂ bis V₁ die gleiche Reinigungsprozedur durchgeführt. Die gewonnenen Fraktionen der Sephadexsäule 5-7 beinhalten die Substanz, zeigen jedoch Verunreinigungen. Dies führt dazu, dass noch eine weitere Reinigung durchgeführt werden muss. Das Mittel der Wahl

hierzu ist die MPLC (middle-pressure-liquid-chromatographie).³⁹ Die Eluierung der Fraktionen geschieht unter einem Druck von 2 bar mit einer anschließenden UV/VIS Detektion.

Die Eluentenlösung setzt sich aus 30%igem Methanol sowie 70%igem EtOAc zusammen. Die MPLC-Fraktionen 6 bis 9 zeigen die Substanz mit einer sehr hohen Reinheit. Zur Bestimmung dieser Substanz werden die Randfraktionen 6 und 9 zur NMR-Messung bereitgestellt.

Technische Daten der benutzten Gerätschaften:

MPLC:

Geräte:

Pump Controller C-610 (Büchi)

Pump Module C-601 (Büchi)

UV/VIS Detektor

Säule:

Labor Li-Chroprep SI 60 (40-63 μm) (Merck)

Menge der isolierten Substanz S1

Fraktion 6 (MPLC): 7.4 mg

Fraktion 9 (MPLC): 1.7 mg

3.1.1.3 Isolation der Substanzen Z1/Z2

Zur weiteren Reinigung der Substanzen Z1/Z2 wird unter den gleichen Bedingungen, wie für die Gewinnung der Substanz S1, eine Sephadexsäulenchromatographie mit der Fraktion X₁ der Trockensäule durchgeführt. Hierbei ergibt sich, dass die gewonnenen Fraktionen 2 bis 8 mit einer ausreichenden Reinheit die Substanzen enthalten. Sie werden vereinigt und zur NMR-Messung bereitgestellt.

Menge der Substanz Z1/Z2

Fraktionen(2-8): 17 mg

3.1.1.4 Isolation der Substanzen A1/S2

Hierbei werden die Trockensäulenfraktionen III₁ bis IV₁ vereinigt und auf eine Sephadexsäule LH20 (GE Healthcare) aufgetragen. Das Eluationsmittel ist Methanol. In den Fraktionen 18 bis 22 sind die Substanzen detektierbar. Um das Substanzgemisch auftrennen zu können, wird eine weitere Kieselchromatographie (Merck) durchgeführt.

Tabelle 4: Volumina der einzelnen Lösungsmittel in den eingesetzten Fraktionen

Fraktionen	EtOAc [mL]	Methanol [mL]
1-3	100	0
4-6	99	1
10-12	95	5
13-17	85	15
18-22	70	30
23-26	50	50

Isolation der Substanz A1: In den Fraktionen 1 bis 17 der Kieselgelsäulenchromatographie befindet sich die Substanz A1. Die Probe zeigt einige Verunreinigungen im HPLC-UV/VIS-Profil. Aufgrund ihrer geringen Masse ist eine weitere Reinigung nicht sinnvoll. Die Probe wird zur NMR-Messung bereit gestellt.

Menge der Substanz A1

Fraktionen(4-17): 1,3 mg

Isolation der Substanz S2: Die Substanz S2 ist in der Fraktion 21 vorhanden. Auch diese Probe weist im HPLC-UV/VIS-Profil Verunreinigungen auf, die nicht weiter entfernt werden können. Die Probe wird zur NMR-Messung bereit gestellt.

Menge der Substanz S2

Fraktion(21): 0,5 mg

Die Auswertung der NMR Spektren sowie die interpretierten Strukturen der isolierten Substanzen werden im Kapitel 4.1 beschrieben.

3.1.2 *Psychotria chagensis*

3.1.2.1 Durchführung

Wie die Pflanze *Psychotria elata* ist auch die Pflanze *Psychotria chagensis* im Esquinas Regenwald in Costa Rica gesammelt worden. Für die Isolation ihrer Inhaltsstoffe werden 18 g Wurzelbestandteile verwendet. Die Durchführung der Reinigung der Inhaltsstoffe ist analog zur Isolation von Pflanzeninhaltsstoffen aus der Pflanze *Psychotria elata*. Beim Vergleich der HPLC-UV/VIS-Profile der Extraktionsphasen erkennt man, dass sich die zu untersuchenden Inhaltsstoffe in der EtOAc- und in der CHCl₃-Phase befinden. Diese beiden Phasen werden vereinigt und unter Vakuum bei 35°C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das getrocknete Material wird in wenig EtOAc (ca. 1 mL) aufgenommen und auf eine mit EtOAc konditionierte Kieselgelsäule (Carl Roth GmbH & Co KG) aufgetragen.

Die Eluierung wird mit einem Eluentengradienten durchgeführt, wobei man mit EtOAc beginnt und bei reinem Methanol endet. Das Volumen der partiellen Eluentenmischungen und deren Fraktionierungen ist analog zu der oben beschriebenen Durchführung (Abb. 7). Von jeder dieser Fraktionen wird ein HPLC-UV/VIS-Profil erstellt und mit dem zugehörigen Gesamtextraktprofil verglichen. Zur zusätzlichen Kontrolle wird eine Dünnschichtchromatographie der erhaltenen Fraktionen durchgeführt.

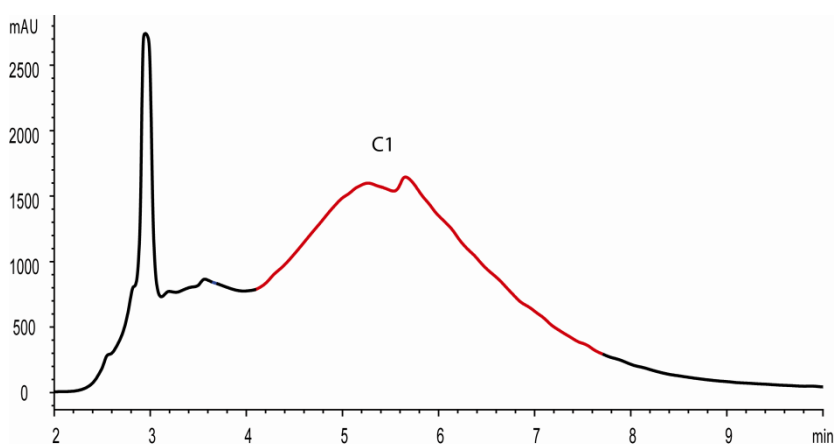


Abbildung 7: HPLC-Profil wurde mit der Eluentenmethode 1 durchgeführt. [s.o.]

Die DC und die analysierten Spektren ergeben, dass sich der Großteil der Substanzen in den Fraktionen (II₁-IV₁) befindet. Diese werden vereinigt und deren Masse (10,2 mg) bestimmt.

Tabelle 5: Volumina der einzelnen Lösungsmittel in den eingesetzten Fraktionen

Fraktionen	EtOAc [mL]	Methanol [mL]
I ₁ -I ₂	100	0
II ₁ -II ₂	100	0
III ₁ -III ₂	90	10
IV ₁ -IV ₂	80	20
V ₁ -V ₂	70	30
VI ₁ -VI ₂	60	40
VII ₁ -VII ₂	50	50
VIII ₁ -VIII ₂	40	60
IX ₁ -IX ₂	30	70
X ₁ -X ₂	20	80
XI ₁ -XI ₂	0	100

Anschließend wird die gewonnene Menge in wenig EtOAc aufgenommen und auf eine, mit EtOAc voreluierte Sephadexsäule, aufgetragen. In den HPLC-UV/VIS-Profilen der Fraktionen 2 bis 10 sind die Substanzen enthalten. Aufgrund des Vergleiches zwischen den Profilen des Gesamtextraktes und denen der Sephadexfraktionen ist zu erkennen, dass sich das Substanzgemisch mit diesen Methoden nicht trennen lässt. Zur weiteren Analyse werden die Fraktionen 2 bis 10 vereinigt und unter Vakuum bei 35°C am Rotationsverdampfer getrocknet. Eine Menge von 1,0 mg wird zur Elementaranalyse an das Institut der Physikalischen Chemie an der Universität Wien geschickt. Wie in der Tabelle 6 ersichtlich, besteht das Substanzengemisch aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff. Die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes von 34,22 w-% ergibt sich durch den fehlenden Prozentanteil der Analyse.

Tabelle 6: Ergebnis der Elementaranalyse

Probenname	w-% C	w-% H	w-% N	w-% S
<i>P. charyensis</i>	60,63	5,01	0,144	< 0,02

3.2 Bestimmung der chemischen Strukturen von isolierten Naturstoffen

3.2.1 Vorwort

Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl die selbst isolierten Naturstoffe, als auch die Naturstoffe, die von in der Arbeitsgruppe Phytochemie des Zentrums für Biodiversität, Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung an der Universität Wien aus Pflanzen der Pflanzengattung Psychotria im Zeitraum Jan. bis Okt. 2010 isoliert worden sind, bestimmt. Repräsentativ wird die Vorgehensweise hier erläutert.

3.2.2 Durchführung

Zu Beginn einer Interpretation werden die einzelnen Signale der C-Atome im ^{13}C -Spektrum durchnummeriert. Mit Hilfe der j-mod (SEFT) Aufnahmetechnik können die Signale im Spektrum in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Eine Gruppe beinhaltet die quaternären und die Methylenkohlenstoffe, die andere Methin- und Methylkohlenstoffe. Nun quantifiziert man die Signale im ^1H -Spektrum durch Integration. Da es sehr oft zu Überlagerungen der Signale im ^1H -Spektrum kommt, ist es von Vorteil, ein im Spektrum separiertes Signal für die erste quantitative Bestimmung zu verwenden. Anschließend werden den C-Atomen ihre direkt gebundenen Wasserstoffe mit Hilfe des HSQC-Spektrums zugeordnet. Da man jetzt jedem Wasserstoff seinen gebundenen Kohlenstoff zugeordnet hat, versucht man im nächsten Schritt die einzelnen gewonnenen Fragmente zusammenzufügen.

Hierfür verwendet man das 2D COSY-Spektrum. Ein guter Startpunkt im COSY-Spektrum ist ein separiert liegendes Methylensignal, da es nur zwei mögliche Bindungsstellen besitzt, an denen weitere Atome gebunden sein können. Durch die Hilfe des COSY-Spektrums bekommt man somit kleine Kettenfragmente, die für sich wiederum ein eigenes Spinsystem bilden. Wie viele Spinsysteme im Molekül vorhanden sind, wird zusätzlich mit dem TOCSY-Spektrum geprüft. Sind alle gefundenen Kettenfragmente mit den definierten Spinsystemen konsistent, kommt man zum Zusammenfügen der einzelnen Fragmente zu einem Molekül. Hierzu benötigt man das HMBC-Spektrum. Das HMBC-Spektrum zeigt im Wesentlichen $^2J_{\text{H-C}}$ - und $^3J_{\text{H-C}}$ -Kopplungen zwischen Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen. Bei ebenen und W-förmigen Bindungsanordnungen können auch $^4J_{\text{H-C}}$ -Kopplungen im HMBC-Spektrum sichtbar werden.

Somit kann man im HMBC auch Kopplungen zwischen quaternären Kohlenstoffen und weiter entfernten Wasserstoffen sehen. Diese Information ist ein wesentlicher Teil für die Verknüpfung der einzelnen Kettenfragmente miteinander. Ist das Molekül zusammengesetzt, muss man noch die relative Konformation des Moleküls bestimmen. Dazu verwendet man das NOESY-Spektrum. Zum Schluss der Interpretation erstellt man eine Tabelle der einzelnen Shift und

Kopplungswerte und versucht in Datenbanken die Struktur der interpretierten Substanz zu finden. Hat man einen Treffer gefunden, werden die Daten verglichen und analysiert. Sollte man jedoch keinen Erfolg bei der Suche gehabt haben, besteht die Annahme ein bislang nicht beschriebenes Molekül gefunden zu haben.

Die genauen Bestimmungen der einzelnen Substanzen in dieser Arbeit werden im Kapitel 4.2 dargestellt

3.3 Extraktion und partielle Reinigung von Enzymen

3.3.1 Extraktion eines Enzymgemisches aus Mandeln

3.3.1.1 Durchführung

Eine Masse von 200 g Mandeln aus einem Wiener Naturkostladen wird mit einem gewöhnlichen Handmixer bis zur Pulverform zermahlen. Dieses gewonnene Mandelmehl wird mit 600 mL Aceton und 200 mL Cyclohexan gewaschen, um vorhandene lipophile Bestandteile entfernen zu können. Der zurückbleibende unlösliche Teil wird über eine Absaugnutsche abfiltriert und unter Vakuum bei 38°C am Rotationsverdampfer getrocknet. Von dieser getrockneten Masse werden nun 10 g für die weitere Reinigung des Materials entnommen und mit 100 mL Natriumacetat-Pufferlösung (20 mM, pH 5,0) versetzt. Anschließend wird diese Lösung filtriert und das daraus gewonnene Filtrat bis zu einer 70%-igen Ammoniumsulfatlösung gesättigt. Diese Lösung mit den denaturierten Enzymen wird mit Hilfe einer Tischzentrifuge bei 4000 U/min über 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und der Bodensatz in 10 mL Natriumacetat-Pufferlösung (20 mM, pH 5.0) aufgenommen. Die Enzymlösung wird in einen semipermeablen Dialyseschlauch transferiert und über 24 h fünfmal gegen 2 L derselben Natriumacetat-Pufferlösung dialysiert. Zum Schluss wird die gepufferte Enzymlösung mit flüssigem Stickstoff gefroren und unter Vakuum lyophilisiert. Zur Aufbewahrung wird die 13,85 mg getrocknete Enzymmischung in deuteriertem Wasser gelöst und im Tiefkühler bei -20°C gelagert.²²

3.3.2 Enzym CelB

Wie in der Einleitung schon erwähnt, wird das Enzym CelB von der Arbeitsgruppe am Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik der Technischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Die Reinigung des Enzyms kann mit herkömmlichen Reinigungsmethoden bis zu einer Reinheit von 96% durchgeführt werden.

3.4 *In situ* NMR Messungen von Enzymen

3.4.1 *In situ* MNR Messungen mit dem Enzym CelB

3.4.1.1 Durchführung

Wie im Kapitel 2.5 beschrieben, benötigt man für die Bestimmung des K_m -Wertes eines Enzyms konstante Umgebungsbedingungen. Dazu gehören eine gleichbleibende Temperatur während der Reaktion, sowie konstante Startbedingungen. Zu Beginn jeder in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* NMR-Messung, wird die untersuchte Substanz Strictosidine in deuteriertem Wasser gelöst. Zur Kontrolle wird von dieser Lösung nun ein ^1H -Spektrum aufgenommen. Da isolierte Substanzen nicht 100% wasserfrei sind, gibt es bei 4,7 ppm immer ein intensives Wassersignal. Um die Intensität dieses Signals abzuschwächen, verwendet man ein NMR Pulsexperiment, welches durch eine zusätzliche Einstrahlung eines Pulses im Bereich des Wassersignals, das Wassermolekül gesättigt und somit dessen Intensität stark reduziert (Presaturation). Das aufgenommene Spektrum dient als Startpunkt der Geschwindigkeitsbestimmung, da hier noch kein Substrat umgesetzt wurde. Anschließend fügt man 30 μL einer 205 $\mu\text{g/mL}$ CelB-Enzymlösung bei (Tabelle 7). Hierbei ist darauf zu achten, dass sich bei der Zugabe des Enzyms kein Schaum bildet. Nach der Verabreichung des Enzyms muss die Probe wieder neu geshimt werden. Das dafür notwendige nicht zu verhindernde kleine Zeitfenster stellt keine Komplikation dar, da die vollständige enzymkatalysierte Hydrolyse des Strictosidines unter diesen Bedingungen mehrere Stunden benötigt. Nun wird ein weiteres ^1H -Spektrum mit einer Wasserunterdrückung erstellt, um zu untersuchen, wie stark sich die Peaks durch das Hinzufügen des Enzyms verändert haben. Zum Schluss stellt man die Periode der zu messenden ^1H -Spektren so ein, dass die Umsetzung während der Kinetikmessung mit 32 bis 64 Einzelmessungen vollständig abgelaufen ist.

Tabelle 7: Analytische Daten der *in situ* NMR basierte Untersuchung der Michaelis-Menten Kinetik

Substanz	Konzentration [mM/mol]	Enzym [μL]
Strictosidine	1,62	30
Strictosidine	2,69	30
Strictosidine	5,39	30
Strictosidine	10,78	30
Strictosidine	21,55	30

Tabelle 8: Analytische Daten der mit in situ NMR untersuchten Umsetzungen

Substanz	Konzentration [mM/mol]	Enzym [μL]
Strictosidine	2,69	10
Cellobiose	8,35	10

3.4.2 In situ MNR Messungen mit der Mandelglucosidase

3.4.2.1 Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit werden Kinetikuntersuchungen der Substanzen Strictosidine sowie Cellobiose mit der isolierten Mandelglucosidase durchgeführt. Die Vorgehensweise ist analog der im Kapitel 3.4.1.1 beschriebenen Durchführung.

Tabelle 9: Analytische Daten der mit in situ NMR untersuchten Umsetzungen

Substanz	Konzentration [mM/mol]	Enzym [mg]
Strictosidine	2,69	4,50
Cellobiose	20	10,00

Die genauen Ergebnisse dieser Messungen werden im Kapitel 4.3 dargestellt.

3.5 STD-Messungen

3.5.1 STD-Messungen mit CelB

3.5.1.1 Durchführung

In dieser Arbeit werden von den Bindungen der Substanzen Strictosidine, Glucose und Cellobiose an das Enzym CelB STD NMR-Messungen durchgeführt. Jede dieser Substanzen wird in deuteriertem Wasser gelöst. Zur Kontrolle der Lösungen wird ein einfaches ^1H -Spektrum der Lösungen aufgenommen. Wie bei den *in situ* NMR Messungen, wird von jeder Substanz ein Spektrum mit einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Nun wird jeder Lösung ein Volumen von 10 μL bzw. 20 μL einer 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CelB-Enzymlösung beigelegt. Da sich die Konzentration der Ausgangslösungen verändert, muss der Magnet wieder neu adaptiert werden. Anschließend wird zur Kontrolle wiederum ein ^1H -Spektrum mit einer Wasserunterdrückung durchgeführt. Zum Schluss wird, wie im Kapitel 2.4 besprochen, die STD-Messung durchgeführt.^{27,28}

Tabelle 10: Analytische Daten der STD-Messungen

Substanz	Konzentration [mM/mol]	Enzym [μL]
Strictosidine	2,69	10
Cellobiose	11,28	20
β -D-Glucopyranose	18,24	10

Die erhaltenen Spektren werden im Kapitel 4.4 dargestellt und interpretiert.

