

**Auffinden von Inhibitoren der tRNA-Guanin
Transglykosylase (TGT) und der Insulin-like Growth
Factor 1 Receptor Tyrosine Kinase (IGF-1-RTK) aus
Pflanzenextrakten durch Ligandenfischen sowie deren
Isolierung und Identifizierung**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Daniela Heller
aus Hildburghausen**

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 15. Dezember 2005 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Matusch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hanefeld

Tag der mündlichen Prüfung am: 15. Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit entstand am
Fachbereich Pharmazie
im Institut für Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Rudolf Matusch

Für das interessante Themengebiet, seine stets großzügige Unterstützung sowie für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des TGT-Projektes. Den (ehemaligen) Mitgliedern seines Arbeitskreises, Frau Dr. Ruth Brenk und Herrn Bernhard Stengl, danke ich besonders für die Bereitstellung der TGT, für die Bestimmung der K_i -Werte sowie für die Durchführung der kristallographischen Experimente. Herrn Bernhard Stengl möchte ich weiterhin für das Korrekturlesen von Teilen des Manuskriptes danken.

Der ASTA Medica AG, Frankfurt/Main, danke ich für die Bereitstellung der IGF-1-RTK.

Für so manche hilfreiche Hand im Labor, die Geräte- und Softwareeinführungen sowie besonders für die Unterstützung bei präparativen Trennungen möchte ich mich herzlich bei Herrn Floris van Elsäcker bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der NMR-Abteilung unter Leitung von Herrn Dr. Thomas Kämpchen danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeiterinnen der massenspektrometrischen Abteilung.

Für die nette Zusammenarbeit im und zahlreiche fröhliche Stunden außerhalb des Labors möchte ich all meinen Kolleginnen und Kollegen sehr herzlich danken.

Bei Frau Pia Konstanze An möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders für die ständige Diskussionsbereitschaft und das nette, unkomplizierte WG-Leben bedanken.

Ich danke meinen Literaturarbeitern, insbesondere Frau Nadine Winkler, deren Ergebnisse zum Teil in diese Arbeit eingeflossen sind.

Meiner Familie danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und für die vielen aufbauenden Gespräche in schwierigen Phasen.

Herzlich danke ich auch meinen Berliner Freunden, insbesondere Herrn André Schneider, für die Unterstützung, gerade in der Schlussphase der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt schließlich Herrn Henryk Dingel für das Korrekturlesen des Manuskriptes, so manche Hilfe bei der Lösung von Computerproblemen, die aufgebrauchte Geduld und die spontane Überwindung einer Distanz von 500 km.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Aufgabenstellung.....	5
3 Pathologisches Geschehen und ausgewählte Targets.....	7
3.1 Shigellenruhr.....	7
3.1.1 Zelluläre und molekulare Betrachtungen der Pathogenese der Shigellenruhr.....	8
3.1.1.1 Funktion der TGT in der Pathogenese.....	13
3.1.1.2 Katalytischer Mechanismus der TGT.....	15
3.1.1.3 Strukturvarianten der TGT.....	17
3.1.2 Strukturelle Betrachtungen der <i>Zymomonas mobilis</i> -TGT.....	19
3.2 Krebs.....	22
3.2.1 Die Rolle von IGF-1 und seinem Rezeptor im Zellzyklus.....	22
3.2.2 Struktur und Autophosphorylierung der IGF-1-RTK.....	26
4 Auswahl der zu untersuchenden Pflanzen.....	31
4.1 Pflanzenauswahl.....	31
4.1.1 Auswahlkriterien für die Untersuchungen mit TGT.....	31
4.1.2 Auswahlkriterien für die Untersuchungen mit IGF-1-RTK.....	33
4.2 <i>Passiflora incarnata</i> L.	33
4.2.1 Verbreitung und taxonomische Einordnung.....	34
4.2.2 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung von <i>Passiflorae herba</i>	34
4.2.3 Inhaltstoffe der Droge <i>Passiflorae herba</i>	36

4.3	Aspidosperma quebracho-blanco SCHLECHT.	37
4.3.1	Verbreitung und botanische Beschreibung	37
4.3.2	Quebracho cortex	39
4.3.2.1	Quebracho-Alkaloide	39
4.4	Centella asiatica (L.) URBAN	41
4.5	Glycyrrhiza glabra L.	42
4.6	Solanum dulcamara L.	42
5	Ligandenfischen	45
5.1	Prinzip und Durchführung der Bindungsexperimente	46
5.1.1	Theoretische Betrachtungen der Vorgänge während der Inkubation.....	47
5.1.2	Praktischer Ablauf der Inkubation	52
5.1.3	Filtration des Inkubationsansatzes	53
5.1.4	Waschungen	53
5.1.5	Freisetzung	53
5.1.6	Vermessung und Auswertung der mit dem Ligandenfischen erhaltenen Proben	54
5.1.7	Abschließende Bemerkungen zur Methode des Ligandenfischens.....	54
5.2	Ergebnisse der Ligandenfischversuche mit TGT	56
5.2.1	Einstellung der Versuchsbedingungen für das Ligandenfischen mit TGT	56
5.2.2	Erfolgreich verlaufene Ligandenfischversuche mit TGT aus verschiedenen Pflanzenextrakten	60
5.2.2.1	Ligandenfischen aus einem Passiflorae herba-Extrakt	60
5.2.2.2	Ligandenfischen aus Extrakten aus Centellae asiaticae herba	63
5.2.2.3	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus Solanum dulcamara L.....	64
5.2.3	Ligandenfischversuche mit TGT aus verschiedenen Pflanzenextrakten ohne Feststellung einer Proteinbindung	71
5.2.4	Ligandenfischen mit verschiedenen Einzelsubstanzen	71
5.2.5	Ergebnisse im Hinblick auf eine Verbesserung der K_i -Wert-Grenze	75