3.6 Dockingsimulation

3.6.1 Dockingsimulation von Strictosidine mit CelB

3.6.1.1 Durchführung

Um eine Dockingsimulation durchführen zu können, benötigt man eine gute Strukturbestimmung des Liganden sowie des verwendeten Proteins. Hierbei können die Strukturen durch Röntgen- oder durch NMR-Strukturanalyse vorgegeben werden. Die Suche nach der gewünschten Proteinstruktur erfolgt in frei zugänglichen Datenbanken. Für das in dieser Arbeit verwendete tetramere Enzym CelB kann keine vollständige Struktur gefunden werden. In der Datenbank Pubmed findet man die Sequenz einer monomeren Einheit des Enzyms.⁵¹ Diese Sequenz wird in das Programm Swiss-Viewer^{24 25 26} importiert und in den verschiedenen Datenbanken hinsichtlich möglicher passender Homologe analysiert. Das Programm schlägt das Enzym 1QVB vor, welches mit einer Übereinstimmung von 60% zur Sequenz der monomeren Einheit sowie einer atomaren Auflösung von 2.4 Å, für weitere Zwecke verwendet werden kann. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine β -Glucosidase aus der gleichen Familie kommend wie das Enzym CelB. Es wurde erstmals aus der thermophilen Bakterium *Thermosphaera aggregans* isoliert.⁵² Ihr aktives Zentrum wird ebenfalls durch eine $(\alpha\beta)_8$ barrel Struktur aufgebaut. Sind keine sichtbaren Fehler bei der Analyse erkennbar, wird das gefundene Homologe in das Programm MOE importiert. Zu Beginn wird eine Konformation des Enzyms mit dem Programm MOE berechnet, welche die niedrigste Gesamtenergie besitzt. Nun werden die zehn Konformere des Liganden mit den niedrigsten Energien ermittelt. Da aufgrund der Literatur das aktive Zentrum des Enzyms bekannt ist, werden die Aminosäuren, die für die Reaktion eine tragende Rolle spielen, im Rezeptor markiert. Durch die Kennzeichnung dieser Sequenzen gibt man die Lage des Liganden im Enzym bei der Dockingsimulation vor. Anschließend führt man die Dockingsimulationen durch und die besten fünf Ergebnisse werden analysiert und archiviert. Diese gewonnenen Resultate werden nun ins Programm Glide importiert und jedes Ergebnis für sich neu berechnet. Der wesentliche Unterschied zwischen Glide- und MOE-Programm liegt in der Möglichkeit, dass sich das Protein während der Simulation an den Liganden anpassen kann, um so mögliche Überlappungen zwischen Liganden und Rezeptor vermeiden zu können.⁵⁰ Aufgrund dieser Zusatzfunktion, ist das Ergebnis des Glide-Programmes dem des MOE-Programmes vorzuziehen.^{49,50}

Die gewonnen Ergebnisse werden im Kapitel 4.5 dargestellt und interpretiert.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Strukturbestimmung von den isolierten Substanzen

4.1.1 Isolation und Bestimmung der Substanz S1

Pflanze: *Psychotria elata*

Strukturname: Strictosidine^{53,54}

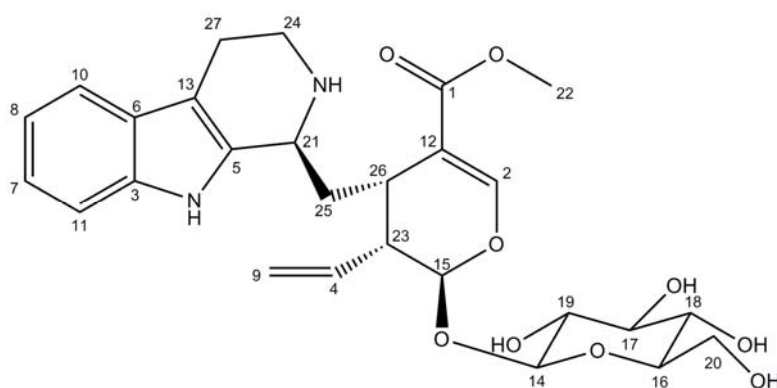
Molekulargewicht: 530,23 g/mol

Summenformel: C₂₇H₃₄N₂O₉

Retentionzeit (Methode 2): 9,941 min

Masse (ESI, pos mod): 531,1 g/mol [M+H]⁺

Struktur:



4.1.1.1 Bestimmung der Substanz S1

In den NMR-Spektren dieses Moleküls sind vier Teilstücke des Moleküls signifikant. Bei diesen Fragmenten handelt es sich wie folgt um einen Zuckerteil, ein Aromatensystem, einen aliphatischen Heterozyklus sowie ein aliphatisches Verbindungsstück. Der Zuckerteil kann als β-D-Glucopyranose interpretiert werden. Beim Aromatensystem handelt es sich um ein Indolgerüst, welches am heteroaromatischen Ring zweifach an den Kohlenstoffen substituiert ist. Der aliphatische Heterozyklus kann als Secologanin-derivat beschrieben werden, während das Verbindungsstück eine CH₂-Gruppe ist, welche das aromatische System mit dem Secologanin-derivat verknüpft. Die Struktur der Substanz S1 kann somit mit Hilfe der NMR und einem Literaturvergleich^{53,54} bestimmt werden. In der Abbildung 8 ist das HPLC-Spektrum der gereinigten Substanz S1 dargestellt. Die Abbildung 9 zeigt das dazugehörige UV/VIS –Spektrum mit dem signifikanten Indolchromophor.

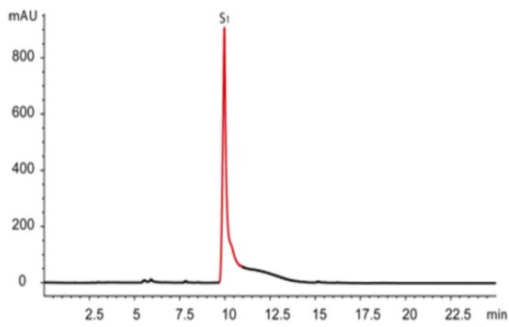


Abbildung 8: HPLC-Profil der gereinigten Substanz S1.

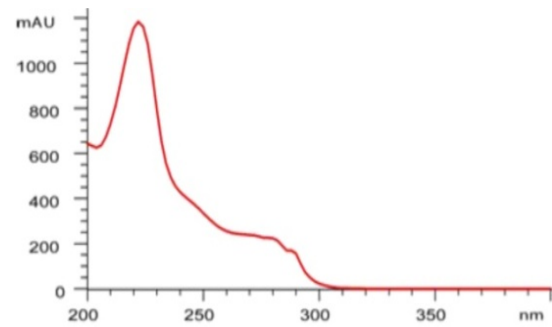


Abbildung 9: UV/Vis -Spektrum der gereinigten Substanz S1 (Aufnahme bei 230nm).

4.1.1.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Im Massenspektrum (ESI, positiver Modus, Abb. 10) erkennt man recht deutlich, dass das Hauptsignal bei einer Masse von 531,1 g/mol liegt und somit in der Form eines $[M+H]^+$ -Ions vorliegt.

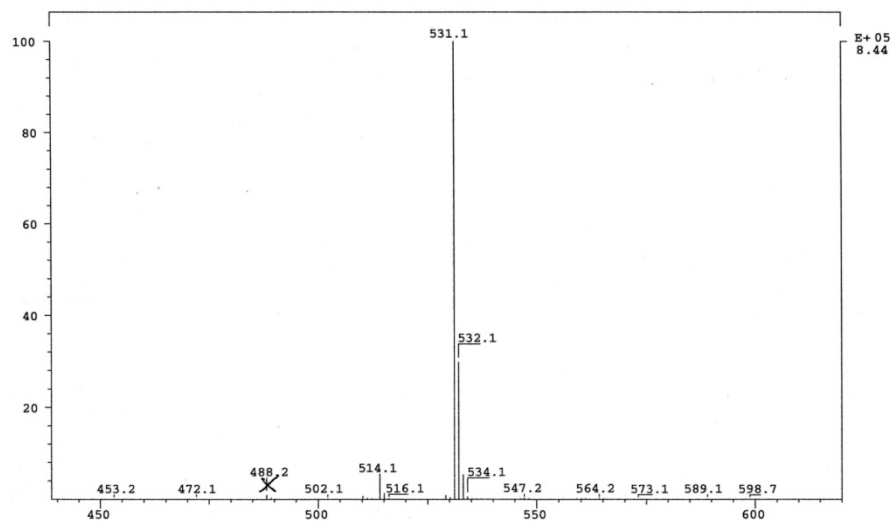


Abbildung 10: Massenspektrum von der Substanz S1.

Tabelle 11: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			172,12
2	7,82	s		157,74
3	-			138,71
4	5,89	m	10,96 7,36	136,26
5	-			131,01
6	-			128,38
7	7,18	t	8,01	124,38
8	7,08	t	8,30	121,49
9	5,39 5,32	d	17,23 10,67	120,69
10	7,51	d	7,92	119,97
11	7,36	d	8,25	113,14
12	-			109,83
13	-			108,01
14	4,82		7,99	101,28
15	5,89	d	8,91	98,20
16	3,43			79,64
17	3,44			78,87
18	3,27			75,54
19	3,27			72,61
20	4,00 3,69			63,83
21	4,71	d	10,61	53,97
22	3,84	s		53,45
23	2,78	m	5,03 2,89	46,28
24	3,78 3,50			43,54
25	2,39 2,26	dd	11,96 2,95	35,37
26	3,15			33,33
27	3,10			20,41

4.1.2 Isolation und Bestimmung eines Gemisches bestehend aus den Substanzen Z1/ Z2

Pflanze: *Psychotria elata*

Strukturnamen:

Substanz Z1: 5-*p-cis*-Coumaroylquinic acid^{55,56,57}

Substanz Z2: 3-*p-trans*-Coumaroylquinic acid^{55 56 57}

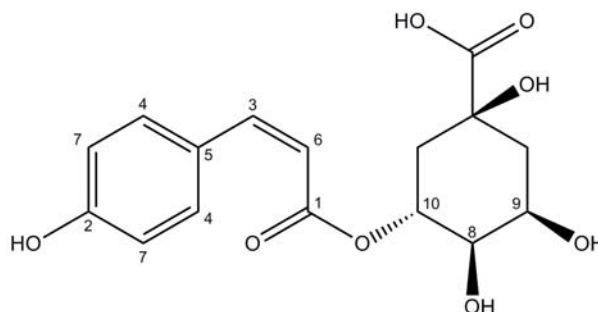
Molekulargewicht: 338,10 g/mol

Summenformel: C₁₆H₁₈O₈

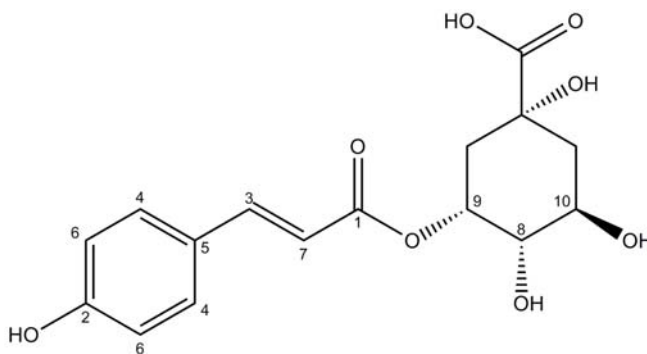
Retentionzeit (Methode 2): 2,898 min

Masse (ESI, neg mod): 337,0 g/mol [M-H]⁻

Struktur Z1:



Struktur Z2:



4.1.2.1 Bestimmung der Substanzen Z1/Z2

Bei der Interpretation der Probe erkennt man recht deutlich, dass die beiden Substanzen in einem Verhältnis von 3:2 vorliegen. In weiterer Folge ist durch einen Vergleich der Shift-Werte ersichtlich, dass es sich um sehr ähnliche Substanzen handelt.^{55 56 57} Im HSQC-Spektrum sind nicht alle Kohlenstoffatome den entsprechenden Wasserstoffatomen zuordenbar. Außerdem kommt es im Bereich zwischen 1,9 bis 2,3 ppm zu starken Überlappungen der ¹H-Signale. Eine Verbreiterung

der Signale deutet auf eine starke Beweglichkeit des Moleküls im Bereich der Koaleszenz hin. Bei der Bestimmung der Moleküle erkennt man jedoch zwei wesentliche Fragmente.

Während der eine Molekülteil aus einem aromatischen System besteht, kann der andere als ein zuckerähnliches Fragment interpretiert werden. Das Problem am zuckerähnlichen Fragment liegt darin, dass man nur einen Teil davon bestimmen kann. Der schlecht interpretierbare Teil dieses Molekülstückes bewegt sich in der Nähe der Koaleszenz. Dies führt zu der oben erwähnten starken Verbreiterung der Signale. Durch Literaturrecherche und einen Shift-Vergleich zeigt es sich, dass es sich bei diesem Fragmentstück um eine Chinasäure handelt.^{55 56 57} Das aromatische System kann zum Einem als *para*-hydroxy substituierte *trans*-Zimtsäure und zum Anderem als korrespondierendes *cis*-Konformer verifiziert werden.^{55 56 57} Im HMBC-Spektrum kann die Veresterung zwischen der Carboxyleinheit der Zimtsäure und einer Hydroxygruppe der Chinasäure verifiziert werden. Die unterschiedliche Stereoisomerie der beiden Substanzen kann mit dem NOE-Spektrum bestimmt werden. In den Abbildungen 11 und 12 ist analog zur Substanz S1 das gereinigte Gemisch und ihr dazugehöriges UV/VIS-Spektrum dargestellt.

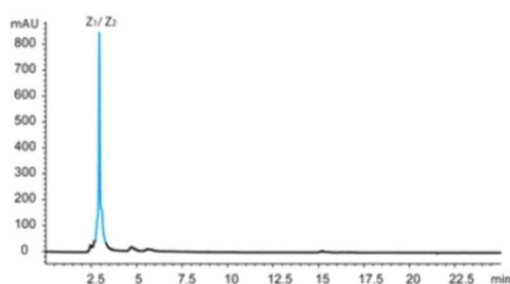


Abbildung 11: HPLC-Profil der gereinigten Substanz S1.

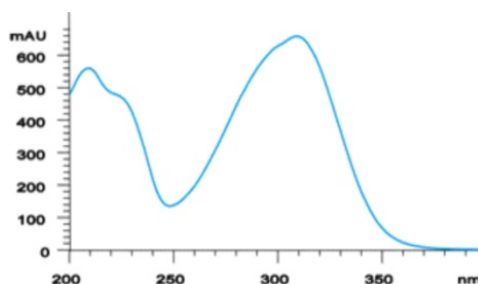


Abbildung 12: UV/Vis -Spektrum der gereinigten Substanz S1 (Aufnahme bei 230nm).

4.1.2.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie

Im Massenspektrum (ESI, neg mod, Abb. 13) des Substanzengemisches gibt es nur einen signifikanten Peak, welcher bei 337,0 g/mol liegt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die beiden Substanzen zwar die gleiche Masse, jedoch eine andere Konfiguration aufweisen

ESI (neg mod): m/z (%): 337,0 [M-H]⁻ (100)

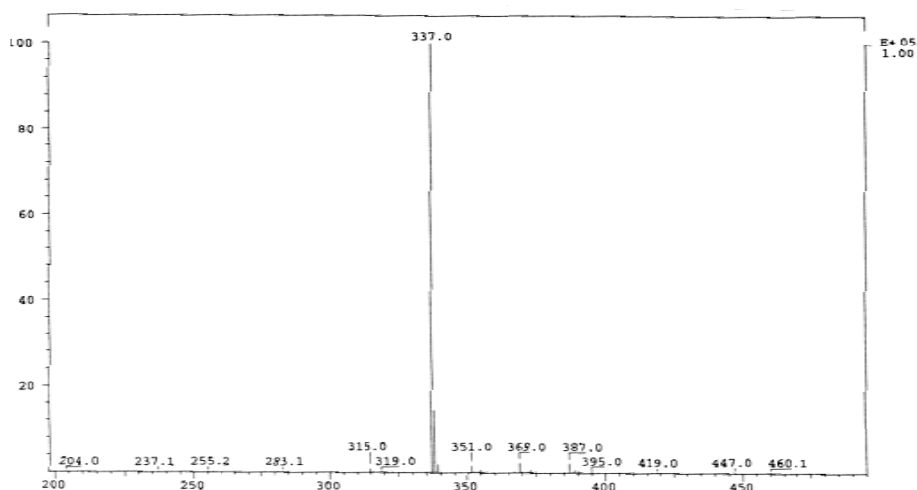


Abbildung 13: Massenspektrum des Substanzengemisches Z1/Z2.

Tabelle 12: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten der Substanz Z1

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			168,71
2	-			160,88
3	6,87	d	12,84	145,67
4	7,73	d	8,58	134,76
5	-			128,56
6	5,86	d	12,84	118,12
7	6,40	d	8,58	116,88
8	3,69			75,17
9	5,38			73,17
10	4,16			69,22

Tabelle 13: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten der Substanz Z2

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			169,91
2	-			161,95
3	7,68	d	15,90	145,67
4	7,49	d	8,46	132,07
5	-			128,25
6	6,84	d	8,46	117,59
7	6,40	d	15,90	116,74
8	3,69			75,17
9	5,38			73,71
10	4,16			69,22

4.1.3 Isolation und Bestimmung der Substanz A1

Pflanze: *Psychotria elata*

Retentionzeit (Methode 2): 9,715 min (Abb. 14; UV-Vis: Abb. 15)

Isolierte Menge: 1,3 mg

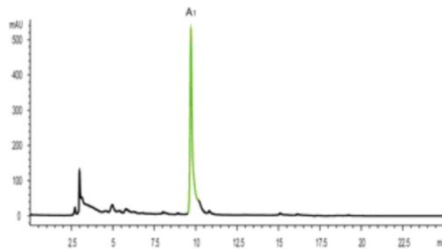


Abbildung 14: HPLC-Profil der gereinigten Substanz A1.

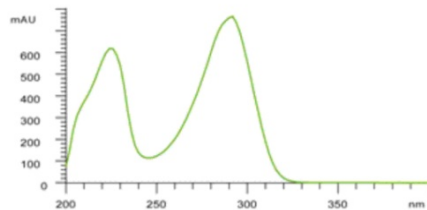


Abbildung 15: UV/Vis -Spektrum der gereinigten Substanz A1 (Aufnahme bei 230nm).

4.1.3.1 Bestimmung der Substanzen A1

Aufgrund der geringen Menge und der Verunreinigungen konnte keine Strukturanalyse mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden durchgeführt werden.

4.1.4 Isolation und Bestimmung der Substanz S2

Pflanze: *Psychotria elata*

Retentionzeit (Methode 2): 10,806 min (Abb. 16; UV-Vis: Abb. 17)

Isolierte Menge: 0,5 mg

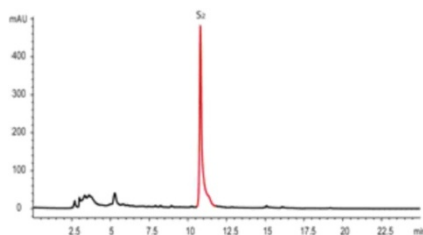


Abbildung 16: HPLC-Profil der gereinigten Substanz S2.

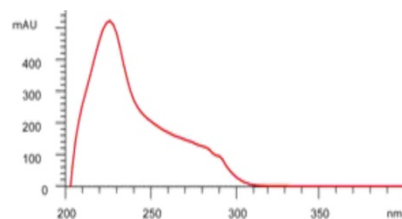


Abbildung 17: UV/Vis -Spektrum der gereinigten Substanz S2 (Aufnahme bei 230nm).

4.1.4.1 Bestimmung der Substanz S2

Aufgrund der geringen Menge und der Verunreinigungen konnte keine Strukturanalyse mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden durchgeführt werden. Es handelt sich jedoch vermutlich um ein Derivat des Strictosidines.

4.2 Strukturbestimmung der Substanzen aus der Pflanzengattung *Psychotria*. L

4.2.1 Strukturbestimmung der Substanz S3

Pflanze: *Carapichea offinis*

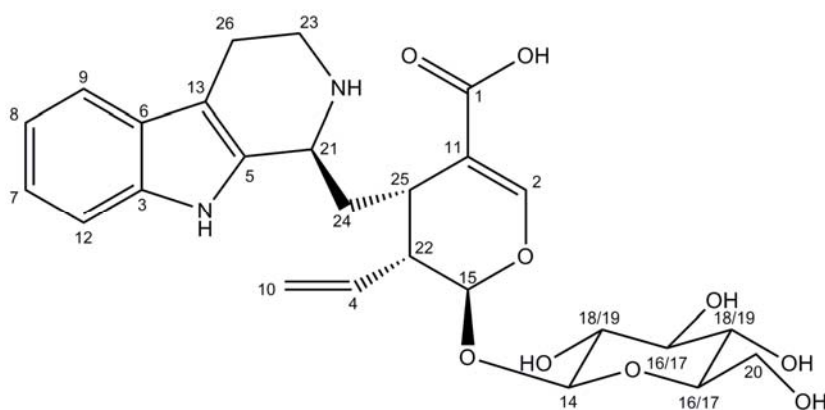
Strukturname: Strictosidin acid⁵⁸

Molekulargewicht: 516,21 g/mol

Summenformel: C₂₆H₃₂N₂O₉

Masse (ESI, pos mod): 517,1 g/mol [M+H]⁺

Struktur:



4.2.1.1 Bestimmung der Substanz S3:

Das Spektrum dieser Substanz ist analog zu dem der Substanz S1. Der einzige Unterschied liegt im fehlenden Methylestersignal.⁵⁸

4.2.1.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Das Ergebnis der Massenspektrometrie zeigt ein Hauptsignal bei 517,1 g/mol.

ESI (pos mod): m/z (%): 517,1 [M+H]⁺ (100)

Tabelle 14: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten:

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			-
2	7,60	s		154,2
3	-			139,08
4	5,89	m	7,24 2,92	137,13
5	-			131,4
6	-			128,42
7	7,16	t	7,27	124,21
8	7,07	t	7,43	121,4
9	7,49	d	7,76	119,94
10	5,35 5,24	d	17,40 5,24	119,72
11	-			114,41
12	7,13	d	8,12	113,07
13	-			108,16
14	4,48			101,24
15	5,86			97,46
16	3,42			79,61
17	3,45			78,87
18	3,26			75,61
19	3,29			72,69
20	4,05 3,72	d	11,74	64,00
21	4,48	d	11,90	53,19
22	2,74			46,59
23	3,76			43,89
24	2,41 2,16			36,00
25	3,02			34,93
26	3,07			20,47

4.2.2 Strukturbestimmung der Substanz S4:

Pflanze: *Carapichea offinis*

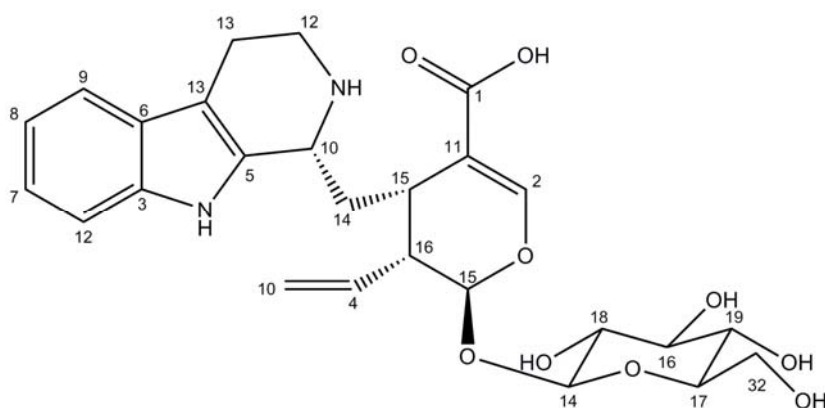
Strukturname: *epi*-Strictosidinic acid⁵⁹

Molekulargewicht: 516,21 g/mol

Summenformel: C₂₆H₃₂N₂O₉

Masse (ESI, pos mod): 517,2 g/mol [M+H]⁺

Struktur:



4.2.2.1 Bestimmung der Substanz S4

Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Stereoisomer der Substanz S3. Die auffallenden Veränderungen der Shift-Werte im Spektrum kommen nur aufgrund der räumlichen Veränderungen spezifischer stereogener Molekülteile zustande.⁵⁹

4.2.2.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Analog zum Ergebnis der Massenspektrometrie der Substanz S3 zeigt das Massenspektrum dieser Substanz ein Hauptsignal bei 517,2 g/mol.

ESI (pos mod): m/z (%) 517,2 [M+H]⁺ (100)

Tabelle 15: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten:

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			177,10
2	7,36	s		150,70
3	-			138,71
4	5,92	m	9,61 8,08	137,98
5	-			131,31
6	-			128,38
7	7,04	t	8,19	122,62
8	6,97	t	7,89	119,44
9	7,38	d	7,72	119,30
10	5,31 5,20	d	17,23 10,67	119,22
11	-			118,00
12	7,29	d	7,93	111,79
13	-			109,01
14	4,82		7,82	101,11
15	5,75	d	8,56	97,75
16	3,39			79,46
17	3,43			78,79
18	3,25			75,00
19	3,30			72,59
20	3,99 3,73	d	11,88	63,83
21	4,12			53,04
22	2,70			47,36
23	3,36 2,97			44,97
24	2,11 1,92			38,41
25	3,16	m	5,42 4,89	34,73
26	2,71	m	13,63 3,52	23,30

4.2.3 Strukturbestimmung der Substanz S5

Pflanze: *Psychotria racemosa*

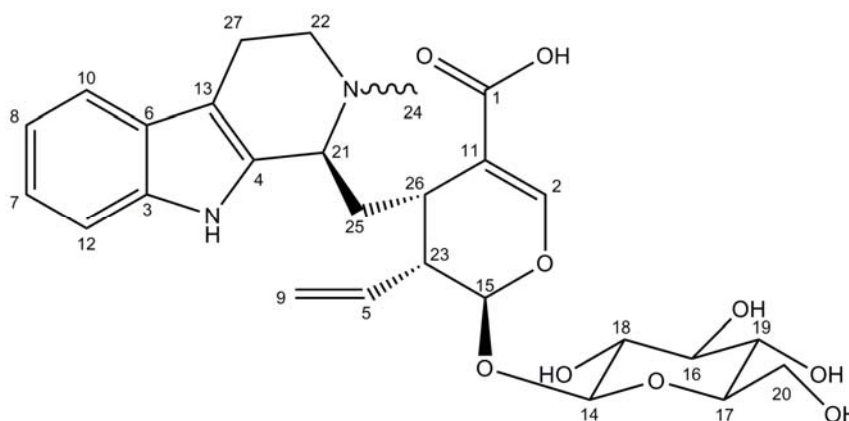
Strukturname: Palicoside⁵³

Molekulargewicht: 544,24 g/mol

Summenformel: C₂₈H₃₆N₂O₉

Masse (ESI, pos mod): 531,2 g/mol [M-CH₂]⁺

Struktur:



4.2.3.1 Bestimmung der Substanz S5

Durch den Datenvergleich zwischen den Substanzen S3 und S4 geht hervor, dass es sich um ein substituiertes Derivat von Strictosidinic acid handelt. Da es zu keinen größeren Verschiebungsänderungen in den Shift-Bereichen gekommen ist, ist die Annahme groß, dass die im ¹³C-Spektrum nicht detektierbare Methylgruppe mit dem sekundären Stickstoff verbunden ist. Der Grund für das Fehlen des Signals kann durch das Phänomen der Koaleszenz erklärt werden. In unserem Fall ist die Koaleszenztemperatur gerade so groß, dass das Durchschwingen der Methylgruppe am Stickstoff dieses Phänomen der Signalverbreiterung hervorruft.⁵³

4.2.3.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

ESI (pos mod): m/z (%) 531,2 [M-CH₂]⁺ (100)

Tabelle 16: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			177,65
2	6,99	s		154,74
3	-			138,86
4	-			137,81
5	5,09	m	9,91 7,29	137,32
6	-			129,19
7	7,05	t	7,37	122,60
8	6,97	t	7,17	120,50
9	5,33 5,27	d	17,26 10,34	120,43
10	7,39	d	3,63	119,23
11	-			116,02
12	7,37	d	3,92	112,99
13	-			107,63
14	4,71	d	7,93	100,78
15	5,42	d	4,14	98,39
16	3,35			79,14
17	3,39			78,59
18	3,30	d	8,00	75,62
19	3,35			72,52
20	3,798 3,71			63,64
21	3,93			61,31
22	3,38	s		50,68
23	2,92			47,08
24	2,47			42,62
25	2,08 1,94			35,40
26	3,23			32,96
27	2,86 2,72			20,96

4.2.4 Strukturbestimmung der Substanz S6

Pflanze: *Psychotria suerrensis*

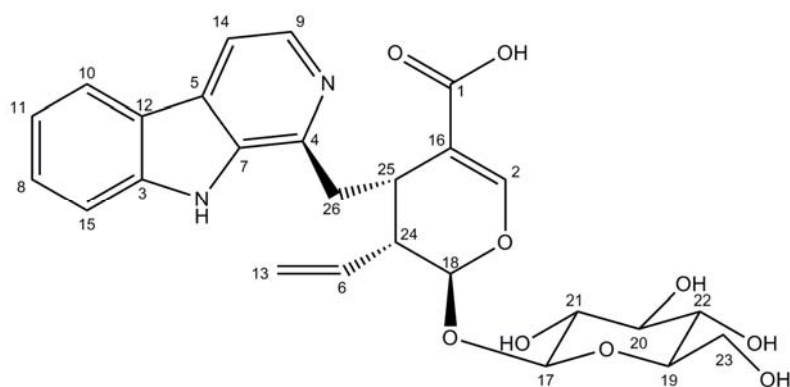
Strukturname: Lyalosidic acid⁵⁴

Molekulargewicht: 512,51 g/mol

Summenformel: C₂₆H₂₈N₂O₉

Masse (ESI, pos mod): 513,3 g/mol [M+H]⁺

Struktur:



4.2.4.1 Bestimmung der Substanz S6

Aufgrund des Spektrenvergleiches mit der Substanz S1 kann man vermehrte Signale im aromatischen System identifizieren. Mit Hilfe des HMBC-Spektrums erkennt man, dass das Piperidin-ähnliche Fragment zu einem aromatischen System verändert ist.⁵⁴

4.2.4.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

ESI (pos mod): m/z (%) 513,3 [M+H]⁺ (100), 514,3 [M+2H]⁺⁺ (22)

Tabelle 17: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			171,66
2	7,57	s		157,24
3	-			146,92
4	-			142,92
5	-			137,62
6	5,91	m	17,25 8,72	136,49
7	-			136,27
8	7,72	dd	8,84	134,56
9	8,27	d	5,61	131,36
10	8,23	d	5,52	125,70
11	7,37	dd	8,19	124,50
12	-			123,07
13	5,20			121,90
14	8,29		8,99	118,15
15	7,58			115,41
16	-			110,86
17	4,83			101,96
18	5,75	d	7,24	98,68
19	3,40			79,38
20	3,42			78,38
21	3,45			74,32
22	3,30			72,52
23	3,78 3,69			63,77
24	2,74			46,87
25	3,66			37,41
26	3,28			34,82

4.2.5 Strukturbestimmung der Substanz S7

Pflanze: *Psychotria suerrensis*

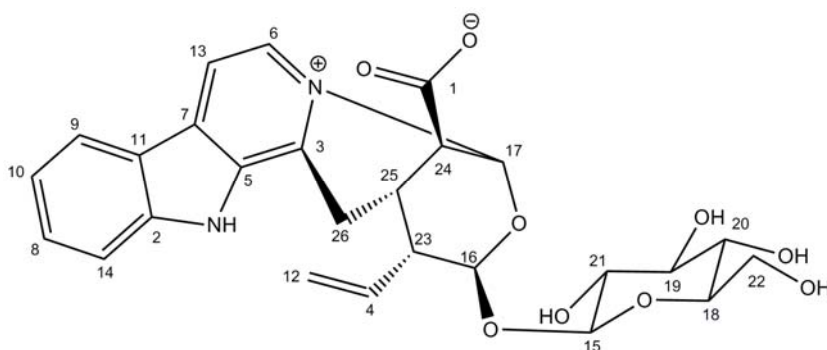
Strukturname: Ophirine A⁶⁰

Molekulargewicht: 512,51 g/mol

Summenformel: C₂₆H₂₈N₂O₉

Masse (ESI, pos mod): 513,3 g/mol [M+H]⁺

Struktur:



4.2.5.1 Bestimmung der Substanz S7

Vergleicht man die Spektren mit denen der Substanz S6 so sieht man, dass auch hier das Zwischenstück zu einem aromatischen System geworden ist. Weiters erkennt man, dass der Stickstoff im Zwischenstück mit einem Teil des Secologanin-derivates verbunden ist. Dieser positiv geladene quaternäre Stickstoff erklärt auch dass die Carboxyleinheit des Secologanin-derivates als Carboxylat vorliegt.⁶⁰

4.2.5.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Das Ergebnis des Massenspektrums zeigt Fragmentierungsprodukte der Substanz. Der Hauptpeak befindet sich bei 513,3 g/mol (Abb. 18).

ESI (pos mod): m/z (%): 535,3 [M+Na]⁺ (35), 513,3 [M+H]⁺ (100)

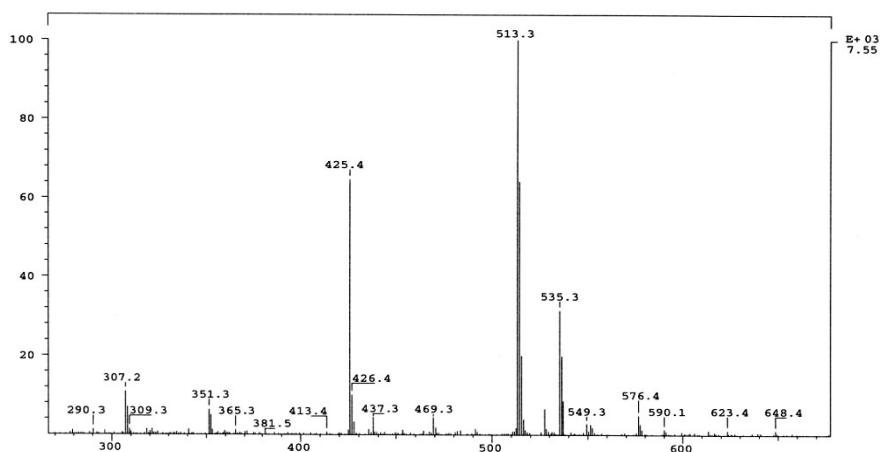


Abbildung 18: Massenspektrum von der Substanz S7.

Tabelle 18: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			175,22
2	-			146,67
3	-			140,75
4	5,93	m 11,54	5,47	137,14
5	-			135,80
6	8,57			135,54
7	-			134,55
8	7,79	d	5,43	134,08
9	8,39	d	8,22	125,17
10	7,46			124,10
11	-			122,24
12	5,32	d d 18,32	10,55	119,85
13	8,58			118,28
14	7,78			114,78
15	4,38	d	8,08	101,22
16	4,86			96,89
17	6,76			91,72
18	3,00			79,00
19	3,28			78,72
20	3,13			75,48
21	3,11			72,47
22	3,59 3,37	d	11,51	63,46
23	2,91			49,80
24	3,46			48,60
25	3,26			32,71
26	3,78			25,03

4.2.6 Strukturbestimmung der Substanz D1

Pflanze: *Carapichea offinis*

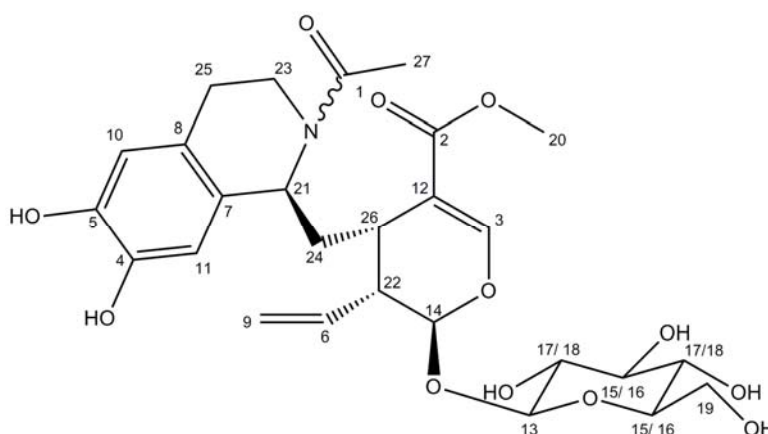
Strukturname: Ipecoside⁶¹

Molekulargewicht: 565,22 g/mol

Summenformel: C₂₇H₃₅NO₁₂

Masse (ESI, pos mod): 588,3 g/mol [M+Na]⁺

Struktur:



4.2.6.1 Bestimmung der Substanz D1

Bei der Interpretation dieser Substanz zeigt sich, dass es zu einer Veränderung im aromatischen System und im Verknüpfungsbereich gekommen ist. Im Benzolring kommt es aufgrund der zweifachen Substitution von Hydroxygruppen zu Verschiebungen der ¹³C-Shifts. Wo sich die beiden Hydroxygruppen befinden, sieht man durch ³J_{H-C}-Kopplungen im HMBC-Spektrum. Die Veränderung des Verknüpfungsbereichs erkennt man aufgrund der verringerten Zahl an Kohlenstoffatomen und der neu gewonnenen ³J_{H-C}-Kopplungen im HMBC-Spektrum.

Für die Bestimmung der Stereoisomerie der Substanz D1 werden die gewonnenen Daten mit denen der Substanz S3 sowie der Substanz S4 verglichen. Hierbei zeigt sich, dass eine deutliche Übereinstimmung mit der Substanz vorhanden ist. Für die Verifizierung dieser Struktur wurden die Signale noch mit den Daten aus der Publikation⁶¹ verglichen. Beide Datensätze stimmen mit einer sehr kleinen Varianz gut überein.

4.2.6.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

ESI (pos mod): m/z (%): 588,3 [M+Na]⁺ (100), 566,3 [M+H]⁺ (52),

Tabelle 19: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			173,20
2	-			170,20
3	7,42	s		153,64
4	-			146,00
5	-			145,60
6	5,80	m	10,96 7,36	135,70
7	-			130,86
8	-			125,98
9	5,51 5,41	d	17,26 10,34	121,08
10	6,54	s		116,93
11	6,48	s		115,08
12	-			112,48
13	4,62	d	7,88	101,12
14	5,41			99,36
15	3,29			78,93
16	3,29			78,82
17	3,17			75,42
18	3,30			72,06
19	3,90 3,66			63,30
20	3,66	s		52,40
21	3,66			50,99
22	3,30			45,62
23	3,93 3,64			41,75
24	2,49 1,52		12,48 3,38	36,63
25	2,63 2,87			29,82
26	2,72			28,00
27	2,19	s		22,20

4.2.7 Strukturbestimmung der Substanz D2

Pflanze: *Carapichea offinis*

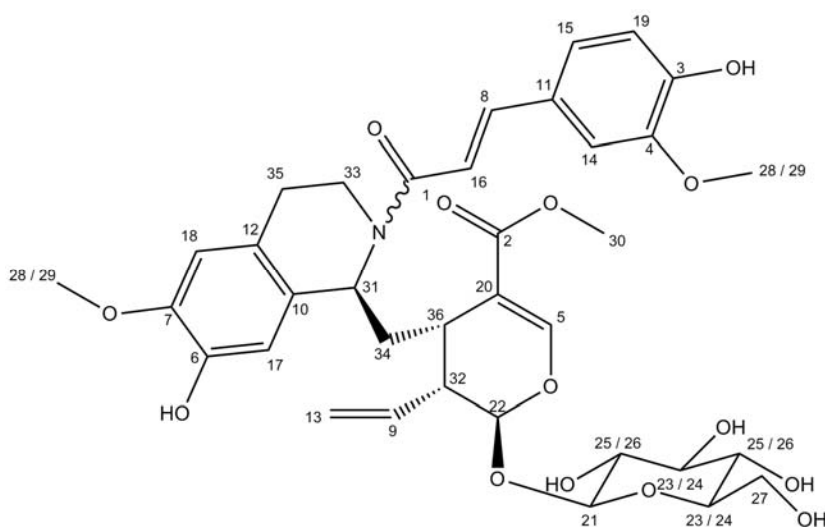
Strukturname: 6-O-Methyl-*trans*-cephaeloside⁶²

Molekulargewicht: 713,27 g/mol

Summenformel: C₃₆H₄₃NO₁₄

Masse (ESI, pos mod): 736,2 g/mol [M+Na]⁺

Struktur:



4.2.7.1 Bestimmung der Substanz D2

Durch den direkten Vergleich mit der Substanz D1 ist zu erkennen, dass sich das Molekül nur im Bereich des Säurerestes der Amidbindung verändert. Das Substitutionsfragment kann als eine zweifach hydroxylierte Zimtsäure interpretiert werden, wobei die Hydroxygruppe in *meta*-Position zum Alken-Substituenten methoxyliert ist.⁶²

4.2.7.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Auch in diesem Massenspektrum zeigen sich Fragmentierungen der Substanz
ESI (pos mod): m/z (%): 736,2 [M+Na]⁺ (100), 714,2 [M+H]⁺ (20),

Tabelle 20: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	$J[\text{Hz}]$	^{13}C [ppm]
1	-			170,17
2	-			170,04
3	-			154,09
4	-			154,09
5	7,38	s		153,81
6	-			149,44
7	-			148,54
8	7,45	d	16,09	146,40
9	5,75 5,82			136,74
10	-			132,62
11	-			130,65
12	-			125,10
13	5,59 5,45			121,82
14	6,83	s		120,77
15	7,06	d	15,48	116,39
16	6,98 / 6,48	d	16,09	115,67
17	6,98 / 6,48	s		115,57
18	6,61	s		113,58
19	6,85	d	15,48	112,69
20	-			112,59
21	-			101,40
22	4,61	d	8,11	99,64
23	5,46			79,07
24	3,29			78,94
25	3,13			75,46
26	2,29			72,31
27	3,88 3,66			63,58
28	3,84	s		57,14
29	3,80	s		56,85
30	3,66	s		52,49
31	5,70			51,67
32	3,32			45,71
33	4,30 3,73			41,24
34	1,57 2,60			36,75
35	2,73 2,88			30,80
36	2,79			28,21

4.2.8 Strukturbestimmung der Substanz D3

Pflanze: *Carapichea offinis*

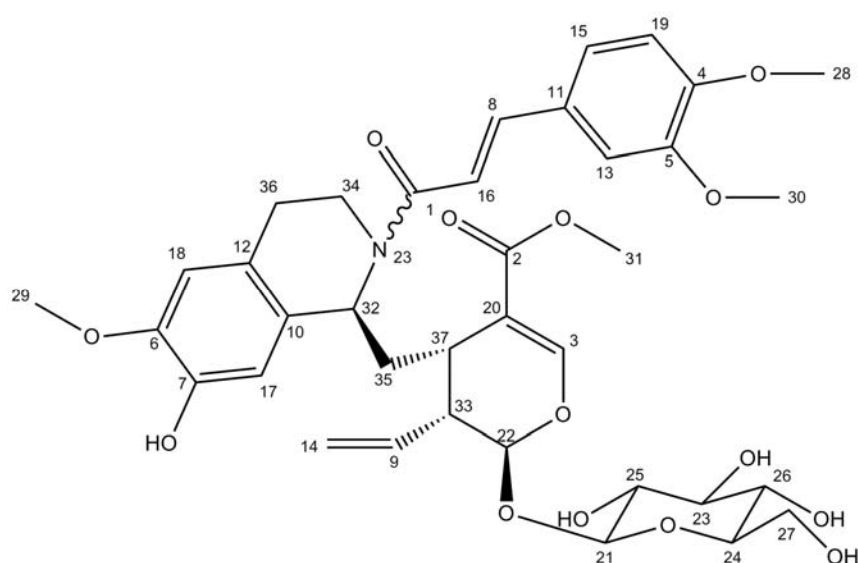
Strukturname: Borucoside⁶³

Molekulargewicht: 727,75 g/mol

Summenformel: C₃₇H₄₅NO₁₄

Masse (ESI, pos mod): 750,2 g/mol [M+Na]⁺

Struktur:



4.2.8.1 Bestimmung der Substanz D3

Die Spektren dieser Substanz entsprechen denen der Substanz D2, mit dem einzigen Unterschied, dass auch die zweite Hydroxygruppe der substituierten Zimtsäure methoxyliert ist.⁶³

4.2.8.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Das Hauptsignal der MS-Aufnahme zeigt sich bei 750,2 g/mol. Wie in den vorigen Spektren gibt es auch hier leichte Fargmentierungsprodukte.

ESI (pos mod): m/z (%): 750,2 [M+Na]⁺ (100), 728,2 [M+H]⁺ (28),

Tabelle 21: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	$J[\text{Hz}]$	^{13}C [ppm]
1	-			169,23
2	-			168,99
3	7,40	s		153,01
4	-			152,26
5	-			150,80
6	-			148,58
7	-			147,47
8	7,55	d	15,44	144,28
9	5,75			135,92
10	-			131,62
11	-			129,84
12	-			124,40
13	7,22	d	8,32	123,47
14	5,63 5,46	d d	15,49 10,28	120,48
15	7,16	d	15,4	116,62
16	6,98			116,50
17	6,48	s		114,56
18	6,62	s		112,75
19	7,29	s		111,77
20	-			111,64
21	4,62	d	7,83	100,51
22	5,43	d	3	98,85
23	3,28			78,21
24	3,28			78,05
25	3,11			74,70
26	3,11			71,38
27	3,87 3,67			62,64
28	3,89	s		56,66
29	3,86	s		56,45
30	3,79	s		56,34
31	3,66	s		51,65
32	5,71			50,90
33	3,31			45,03
34	4,34 3,75			40,55
35	2,59			35,89
36	2,91 2,79			29,99
37	2,77			27,30

4.2.9 Strukturbestimmung der Substanz I1

Pflanze: *Psychotria poeppigiana*

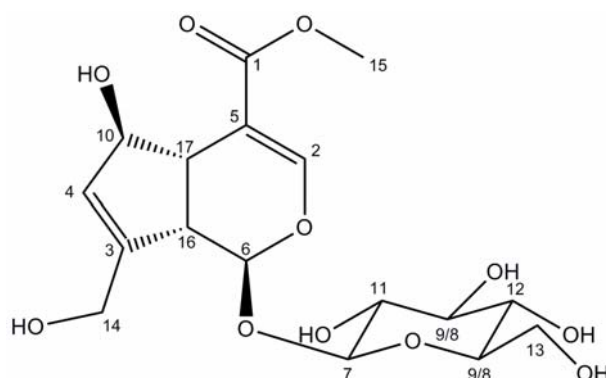
Strukturname: Scandoside methyl ester^{55,56,57}

Molekulargewicht: 404,13 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₄O₁₁

Masse (ESI, pos mod): 427,1 g/mol [M+Na]⁺

Struktur:



4.2.9.1 Bestimmung der Substanz I1

Bei der Betrachtung der Spektren dieser Substanz zeigt sich, dass der Teil des aromatischen Systems und der Teil des Zwischenstückes fehlen. Weiters erkennt man leichte Veränderungen im Secologanin-derivat. Die gefundene Struktur entspricht dem Scandoside methyl ester.^{55,56,57}

4.2.9.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Pos mod: m/z (%): 427,1 [M+Na]⁺ (100)

Tabelle 22: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	$J[\text{Hz}]$	^{13}C [ppm]
1	-			170,31
2	7,84	s		155,90
3	-			149,63
4	6,17	d	1,70	129,19
5	-			107,18
6	5,12	d	9,05	101,07
7	4,97	d	8,00	99,43
8	3,47			76,60
9	3,56			76,13
10	4,92			74,39
11	3,41			73,20
12	3,45			70,02
13	3,93 3,74			61,06
14	4,51 4,32			60,52
15	3,81	s		52,22
16	2,72	dd	6,02	44,75
17	3,19	dd	8,10	40,73

4.2.10 Strukturbestimmung der Substanz I2

Pflanze: *Psychotria poeppigiana*

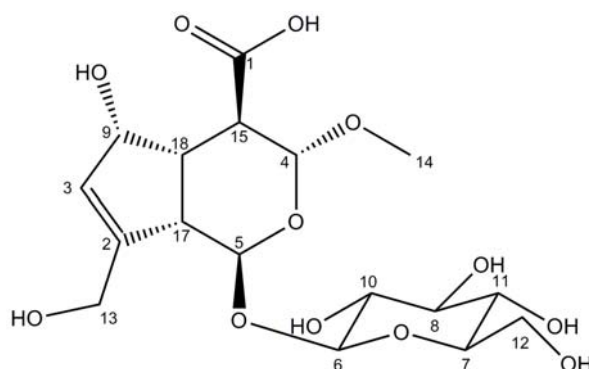
Erstmalig isolierte Verbindung

Molekulargewicht: 422,14 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₆O₁₂

Masse (ESI, pos mod): 427,1 g/mol [M-H₂O+Na]⁺

Struktur:



4.2.10.1 Bestimmung der Substanz I2

Die Spektren dieser Substanz ähneln der der Substanz I1. Die Unterschiede liegen in der freiliegenden Säureeinheit des Secologanin-derivat-teils und dem zusätzlichen Entstehen eines vollacetalem Kohlenstoffes durch eine weitere Methoxylierung am heteroatomaren Sechsring. Eine derartige Struktur ist bislang nicht beschrieben worden.

4.2.10.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie stimmen mit denen der Massenspektrometrie nicht überein (Abb. 19). Ein Versuch, diese Ungleichheit der Massen von 17 g/mol zu erklären, liegt in der möglichen Laktonisierung der freien Säureeinheit mit einer freistehenden Hydroxygruppe des Secologanin-derivates bei der Ionisierung des Moleküls im Massenspektrometer.

ESI (pos mod): m/z (%): 427,1 [M-H₂O+Na]⁺ (100)

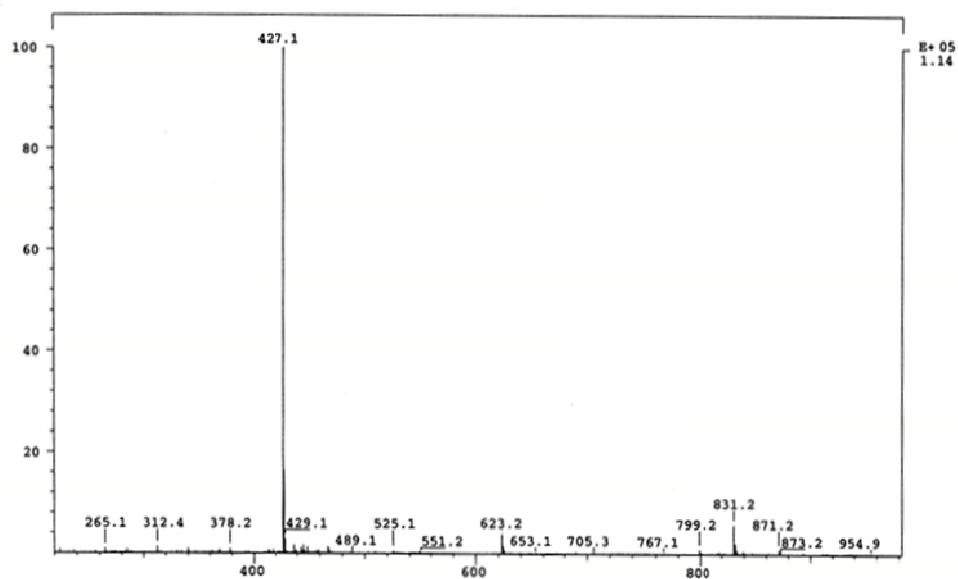


Abbildung 19: Massenspektrum von der Substanz 12.

Tabelle 23: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	$J[\text{Hz}]$	^{13}C [ppm]
1	-			179,75
2	-			150,17
3	5,94			127,83
4	5,15			102,37
5	5,13	d	2,94	102,34
6	4,83	d	8,00	98,69
7	3,47			76,57
8	3,56			76,14
9	4,71			75,61
10	3,41			73,39
11	3,45			69,99
12	3,93 3,74			61,08
13	4,42 4,27	d	15,16	60,50
14	3,58	s		57,58
15	2,72			50,50
16	3,39			49,30
17	2,65			47,77
18	2,86			43,85

4.2.11 Strukturbestimmung der Substanz I3

Pflanze: *Psychotria remis*

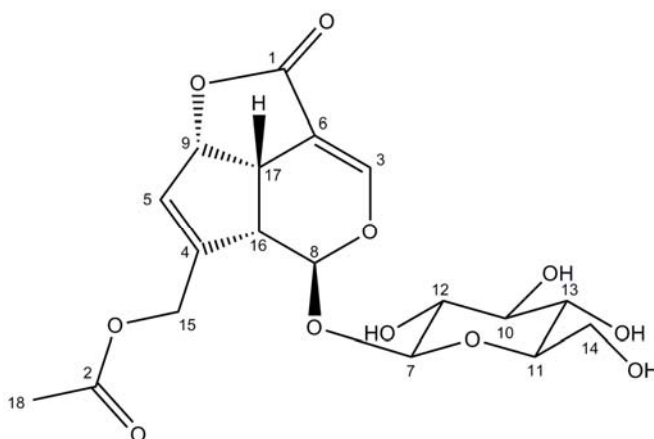
Strukturname: Asperuloside^{55,56,57}

Molekulargewicht: 414,12 g/mol

Summenformel: C₁₈H₂₂O₁₁

Masse(ESI, neg mod): 413,2 g/mol [M-H]⁻

Struktur:



4.2.11.1 Bestimmung der Substanz I3

Durch Vergleich der Spektren der Substanz I1 und der Substanz I2 erkennt man deutliche Ähnlichkeiten. Die Unterschiede liegen beim der zusätzlichen Carboxyleinheit und dem Fehlen des Methoxysignals sowie dem Auftreten von ³J_{H-C} Kopplungen, die die Laktonisierung belegen.^{55 56 57}

4.2.11.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

In der Aufnahme (Abb. 20) zeigt sich, dass die Intensität des Peaks bei 413.2 nur 62 % des intensivsten Peaks besitzt. Bei den weiterhin auftretenden Peaks 449,2 (100), 459.3 (42) handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Moleküle, welche als Verunreinigung der Probe betrachtet werden können. Das oben erwähnte Verhältnis kann dadurch erklärt werden, dass die zu untersuchende Substanz vermutlich schwerer zu ionisieren ist als die Moleküle der Verunreinigungen und somit in einem niedrigeren Anteil in der Gasphase vorliegt.

ESI (neg mod): m/z (%): 413,2 [M-H]⁻ (62), 449,2 [R₁-H]⁻ (100), 459,3 [R₂-H]⁻ (42)

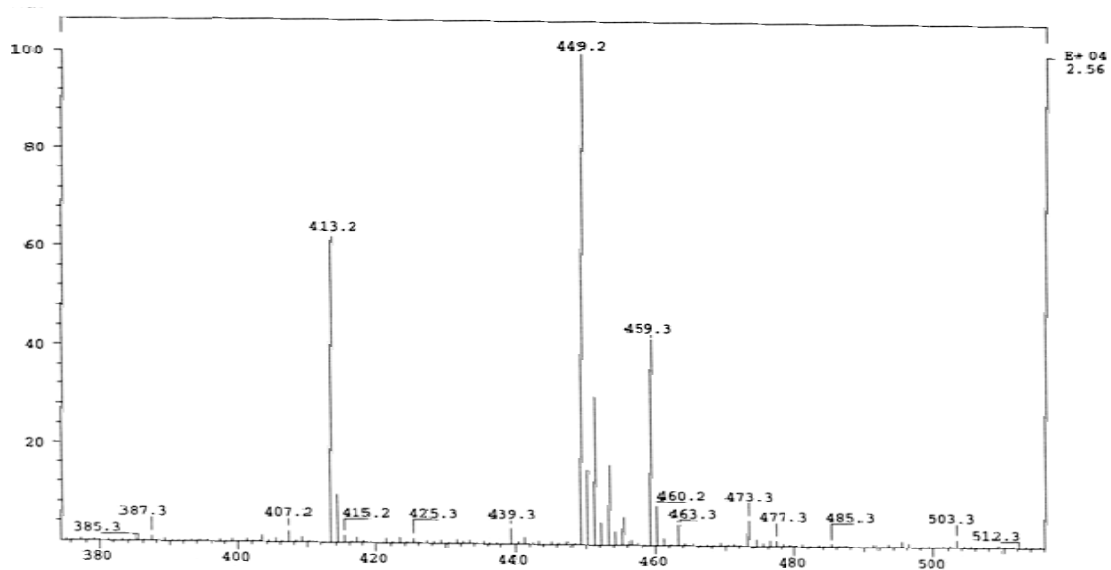


Abbildung 20: Massenspektrum von der Substanz 13

Tabelle 24: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			173,41
2	-			173,09
3	7,34	s		151,13
4	-			145,11
5	5,77			129,78
6	-			107,02
7	4,73	dd	6,57 1,52	100,87
8	5,99	d	1,24	94,17
9	5,61			87,15
10	3,41			79,20
11	3,44			78,27
12	3,24	dd	9,08 7,95	75,48
13	3,32			72,44
14	3,96 3,70	d	2,27	63,64
15	4,82 4,70	d	14,15	62,76
16	3,35			46,12
17	3,73			38,29
18	2,12	s		21,49

Pflanze: *Psychotria accuminata*

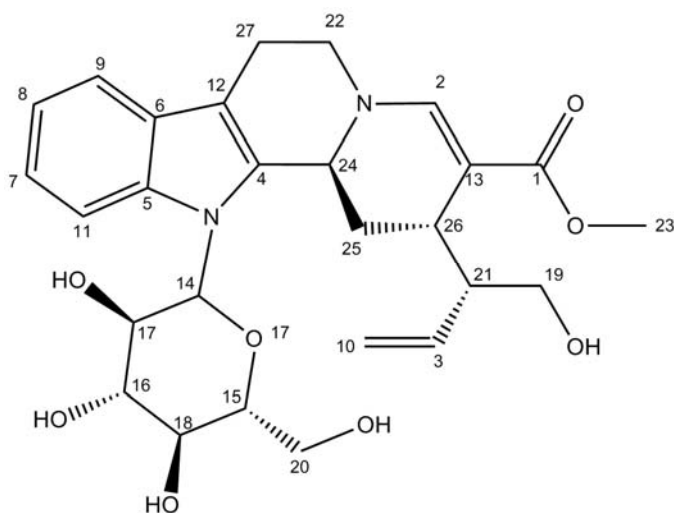
Erstmalig isolierte Struktur

Molekulargewicht: 514,23 g/mol

Summenformel: $C_{27}H_{34}N_2O_8$

Masse (ESI, pos mod): 515,1 g/mol $[M+H]^+$

Struktur:



4.2.11.1 Bestimmung der Substanz A2

Bei der Analyse dieser Substanz stellt sich heraus, dass sich die Position des Zuckers zu allen anderen oben besprochen Substanzen verändert hat. Man erkennt im HMBC-Spektrum deutliche $^3J_{H-C}$ -Kopplungen zwischen dem anomeren Wasserstoff und den Kohlenstoffen des aromatischen Indolsystems. Weiters kommt es zu Veränderungen im Zwischenstück und dem Secologaninderivat-teil. Bei der hier bestimmten Struktur handelt es sich um eine neu entdeckte Substanz.

4.2.11.2 Ergebnis der Massenspektrometrie

Auch diese Aufnahme wurde mit positiver Ionsation durchgeführt. Man erkennt im Spektrum (Abb. 21) den intensivsten Peak bei 515,1 g/mol sowie weitere Fragmentstück-signale.

ESI (pos mod): m/z (%): 537,1 $[M+Na]^+$ (26), 515,1 $[M+H]^+$ (100)

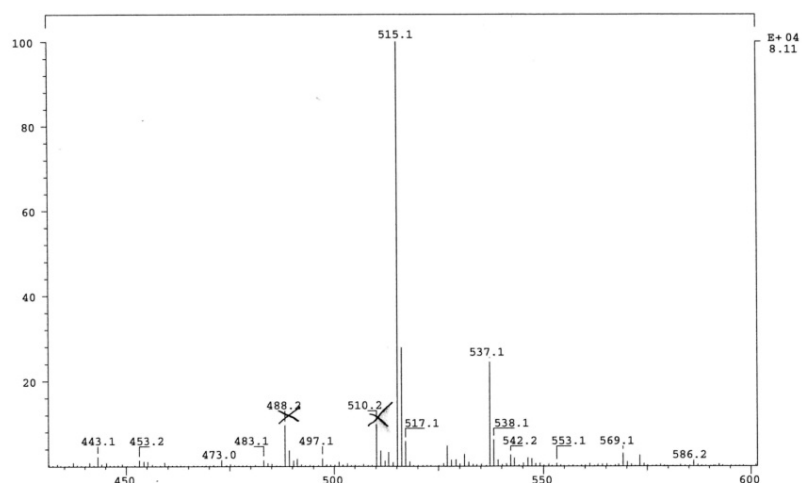
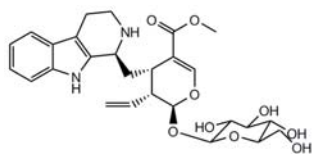


Abbildung 21: Massenspektrum von der Substanz A2.

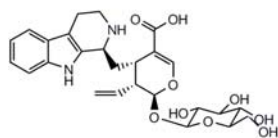
Tabelle 25: ^1H und ^{13}C -NMR Shifts und der detektierbaren ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten

Nr	^1H [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	-			171,84
2	7,81			149,38
3	5,82	m	9,80 6,72	140,85
4	-			136,00
5	-			136,00
6	-			129,70
7	7,15	t	7,51	122,77
8	7,08	t	7,38	121,03
9	7,46	d	7,89	119,05
10	5,20 5,13	d	16,93 10,15	116,92
11	7,64	d	7,89	114,59
12	-			111,31
13	-			95,30
14	5,28	d	9,15	87,57
15	3,52			81,23
16	3,62			79,39
17	4,53	d	8,84	72,36
18	3,53			71,80
19	3,70 3,60			65,36
20	3,92 3,65	d	12,35 8,06	63,02
21	2,46			55,19
22	3,79 3,53			52,96
23	3,69	s		51,19
24	4,93 3,69	d	15,67	50,21
25	1,43			35,13
26	3,01			33,67
27	2,82			23,40

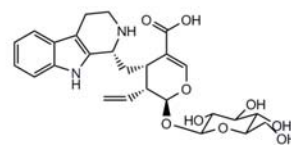
4.2.12 Darstellung aller interpretierten Substanzen



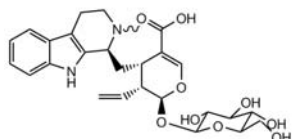
strictosidine S1



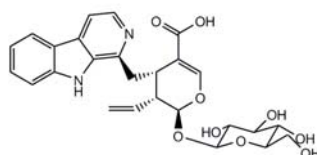
strictosidinic acid S3



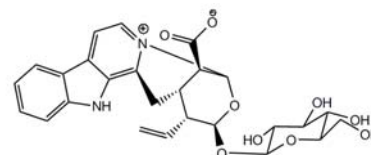
epi-strictosidinic acid S4



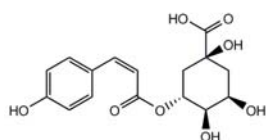
palicoside S5



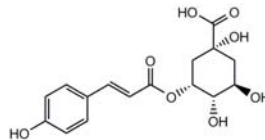
lyalosidic acid S6



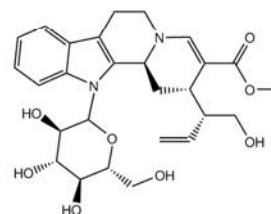
ophirine A S7



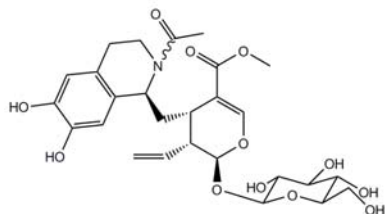
5-p-cis-coumaroylquinic acid Z1



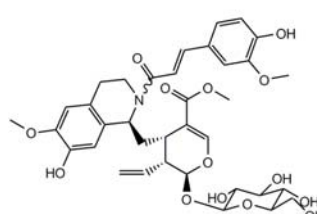
3-p-trans-Coumaroylquinic acid Z2



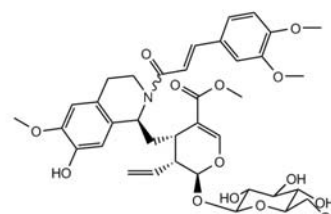
Erstmalig isolierte Verbindung A2



ipecoside D1



6-O-methyl-trans-cephaeloside D2



borucoside D3

4.3 In situ NMR Ergebnisse

4.3.1 In situ NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Cellobiose durch CelB

Katalyse

Bei der Umsetzungsreaktion zwischen Cellobiose und Mandel-glucosidase wird die glucosidische Spaltung von Cellobiose untersucht. In der Abbildung 22 sieht man, dass die Intensität des Signals des anomeren Protons des vollacetalen Kohlenstoffatoms kontinuierlich abnimmt, und die Intensität des Signals der anomeren α -Form kontinuierlich ansteigt. Beim Signal der korrespondierenden β -Form kommt es zu einer kleinen Veränderung des Shift-Wertes zwischen dem freien anomeren Protons der Cellobiose und dem der frei vorliegenden β -D-Glucose. Da diese beiden Signale durch das Wassersignal stark gestört werden, ist man nicht in der Lage, das Verhältnis zwischen der α - und der β -Form zu bestimmen.

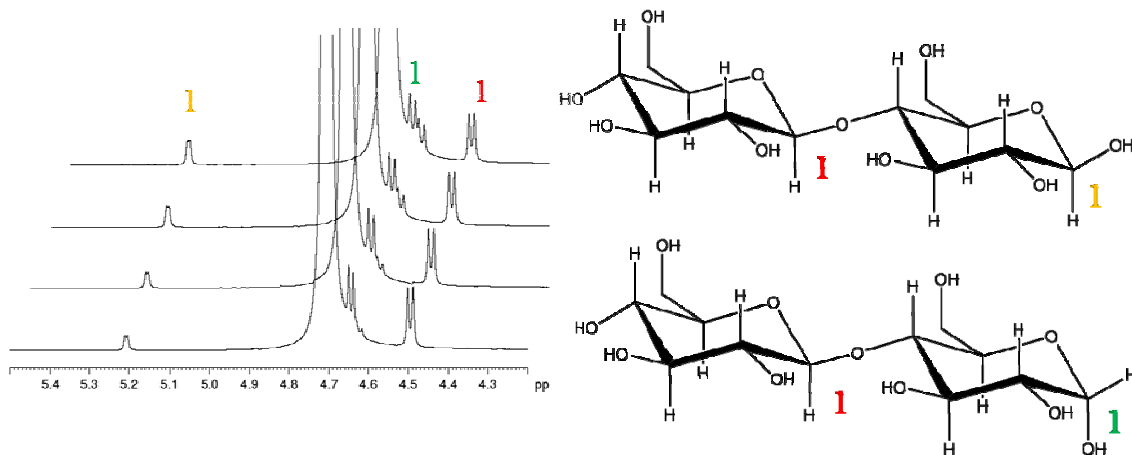


Abbildung 22: stackplot der Hydrolyse von Cellobiose durch CelB.

4.3.2 In situ NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Strictosidin durch CelB

Katalyse

Wie in der Einleitung beschrieben, läuft diese Enzymumsetzungsreaktion unter einer doppelten Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff des Zuckermoleküls ab. Dieser Sachverhalt des Erhalts der Konfiguration in der gebildeten Glucose kann im Kinetik-spektrum der Abbildung 23 recht deutlich gesehen werden. Man erkennt, dass die β -D-Glucose zu Beginn der Umsetzung ausschließlich alleine produziert wird. Aufgrund der Mutarotation entsteht im Laufe der Reaktion auch eine α -D-Glucose. Das Verhältnis zwischen den beiden Formen entspricht im Gleichgewicht einem Verhältnis von 38% α -Form und 62% β -Form. Das entstehende Aglykon konnte nicht identifiziert werden.

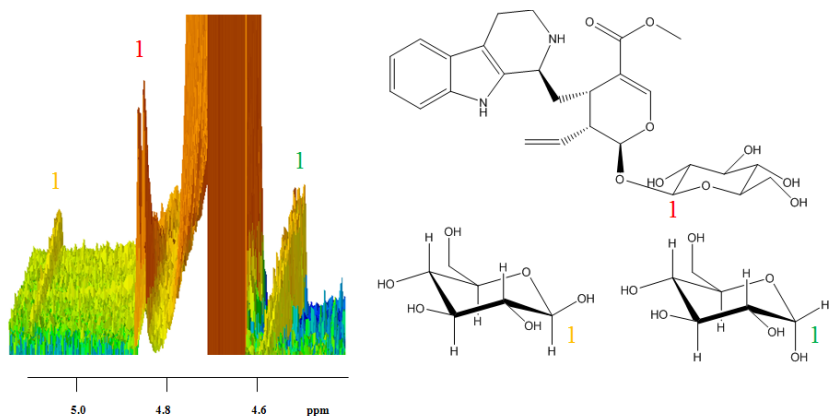


Abbildung 23: Kinetikverlauf der Umsetzung von Strictosidine durch CelB.

4.3.3 In situ NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Cellobiose durch Mandel-glucosidase Katalyse

Bei der Untersuchung der Umsetzungsreaktion zwischen der Cellobiose und der Mandel-glucosidase sieht man, dass die Hydrolyse relativ zügig abläuft. Auch hier im Spektrum der Abbildung 24 erkennt man das Phänomen der Mutarotation sehr gut.

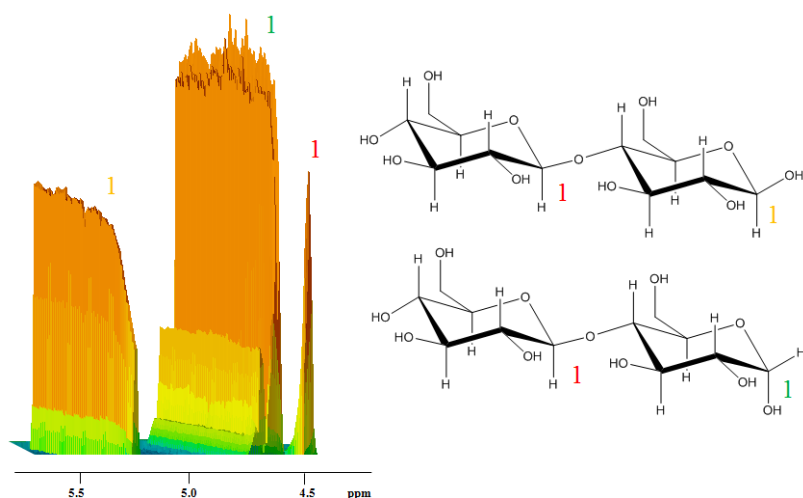


Abbildung 24: Kinetikverlauf der Umsetzung von Cellobiose durch die Mandelglucosidase.

4.3.4 In situ NMR Verfolgung der Hydrolyse des Glucosides in Strictosidine durch CelB Katalyse

Auch bei der Untersuchung der Umsetzung von Strictosidine durch CelB Katalyse erkennt man, dass es zu Beginn zu einer Retention der Konfiguration im freigesetzten Saccharid kommt und in weiterer Folge durch Mutarotation sowohl α-D-Glucose als auch β-D-Glucose gebildet werden.

(Abb. 25) Das entstehende zweite Produkt aus dem Aglycon dieser Reaktion konnte auch hier nicht verifiziert werden.

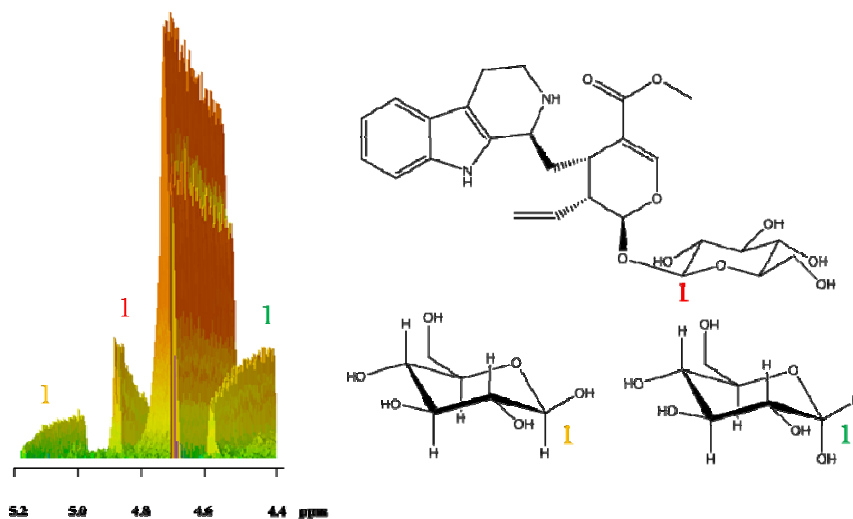


Abbildung 25: Kinetikverlauf der Umsetzung von Cellobiose durch die CelB.

4.3.5 In situ NMR basierte Untersuchung der Michaelis Menten Kinetik von CelB katalysierter Strictosidine hydrolyse

Die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Konzentrationen werden durch die Auswertung des abnehmenden Intensitätsverlaufes des einzelnen Protons an der Enol-Struktur des Strictosidines (Abb. 26) bestimmt.

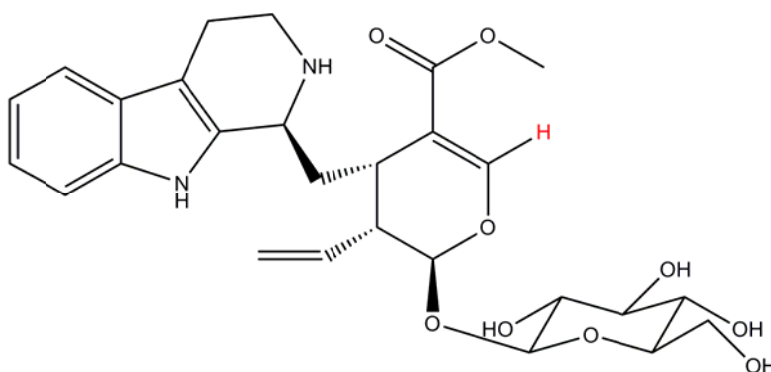


Abbildung 26: Strictosidine mit rot indiziertem Proton, dessen Signal für die Michaelis Menten Analyse benutzt wird.

Da das erste Zwischenprodukt dieser Hydrolyse ein Dialdehyd (siehe Schema 2) ist, kann man davon ausgehen, dass dieses Signal bei einer vollständigen Umsetzung verschwindet. Ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Protons liegt darin, dass es sich mit keinem weiteren Wasserstoffsignal überlagert und es somit zu keinen fehlerhaften Ergebnissen führt. Für die

Bestimmung der einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten werden die Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Umsetzungen bestimmt. Diese Ergebnisse werden wie folgt in einem Michaelis Menten Diagramm dargestellt.

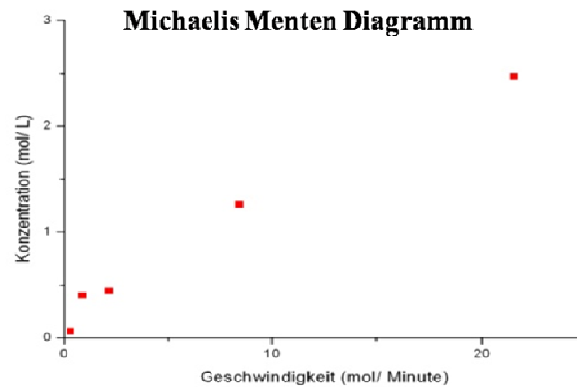


Abbildung 27: Michaelis Menten Diagramm.

Bei der Untersuchung der verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten der CelB katalysierten Umsetzung des Substrats Strictosidine zeigt sich (Abb. 27), dass sich alle erhaltenen Geschwindigkeiten im ansteigenden Teil der Michaelis Menten Kurve befinden.

Um den K_m -Wert dieser enzymkatalysierten Umsetzung bestimmen zu können, werden die gewonnen Reaktionsgeschwindigkeiten in einem Lineweaver Burk Diagramm (Abb. 28) dargestellt. Hierbei zeigt es sich, dass die Auswertung keine sinnvollen physikalischen sowie chemischen Ergebnisse erbringt. Die möglichen Gründe für dieses Ergebnis werden im Kapitel 5 diskutiert.

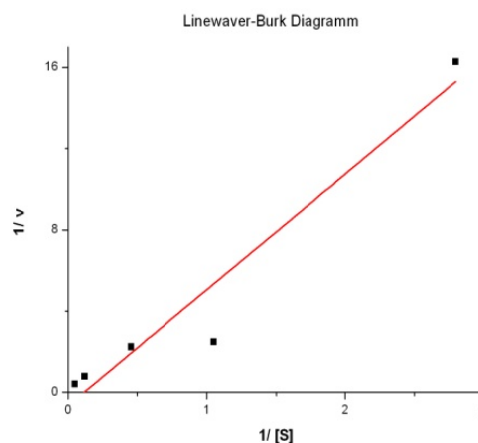


Abbildung 28: Lineweaver Burk Diagramm.

Während der enzymkatalysierten Reaktion kommt es in weiterer Folge zu Umlagerungen im gebildeten freien Aglyon sowie zu einer Protonierung am Stickstoff des Piperidin-ähnlichen Molekülfragmentes. Der Grund für diese Reaktion liegt in dem sich ändernden pH-Wert der Lösung während der Enzymumsetzung. Da zur Gesamtlösung kein Puffer hinzugefügt wurde, kann sich der pH-Wert der Lösung durch entstehende saure Zwischenprodukte erniedrigen. Aufgrund der Erhöhung der Hydroxoniumion-konzentration in der Lösung kommt es zur Protonierung des leicht basischen sekundären Amins. Da nun der Stickstoff in seiner quaternären ebenen positiv geladenen Form vorliegt, kann es zu Veränderungen der Shift-Werte der benachbarten Wasserstoffatome kommen. Diese Veränderung der Shift-Werte wird in der Abbildung 29 graphisch dargestellt.

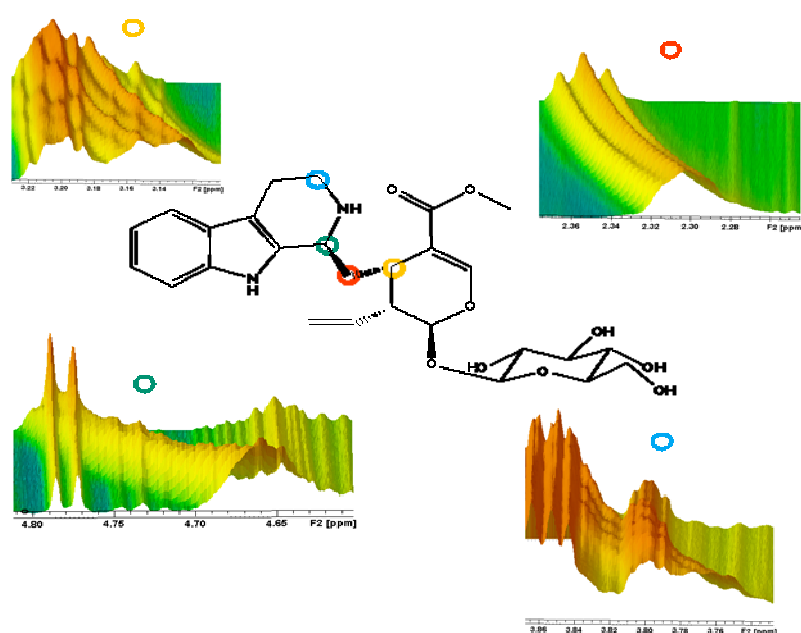


Abbildung 29: Veränderung der chemischen Shift-Werte der benachbarten Wasserstoffatome.

4.4. STD-NMR Ergebnisse

4.4.1 STD-NMR Untersuchung der beiden anomeren Glucoseformen in Gegenwart von CelB

Bei den STD-NMR Messungen von Glucose und dem Enzym CelB zeigt es sich, dass alle Wasserstoffatome der Glucose eine Dipol-Dipol Wechselwirkung mit dem Enzym eingehen (Abb. 30). Die dabei zu Grunde liegende Bindung und Übertragung der Energie findet mit großer Wahrscheinlichkeit überwiegend im aktiven Zentrum statt. Da die Wechselwirkung stark von der Distanz abhängig ist, kann man aufgrund dieses Ergebnisses darauf schließen, dass die Glucose im aktiven Zentrum des Enzyms an definierten Positionen in den Subsites⁶⁴ relativ intensiv gebunden vorliegt.

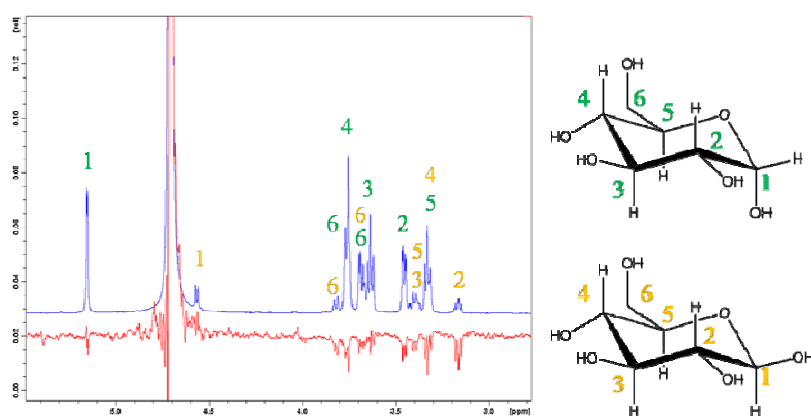


Abbildung 30: STD NMR von Glucose in Gegenwart von CelB.

4.4.2 STD-NMR Untersuchung von Cellobiose in Gegenwart von CelB

Bei der STD-NMR Untersuchung von Cellobiose erkennt man, dass der Glucosidteil mit der Vollacetalereinheit stärker mit dem Enzym wechselwirkt, als das Glucosid mit der reduzierenden Einheit (Abb. 31/32). Dies weist darauf hin, dass das Glycosid mit dem nichtreduzierenden Teil am aktiven Zentrum in der Subsite -1 liegt. Da die Reaktion am anomeren Kohlenstoff der Vollacetalereinheit abläuft, ist dieses Ergebnis konsistent mit den Ergebnissen der Literatur.²²

4.4.3 STD-NMR Untersuchung von Strictosidine in Gegenwart von CelB

Im Falle der STD-NMR Untersuchung der Bindung von Strictosidine an CelB erkennt man recht deutlich, dass der aromatische Teil, die Methoxygruppe sowie das Proton H-1 eine starke

Wechselwirkung mit dem Enzym aufweisen. Überraschenderweise zeigen die Protonen des Glucosefragmentes vergleichsweise schwache STD-Signale (Abb. 33).

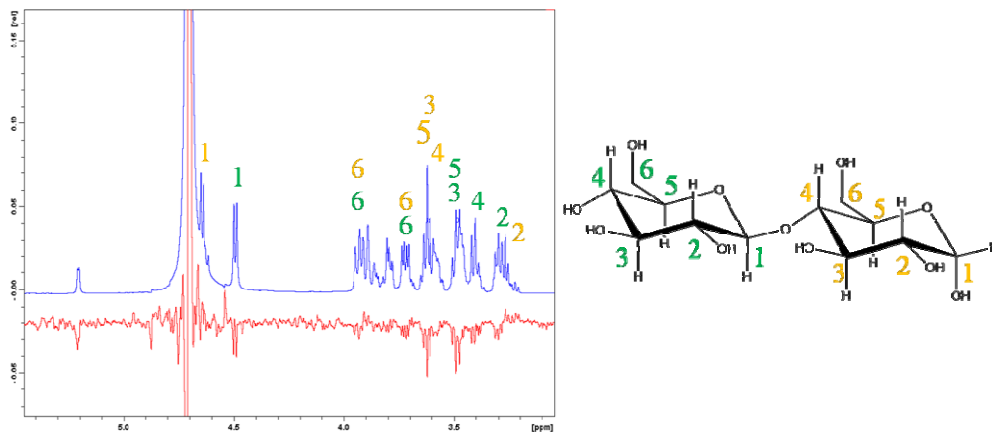


Abbildung 31: STD NMR von Cellobiose in Gegenwart von CelB. Indiziert ist die β -Form.

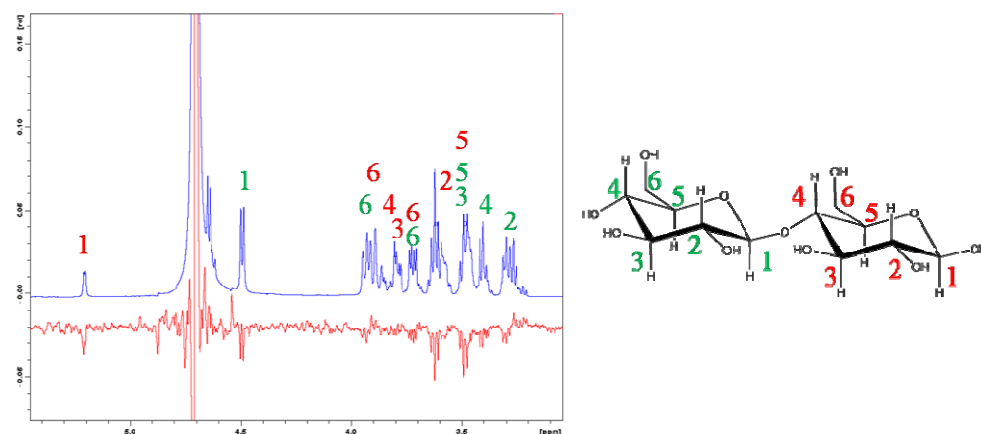


Abbildung 32: STD NMR von Cellobiose in Gegenwart von CelB. Indiziert ist die α -Form.

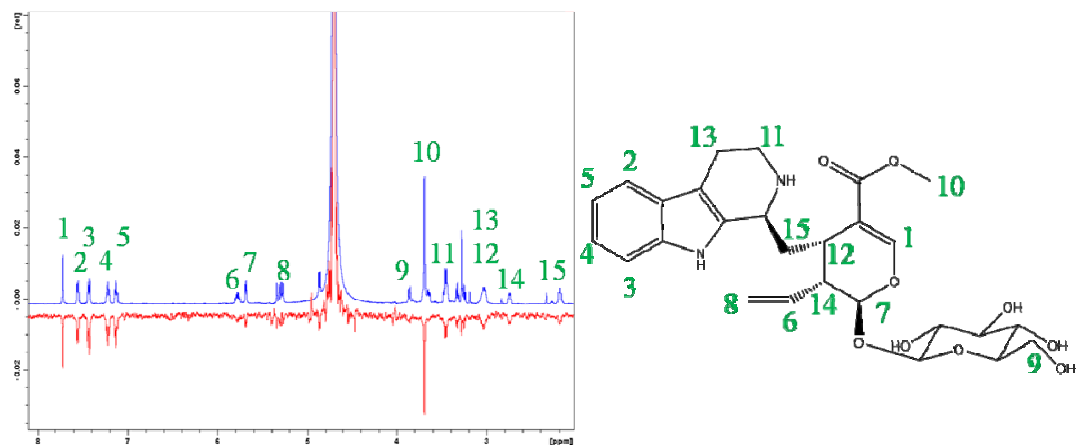


Abbildung 33: STD NMR von Strictosidine in Gegenwart von CelB.

4.4.4 STD-NMR Untersuchung der beiden anomeren Glucoseformen in Gegenwart der Mandel-glucosidase

Wie beim Enzym CelB sieht man, dass alle Protonen der beiden anomeren Formen mit dem Enzym wechselwirken. (Abb. 34) Im Besonderen sieht man ein starkes STD Signal des anomeren Protons der α -Form. Die Wasserstoffatome 3-5 beider Glucoseformen zeigen hingegen nur schwache Signale.

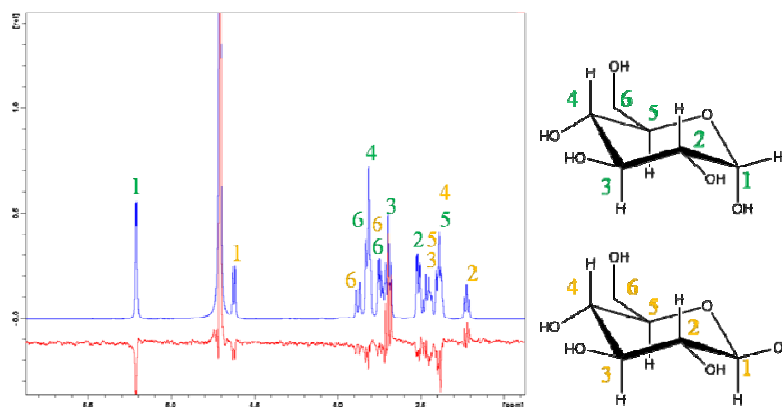


Abbildung 34: STD NMR von Glucose in Gegenwart der Mandel-glucosidase.

4.4.5 STD-NMR Untersuchung von Cellobiose in Gegenwart der Mandelglucosidase

Auch bei der Untersuchung der Cellobiose mit der Mandel-Glucosidase kommt man zu ähnlichen Ergebnissen wie beim Enzym CelB. (Abb. 35/36) Die Wasserstoffatome des nichtreduzierenden Glucosidteils erfahren eine starke dipolare Wechselwirkung als die Protonen des reduzierenden.

4.4.6 STD-NMR Untersuchung von Strictosidine in Gegenwart der Mandel-glucosidase

Analog zum Ergebnis mit dem CelB Enzym zeigen hauptsächlich die Wasserstoffatome des aromatischen Teiles, die Methoxygruppe sowie das Proton H-1 starke STD-Signale. Zusätzlich sieht man im Spektrum der Abbildung 37 ein schwaches STD-Signal des anomeren Wasserstoffatoms.

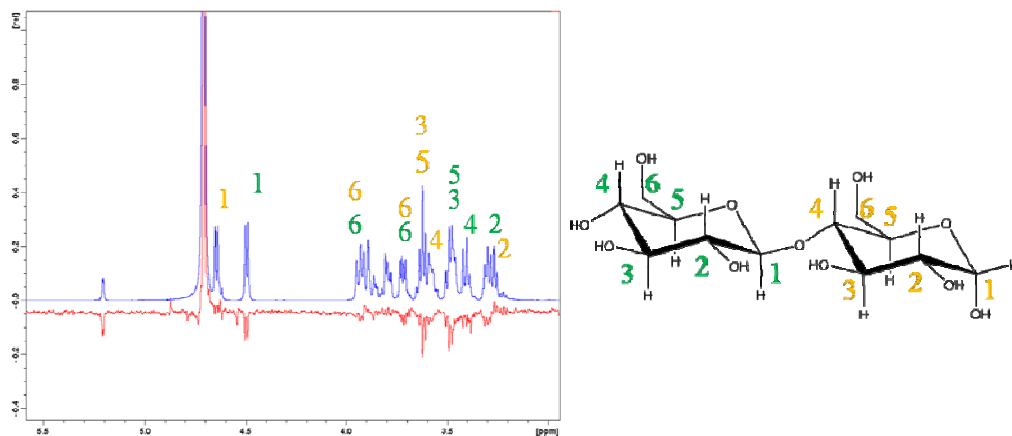


Abbildung 35: STD NMR von Cellobiose in Gegenwart von Mandel-glucosidase. Indiziert ist die β -Form.

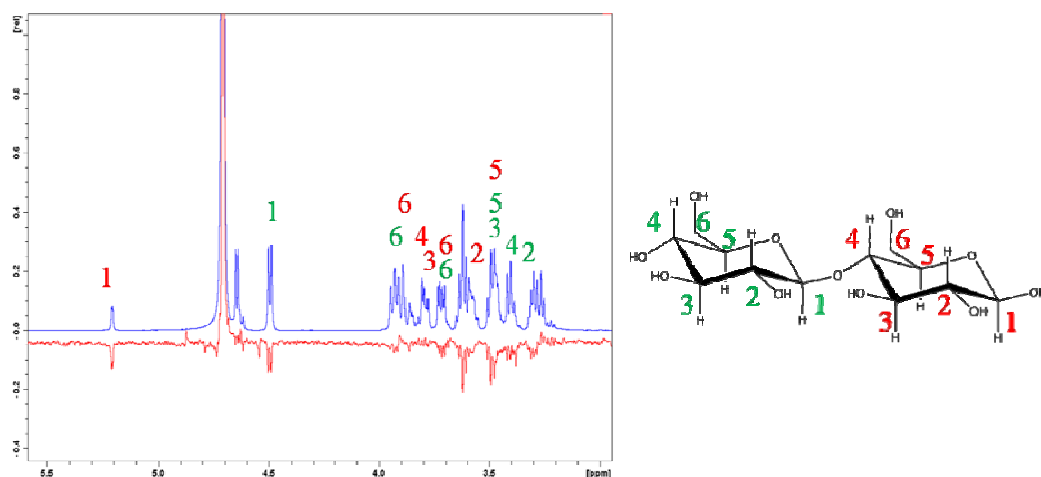


Abbildung 36: STD NMR von Cellobiose in Gegenwart von Mandel-glucosidase. Indiziert ist die α -Form.

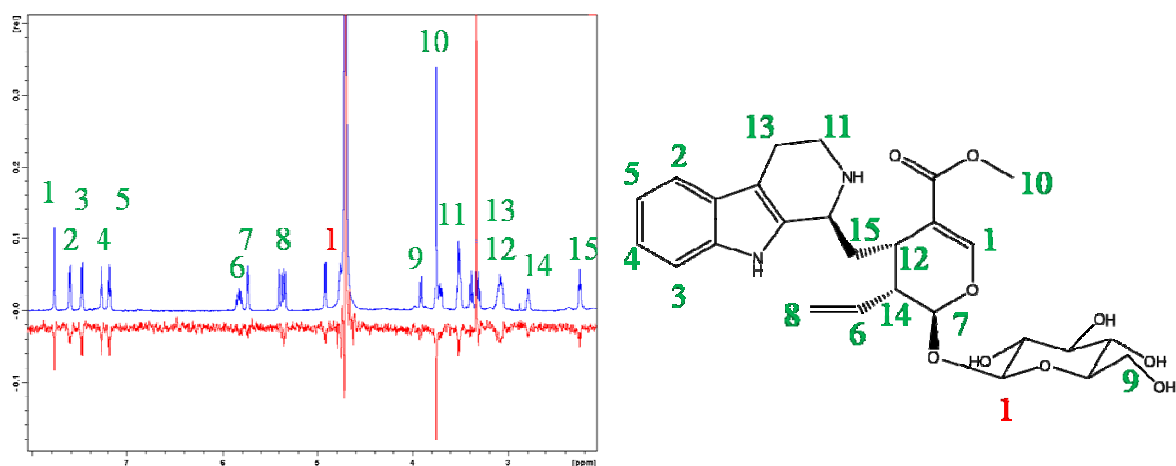


Abbildung 37: STD NMR von Strictosidine in Gegenwart der Mandel-glucosidase

4.5 Dockingergebnisse

4.5.1 Dockingsimulation der Lage von Glucose im aktiven Zentrum

Die Abbildung 38 zeigt die relative Lage der Glucose im aktiven Zentrum des Enzyms 1QVB. Sie ist das Ergebnis der Dockingsimulation mit dem Programm Glide. Wie im Kapitel 3.6 ausführlich besprochen, handelt es sich nicht um die Originalstruktur von CelB, sondern um das Homologenenzym 1QVB. Der entscheidende Faktor für die Verwendung dieses Enzyms liegt darin, dass ihr aktives Zentrum auch durch eine $(\alpha\beta)_8$ barrel Struktur aufgebaut ist. In der Abbildung 37 sieht man, dass die Glutamineinheiten 372, 207 und 417 eine räumliche Nähe von 2 Å zum Substrat besitzen. Die kurzen Abstände zwischen den Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppen der Glutamateinheiten und dem Wasserstoffatom der Hydroxygruppen des Glucosids, sowie die kleinen Winkel zwischen dem Sauerstoffatom der Hydroxygruppen und jenen der Glutamateinheiten zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen dem Enzym und der Glucose relativ stark sein muss. Diese Art von Wechselwirkung bezeichnet man als Wasserstoffbrückenbildung. Die Energie, die pro Wasserstoffbrückenbildung dieser Art gewonnen wird, liegt im Bereich von ca. 30 kJ/mol. Addiert man die Energie der drei gefundenen Wasserstoffbrücken, so kommt man zu einer Gesamtenergie von 90 kJ/mol. Diese Energie reicht aus, um die Glucose im aktiven Zentrum fest zu binden. Um die Übersicht aufrecht zu erhalten, werden in allen folgenden Abbildungen nur die Aminosäuren gezeigt, die für den katalytischen Schritt der Enzymumsetzung verantwortlich sind.

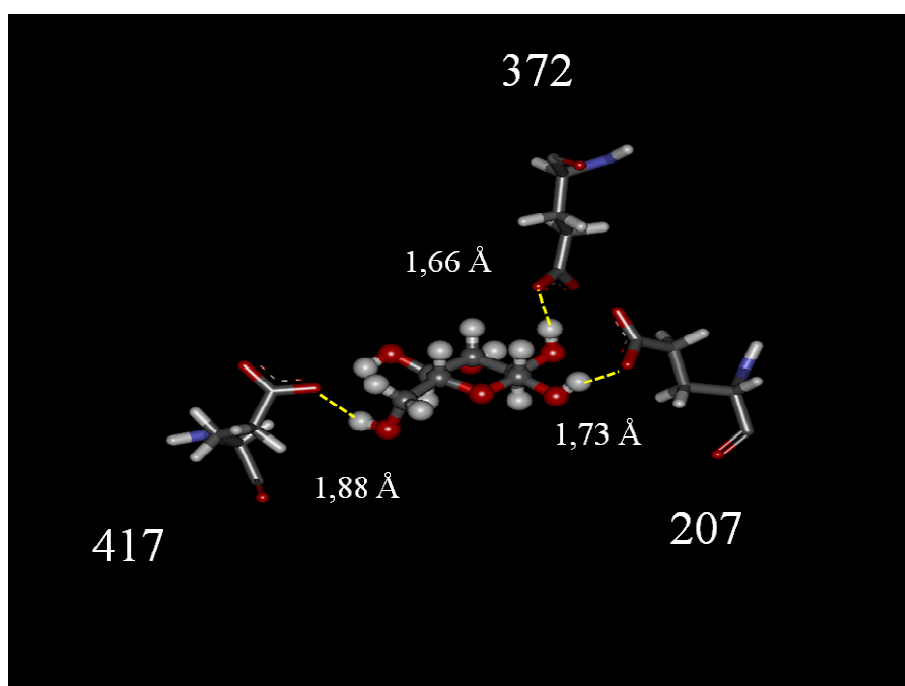


Abbildung 38: Simulierte Lage der Glucose im aktiven Zentrum.

Ergebnisse:

Glu (372)	C ₂ OH	1.66 Å	5.08°
Glu (207)	C ₁ OH	1.73 Å	9.39°
Glu (417)	C ₆ OH	1.88 Å	19.01°

4.5.2 Dockingsimulation der Lage von Cellobiose im aktiven Zentrum

Bei der Untersuchung der Lage von Cellobiose im aktiven Zentrum ergibt die Dockingsimulation, dass die Glutamateinheit 417 viel näher am Reaktionsort liegt als die Aminosäureeinheit 207. Dieses Ergebnis kann darauf hindeuten, dass nicht die Glutamateinheit 207 die Hydrolyse katalysiert, sondern die Glutamateinheit 417. Um diese Annahme verifizieren zu können, müssen zum Einen Mutationsuntersuchungen der besprochenen Aminosäuren durchgeführt und zum Anderen molekular dynamische Simulationen im Picosekundenbereich berechnet werden. Die Dockingsimulation bestätigt zusätzlich, dass die Glucoseeinheit mit der Vollacetaleinheit im aktiven Zentrum liegt. (Abb. 39)

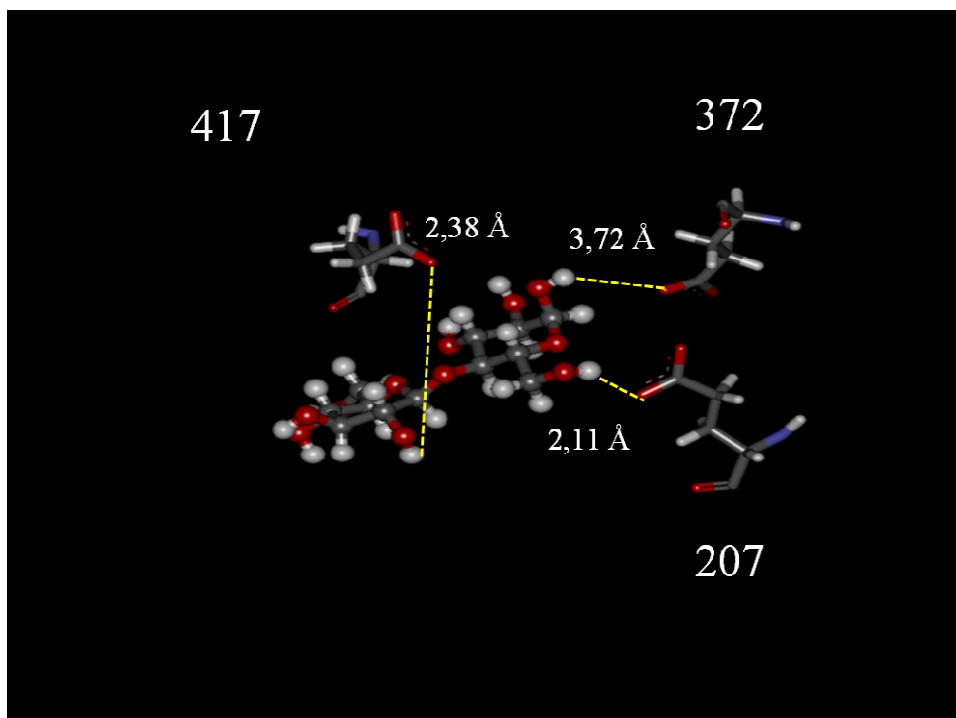


Abbildung 39: Simulierte Lage der Cellobiose im aktiven Zentrum.

Ergebnisse:

Glu (372)	C ₁ OH(a)	3.26 Å	37.21°
Glu (207)	C ₆ OH(a)	2.11 Å	20.76°
Glu (417)	C ₂ OH(b)	2.38 Å	35.43°

4.5.3 Dockingsimulation der Lage von Strictosidine im aktiven Zentrum

Die Abbildung 40 zeigt das Ergebnis der Dockingsimulation mit dem Substrat Strictosidine. Die beiden Glutamateinheiten 372 und 207 zeigen zum anomeren Kohlenstoffatom, bei dem die Reaktion abläuft, einen akzeptablen Abstand von ca. 3 Å. Bei der Analyse der Simulation erkennt man, dass der Glucoseteil des Strictosidins im aktiven Zentrum liegt. Dieses Fragmentstück bildet mit dem Enzym vier Wasserstoffbrücken. Bei einer solch starken Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem Substrat kommt es in deutlich geringerem Ausmaß zur Dissoziation. Die Konzentration von dissoziierten Strictosidine-molekülen, die durch Dipol-Dipol Wechselwirkung Magnetisierung vom Enzym aufgenommen haben, ist folglich in der Lösung sehr gering. Dies hat zur Folge, dass nur sehr schwache STD Signale von diesem Molekülfragment detektiert werden können, welches im STD-Spektrum so gut wie unsichtbar bleibt.

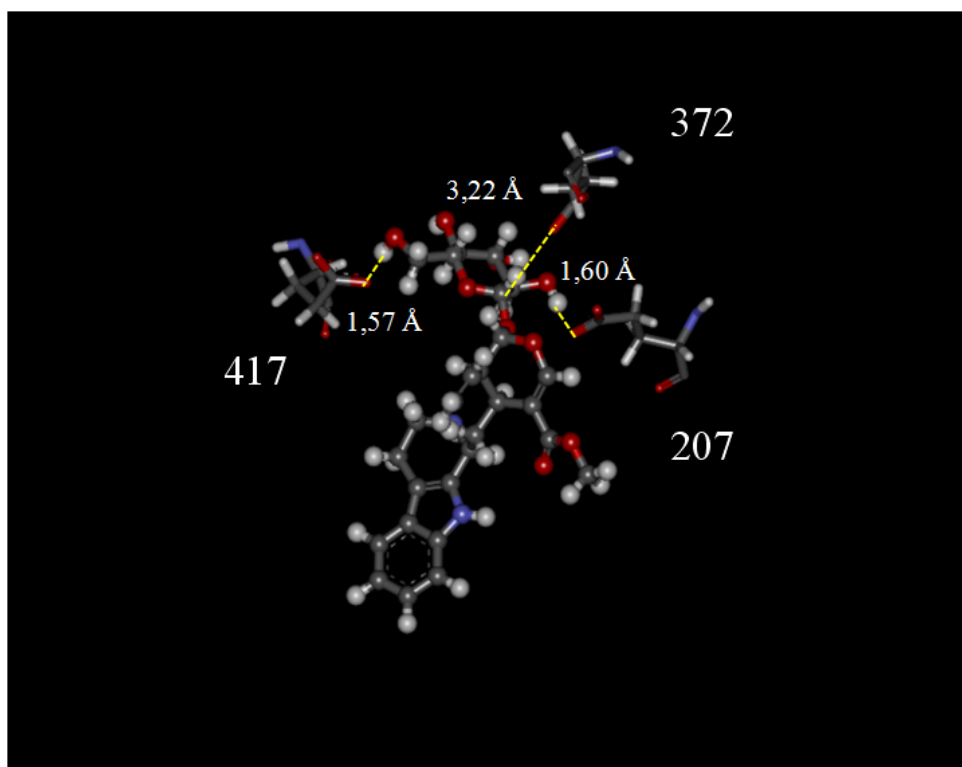


Abbildung 40: Simulierte Lage des Strictosidines im aktiven Zentrum.

Ergebnisse:

Glu (372)	C ₂ O	2.87 Å	C ₁	3.22 Å
Glu (207)	C ₂ OH	1.60 Å	C ₁	3.30 Å
Glu (417)	C ₆ OH	1.57 Å		

5. Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit werden *Psychotria*-Arten auf ihre alkaloidhaltigen Inhaltsstoffe untersucht und mit den genetischen Untersuchungen verglichen. Da das Wissen über die wichtigen Biosynthesewege von Alkaloiden bereits sehr fortgeschritten ist, kann man anhand der isolierten Alkaloide auf dessen Metabolismus rückschließen. Dieses Wissen gibt uns die Möglichkeit, Pflanzenarten aufgrund ihrer beinhalteten Alkaloide einzuteilen und miteinander in Verbindung zu bringen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigt es sich, dass vier verschiedene Substanzklassen von der Gattung *Psychotria* L. metabolisiert werden können. Eine Pflanzenart produziert nur Terpen-Tryptophan-Alkaloide, eine andere Terpen-Dopamin-Alkaloide und eine weitere reine Iridoidderivate. Die Inhaltsstoffe der *P. chagrensis*, Repräsentant eines weiteren Aufsplittungszweiges, konnten in dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Die Aufsplitterung der untersuchten Pflanzen, die wir aufgrund der isolierten Substanzen erzeugen können, stimmt vollständig mit denen der genetischen Untersuchung überein.¹⁰ Dieses Ergebnis kann als eine weitere Bestätigung anerkannt werden, Pflanzenarten vornehmlich anhand ihrer Inhaltsstoffe zu vergleichen.

Bei den Untersuchungen der Hydrolyse von Strictosidine sowie von Cellobiose mit den beiden Enzymen CelB und Mandel-glucosidase zeigen sehr ähnliche Ergebnisse hinsichtlich Reaktivität und Bindungsverhalten. Dies beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der gleichen Familienzugehörigkeit der beiden Enzyme. Vergleicht man die Familie dieser beiden Enzyme (EC 3.2.1.21)^{19 20} mit denen der originalen Strictosidine-glucosidase (EC 3.2.1.105),⁶⁵ so gehören beide zu der Familie 1 der Glucosidasen. Das aktive Zentrum der Strictosidine-glucosidase wird sowie das Enzym CelB durch die $(\alpha\beta)_8$ -barrel Struktur aufgebaut. Dass es überhaupt zu einer Umsetzung zwischen dem Strictosidine und den verwendeten Enzymen gekommen ist, kann aufgrund dieses Sachverhaltes nachvollzogen werden. Die Entstehung der β -D-Glucose durch die katalysierte Hydrolyse der untersuchten Substanzen kann mit Hilfe von kinetischen NMR-Messungen bestimmt werden. In den Spektren erkennt man, dass die Mutarotation der β -D-Glucose im Anschluss an die enzymkatalysierte Reaktion stattfindet. Die entstehenden Aglycone der Strictosidine-umsetzungen beider Enzyme können nicht isoliert werden. Eine Interpretation dieses Ergebnisses zeigt, dass sich gebildete Zwischenprodukte zu unterschiedlichen Folgeprodukten umlagern. Mit großer Wahrscheinlichkeit bilden eben genannte mit dem Enzym kovalente Bindungen und zerstören diese somit. Welche Zwischenprodukte diese Reaktionen mit dem Enzym verursachen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Die beiden oben erwähnten Ergebnisse zeigen, dass die beiden verwendeten Enzyme nicht nur aus der gleichen Familie, sondern auch sehr ähnliche aktive Zentren besitzen müssen. Welche Aminosäuren für die

Stabilität der Strictosidine-glucosidase während der Umsetzung verantwortlich sind, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Wie schon im Kapitel 4.3.5 beschrieben, kommt es zu keinen sinnvollen Ergebnissen bei der Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante. Ein etwaiger Grund kann darin liegen, dass diese Untersuchungen an die Detektionsgrenzen der NMR-Spektroskopie für kinetische Messungen enzymatischer Umsatzreaktionen stoßen. Dies begründet sich im sehr kleinen K_m Wert der Reaktion, sowie darin, dass die aufgenommenen Messergebnisse im quasi linearen Anstieg der Michaelis-Menten Funktion liegen und die Enzymsättigung nicht annähernd erreicht wird. Somit kommt es zu einem relativ starken Einfluss der Messwertstreuungen bei der Auswertung. Dies hat zur Folge, dass die Kinetik dieser Umsetzung alleinig mit diesen gewonnenen Ergebnissen nicht nachvollzogen werden kann. Die einzigen vernünftigen Interpretationen zu dieser Messreihe liegen in den Aussagen, dass sowohl der K_m -Wert, als auch die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Umsetzung relativ klein sind. Die Argumente für diese langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten könnten im Fall der thermophilen CelB bei der niedrigen Reaktionstemperatur von 30° sowie bei dem daraus resultierenden niedrigen k_{cat} -Wert dieser Enzymumsetzung liegen.

Bei allen STD-Untersuchungen ist zu erkennen, dass besonders der glucosidische Teil einer Substanz starke Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht. Da sowohl Cellobiose als auch Strictosidine von beiden Enzymen umgesetzt werden, muss der Aufbau beider aktiven Zentren relativ ähnlich sein. Diese Annahme kann durch die sehr ähnlichen Signale der STD-Messungen zusätzlich verstärkt werden. Die Besonderheit der Ergebnisse der STD-Messungen der Strictosidine-umsetzung können wie im Kapitel 4.5.3 schon erläutert, mit den sehr starken Wechselwirkungen von vier Wasserstoffbrückenbildungen des Glucosids mit dem Enzym verstanden werden. Diese starken Wechselwirkungen können den relativ kleinen K_m Wert der Glycosid-spaltung erklären.

Bei der Bestimmung der Lage der untersuchten Substrate zeigt sich, dass die Position des Glucosids bei allen drei untersuchten Substanzen annähernd die gleiche ist. Auch die Abstände der katalytisch wirkenden Aminosäuren liegen im physikalisch chemisch sinnvollen Bereich von wenigen Ångström. Alle Dockingsimulationen bestätigen auch den Aufbau des aktiven Zentrums durch die Aminosäuren Arg77, His150, Asn206, Tyr307, Trp410, Glu207, Glu372.^{19 20} Leichte Unterschiede gibt es nur bei der Cellobiose, wo es zu einer möglichen Vertauschung der für die Katalyse verantwortlichen Aminosäuren kommt. Da in dieser Arbeit keine dynamischen Simulationen der Hydrolysereaktion durchgeführt worden sind, kann die oben erwähnte

Annahme nicht verifiziert werden. Weiters ist zu den Simulationsergebnissen zu sagen, dass sie sehr gut mit den STD-Ergebnissen übereinstimmen.

Obwohl die hier verwendeten Enzyme aufgrund von Zwischenprodukten zerstört werden, muss die mögliche Anwendung von nützlichen Modelenzymen in organischen und pharmazeutischen Fragestellungen in Betracht gezogen werden, insbesondere wenn die originalen Enzyme sehr schwer zugänglich sind. Weiters erkennt man, dass unterschiedliche Glucosidasen aus der gleichen Enzymfamilie stammend, Substanzen mit völlig verschiedenen Glucosid-aglyconen umsetzen können. Wie effektiv eine Umsetzung abläuft, kann aber nur durch empirisches Forschen untersucht werden.

Bezieht man sich rückblickend auf die Aufgabenstellungen konnten somit alle Fragestellungen gelöst werden. Ausgenommen die exakte Bestimmung der kinetischen Reaktionsdaten konnte nicht in gewünschtem Maße verifiziert werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sind neun verschiedene Arten der Pflanzengattung *Psychotria* L. auf Alkaloide als Pflanzeninhaltsstoffe untersucht worden. Durch die Isolation und Identifikation dieser Verbindungen können die verwendeten Pflanzenarten in vier unterschiedliche Hauptzweige aufgeteilt werden. Diese resultierende Aufspaltung der Pflanzengattung *Psychotria* L. stimmt mit denen der genetischen Untersuchung¹⁰ vollständig überein.

Das isolierte Glyco-alkaloid Strictosidine, als auch die Vergleichsverbindung Cellobiose, werden durch die isolierten Enzyme CelB und Mandel-glucosidase gleichermaßen hydrolysiert. Der Reaktionsverlauf dieser Reaktionen kann mit Hilfe von kinetischen *in situ* NMR Messungen beobachtet werden. Die Entstehung der abgespaltenen β -D-Glucose und deren Mutarotation kann in den NMR-Spektren bestimmt werden. Die bei den Umsetzungsreaktionen entstehenden Aglycon-strukturen können nicht bestimmt werden, da sie Umlagerungsreaktionen unterliegen und mit den Enzymen eine kovalente Bindung eingehen. Genaue kinetische Daten können mit den gewonnenen Daten der *in situ* NMR-Messungen nicht verifiziert werden. Es lassen sich jedoch Aussagen über die niedrigen Reaktionsgeschwindigkeiten und den niedrigen K_m -Wert tätigen.

STD-NMR-Messungen dieser Reaktionen zeigen, dass der Glucosid-teil der beiden Substanzen, bei dem die hydrolytische Spaltung stattfindet, die stärkste Wechselwirkung mit dem Enzym im aktiven Zentrum eingeht. Im Falle des Strictosidines ist diese Wechselwirkung aufgrund von ausgebildeten vier Wasserstoffbrücken relativ stark, sodass es nur in kleinem Ausmaß zur Dissoziation des Substrates kommt. In der Folge können nur vergleichsweise schwache STD-Signale für diesen Molekülteil detektiert werden.

Bei den Ergebnissen einer Dockingsimulationen sind die Distanzen der Aminosäuren, welche die Enzymumsetzungsreaktion katalysieren, in einem chemisch vernünftigen Rahmen. Alle Untersuchungen bestätigen, dass das aktive Zentrum durch die in der Literatur^{19,20} angegeben Aminosäuren aufgebaut wird.

7. Abstract

In the present diploma thesis nine different species of the plant genus *Psychotria* L. have been examined with respect to their containment of alkaloids. Isolation and identification of several natural products lead to a segmentation of *Psychotria* L. into four main branches of species, which exactly matches the results of genetical examinations.¹⁰

Both, the isolated glyco-alkaloid strictosidine and the analogue compound Cellobiose are hydrolyzed in a similar manner by enzymatic catalysis of the isolated enzymes CelB and almond-glucosidase. The course of these reactions can be observed by kinetic *in situ* NMR measurements. The formation of the hydrolysed β -D-Glucose and their mutarotation can be monitored in the NMR spectra. However, in case of strictosidine the aglycone also originating from conversion reactions is subjected to rearrangements and furthermore forming covalent bonds with the enzymes. Detailed kinetic data could not be verified by the *in situ* NMR measurements, but statements can be made on the low reaction rates and the low K_m -value.

STD-NMR measurements of the reactions show, that the glucoside part of the substances, which is subjected to the hydrolysis, binds most intensively to the active site of the enzymes. In particular, in strictosidine its interaction is quite vigorous due to the existence of four hydrogen bonds, resulting in just minor dissociation of the substrate. This tight binding causes consequently only weak STD signals of this part of the molecule.

Results of docking simulations proof the distances between amino acids, which catalyze the enzyme conversion reactions, to be in a chemically reasonable context. All tests confirm the active site being based on amino acids as specified in literature.^{19,20}

8. Literaturverzeichnis

-
- ¹ A. Allais. *Wenn man Grenzen einmal überschritten hat, gibt es keine Beschränkungen mehr*, Discordia Postkarten, CN7065, Paris, **2000**.
- ² K. Cammann (Hrsg.). *Instrumentelle Analytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, **2001**.
- ³ E. A. Bell, B. V. Charlwood (Editoren). *Secondary plant products (Encyclopedia Plant Physiology, Vol. 8)*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1980**.
- ⁴ C. M. Taylor. *Opera Botanica Belgica*, **1996**, 7, 261-270.
- ⁵ C. W. Hamilton. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **1989**, 76, 67-111.
- ⁶ G.M. Hatfield, L. Arteaga, J. D. Dwyer, T.D. Arias, M.P. Gupta. *Journal of Natural Products*, **1981**, 44, 452-456.
- ⁷ C. Rätsch, *Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen*, 2. Auflage, AT Verlag, Aarau, **1998**.
- ⁸ S. V. Beyer, *Singing to the Plants*, University of New Mexico Press, **2009**.
- ⁹ L. Rogers. *British Medical Journal*, **1912**, 2, 405-408.
- ¹⁰ M. Nepokroeff, B. Bremer, K. J. Sysma. *Systematic Botany*, **1999**, 24, 5-27.
- ¹¹ J. J. Maresh, L. A. Giddings, A. Friedrich, E. A. Loris, S. Panjekar, B. L. Trout, J. Stockigt, B. Peters, S. E. O'Connor. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, 130, 710-723.
- ¹² S. Lopes, G. L. von Poser, V. A. Kerber, F. M. Farias, E. L. Konrath, P. Moreno, M. E. Sobral, J. A. S. Zuanazzi, A. T. Henriques. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 1187-1195.
- ¹³ <http://www.regenwald.at>, (27.12.2010).
- ¹⁴ S. E. O'Connor, J. J. Maresh. *Natural Products Reports*, **2006**, 23, 532-547.
- ¹⁵ I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, J. P. Burnett. *Cancer Research*, **1963**, 23, 1390-1427.
- ¹⁶ S. Rolf, H-J. Bruns, T. Wichter, P. Kirchhof, M. Ribbing, K. Wasmer, M. Paul, G. Breithardt, W. Haverkamp, L. Eckardt. *European Heart Journal*, **2003**, 24, 1104-1112.
- ¹⁷ D. D. Porto, A. T. Henriques, A. G. Fett-Neto. *Open Bioactive Compounds Journal*, **2009**, 2, 29-36.
- ¹⁸ Z. Shen, W. Eisenreich, T. M. Kutchan. *Phytochemistry*, **1998**, 48, 293-296.
- ¹⁹ B. Herissat, *Biochemical Journal*, **1991**, 280, 309-316.
- ²⁰ Jürgen Kopp, Dissertation Kristallstrukturanalysen der D-Ribulose-5-phosphat 3-Epimerase aus *Solanum tuberosum* und der der β -Glucosidase aus *Pyrococcus furiosus*, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Albert-Ludwig-Universität Freiburg im Breisgau, **1998**.
- ²¹ A. White, D. R. Rose. *Current Opinion in Structural Biology*, **1997**, 7, 645-651.
- ²² C. Tyl, S. Felsinger, L. Brecker. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, **2004**, 28, 55-63.
- ²³ T. Kaper, J. H. G. Lebbink, J. Pouwels, J. Kopp, G. E. Schulz, J. van der Oost, W. M. de Vos. *Biochemistry*, **2000**, 39, 17, 4963-4970.

-
- ²⁴ K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede. *Bioinformatics*, **2006**, 22, 195-201.
- ²⁵ T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch. *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, 3381-3385.
- ²⁶ N. Guex, M. C. Peitsch. *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2714-2723.
- ²⁷ M. Mayer, B. Meyer. *Angewandte Chemie International Edition*, **1999**, 38, 1784-1788.
- ²⁸ M. Mayer, B. Meyer. *Angewandte Chemie*, **1999**, 111, 1902-1906.
- ²⁹ F. Jensen. *Introduction to Computational Chemistry Second Edition*, Wiley, The Atrium, Southern Gate, West Sussex, **2008**.
- ³⁰ W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Jr. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 5179-5197.
- ³¹ B. R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus. *Journal of Computational Chemistry*, **1983**, 4, 187-217.
- ³² W. R. P. Scott, P. H. Huenenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. R. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Krueger, W. F. van Gunsteren. *Journal of Physical Chemistry A*, **1999**, 103, 3596-3607.
- ³³ W. Nernst. *Königliche Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen*, **1906**, 1, 1-40.
- ³⁴ M. Tswett. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **1906**, 24, 384-393.
- ³⁵ M. Tswett. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **1906**, 24, 235-244.
- ³⁶ A. Talamona. *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium*, **1987**, 31, 205-206.
- ³⁷ M. Karplus. *Journal of Chemical Physics*, **1959**, 30, 11-15.
- ³⁸ M. Karplus. *Journal of the American Chemical Society*, **1963**, 85, 2870-2871.
- ³⁹ R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, **1987**.
- ⁴⁰ A. W. Overhauser. *Physical Review*, **1953**, 92, 411-415.
- ⁴¹ M. Yamashita, J. B. Fenn. *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 88, 4451-4459.
- ⁴² F. Lottspeich, H. Zorbas. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, **1998**.
- ⁴³ W. Demtröder. *Experimentalphysik 1*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **2006**.
- ⁴⁴ R. Wajda, M. König, H. Ludwig, S. Mronga, H. Friebolin. *Carbohydrate Research*, **1992**, 235, 259-267.
- ⁴⁵ H. Lineweaver. D. Burk. *Journal of the American Chemical Society*, **1934**, 56, 658-666.
- ⁴⁶ P. M. Morse. *Physical Review*, **1929**, 34, 57-64.
- ⁴⁷ J. E. Lennard-Jones. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, **1924**, 106, 441-462.

-
- ⁴⁸ R. A. Buckingham. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **1938**, 168, 264-283.
- ⁴⁹ <http://www.chemcomp.com/index.htm>, (28.12.2010).
- ⁵⁰ <http://www.schroedinger.com>, (28.12.2010).
- ⁵¹ W. G. B. Voorhorst, Y. Gueguen, A. C. M. Geerling, G. Schut, I. Dahlke, M. Thomm, J. Van der Oost, W. M. De Vos. *Journal of Bacteriology*, **1999**, 181, 3777-3783.
- ⁵² Y. I. Chi, L. A. Martinez-Cruz, J. Jancarik, R. V. Swanson, D. E. Robertson, S. H. Kim. *FEBS Letters*, **1999**, 445, 375-383.
- ⁵³ H. Morita, Y. Ichihara, K. Takeya, K. Watanabe, H. Itokawa, M. Motidome. *Planta Medica*, **1989**, 55, 288-289.
- ⁵⁴ M. Nonato, R. J. W. Truscott, J. A. Carver, M. E. Hemling, M. J. Garson. *Planta Medica*, **1995**, 61, 278-280.
- ⁵⁵ J. F. Zhao, Q. M. Yuan, X. D. Yang, H. B. Zhang, L. Li. *Helvetica Chimica Acta*, **2005**, 88, 2532-2536.
- ⁵⁶ D. H. He, J. S. Chen, X. L. Wang, K. Y. Ding. *Chinese Chemical Letters*, **2010**, 21, 437-439.
- ⁵⁷ H. Inouye, S. Inouye, N. Shimokawa, M. Okigawa. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1969**, 17, 1942-1969.
- ⁵⁸ D. Arbain, D. P. Putra, M. V. Sargent. *Australian Journal of Chemistry*, **1993**, 46, 977-985.
- ⁵⁹ C. A. do Nascimento, M. S. Gomes, L. M. Lião, C. M. A. de Olivera, L. Kato, C. C. da Silva C. M. A. Tanaka. *Zeitschrift für Naturforschung*, **2006**, 61, 1443-1446.
- ⁶⁰ R. Aquino, L. Garofalo, N. de Tommasi, O. L. de Ugaz, C. Pizza. *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1471-1475.
- ⁶¹ A. Itoh, Y. Baba, T. Tanahashi, N. Nagakura. *Phytochemistry*, **2002**, 59, 91-97.
- ⁶² N. Nagakura, A. Itoh, T. Tanahashi. *Phytochemistry*, **1993**, 32, 761-765.
- ⁶³ M. Bernhard, H. Fasshuber, W. Robien, L. Brecker, H. Greger. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29.12.2010** eingereicht.
- ⁶⁴ L. Brecker, G. D. Straganz, C. E. Tyl, W. Steiner, B. Nidetzky. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 42, 85-89.
- ⁶⁵ X. Ma, S. Panjikar, J. Koepke, E. Loris, J. Stoeckigt. *Plant Cell*, **2006**, 18, 907-920.

Curriculum vitae

Hannes Klaus Faßhuber
geboren am 25. September 1979 Judenburg

Ausbildung

2004-	Studium der Chemie an der Universität Wien
1998-2001	Gesundheits- und Krankenpflegerschule AKH Wien
1997	Präsenzdienst Fliegerhorst Zeltweg
1994-1996	BORG für Leistungssport Monsbergergasse Graz
1990-1994	BG /BRG Judenburg
1986-1990	Volksschule Judenburg

Beruflicher Werdegang

2002-2009	Gesundheits- und Krankenpfleger, Pflegewohnheim ÖJAB-Neumagareten
2001-2002	Gesundheits- und Krankenpfleger, AKH Wien

Universitäre Tätigkeit

WS 2010	Tutor Chemische Übungen für Biologen und Ernährungswissenschaftler, Institut Organische Chemie
WS 2007	Tutor Mathematik für ChemikerInnen, Institut Physikalische Chemie