5.3	Ergebnisse der Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK.....	76
5.3.1	Ligandenfischen aus Extrakten aus Liquiritiae radix	76
5.3.2	Ligandenfischen aus Extrakten aus Lichen islandicus	79
5.3.3	Ligandenfischen aus Extrakten aus Passiflorae herba	80
5.3.4	Ligandenfischen aus selektiven Extrakten aus Quebracho cortex.....	81
5.3.4.1	Ligandenfischen aus Fraktionen des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex.....	85
5.3.5	Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK aus verschiedenen Pflanzenextrakten ohne Feststellung einer Proteinbindung.....	89
6	Isolierung und Identifizierung der gefischten Substanzen.....	91
6.1	Bearbeitung des methanolisch-wässrigen Extraktes aus Passiflorae herba	91
6.1.1	Isolierung der wirksamen Substanz aus Fraktion 12	94
6.1.2	Isolierung weiterer Substanzen aus den Fraktionen 6, 7, 11 und 14	95
6.1.3	Strukturaufklärung der aus Passiflorae herba isolierten Substanzen.....	98
6.1.3.1	Isovitexin-2''-O- β -glucosid (1)	98
6.1.3.2	Isovitexin (2).....	105
6.1.3.3	Vitexin (3).....	107
6.1.3.4	Schaftosid (4).....	109
6.1.3.5	Isoschaftosid (5).....	110
6.2	Bearbeitung des Trockenextraktes aus Solanum dulcamara L.	113
6.3	Herstellung selektiver Extrakte aus Quebracho cortex im präparativen Maßstab.....	117
6.4	Bearbeitung der selektiven Extrakte aus Quebracho cortex	119
6.4.1	Extrographische Fraktionierung des selektiven Dichlormethanextraktes	122
6.4.1.1	Analytische Entwicklung einer Normalphasen-Gradientenextrographie	122
6.4.1.2	Präparative Durchführung der Gradientenextrographie	126

6.4.2	Analytik der erhaltenen Extrographiefraktionen.....	127
6.4.3	Isolierung der durch Ligandenfischen gefundenen Substanzen aus den Extrographiefraktionen	129
6.4.3.1	Bearbeitung der Fraktionen 14 – 16.....	130
6.4.3.2	Bearbeitung der Fraktion 34	132
7	Verifizierung der Wirksamkeit der aus <i>Passiflora incarnata</i> L. isolierten Substanzen.....	135
7.1	Enzymassay mit der <i>Z. mobilis</i> TGT	135
7.1.1	Unspezifische Inhibition (Promiskuität)	137
7.1.2	Revalidierung der Inhibitionskonstanten	138
7.2	Kristallographische Versuche	142
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	143
9	Experimenteller Teil.....	147
9.1	Allgemeine Methoden und Materialien	147
9.1.1	Ligandenfischen	147
9.1.1.1	Geräte für das Ligandenfischen	147
9.1.1.2	Lösungen für das Ligandenfischen	148
9.1.1.3	Für das Ligandenfischen verwendete Proteine	149
9.1.1.4	Inkubation	150
9.1.1.5	Ultrafiltrationsmethoden	150
9.1.1.6	Trocknung der Proben.....	150
9.1.1.7	Ligandenfischversuche mit TGT.....	151
9.1.1.7.1	Ligandenfischen mit 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid.....	151
9.1.1.7.2	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Passiflorae herba</i>	153
9.1.1.7.3	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Centellae asiaticae herba</i>	156
9.1.1.7.4	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Solanum dulcamara</i> L.....	157
9.1.1.7.5	Ligandenfischen aus Extrakten der Zwiebel von <i>Allium sativum</i> L.....	161

9.1.1.7.6	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Chelidonii herba</i>	161
9.1.1.7.7	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Crataegus</i> -Arten.....	162
9.1.1.7.8	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Millefolii herba</i>	162
9.1.1.7.9	Ligandenfischen aus Opiumtinktur.....	163
9.1.1.7.10	Ligandenfischen aus Extrakten aus <i>Quebracho cortex</i>	164
9.1.1.7.11	Ligandenfischen aus einem methanolischen Extrakt aus <i>Rauwolfiae radix</i> 165	
9.1.1.7.12	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Urticae folium</i>	166
9.1.1.7.13	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Vitex agnus-castus L.</i>	166
9.1.1.7.14	Ligandenfischen mit verschiedenen Einzelsubstanzen.....	167
9.1.1.8	Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK.....	170
9.1.1.8.1	Ligandenfischen aus Extrakten aus <i>Centellae asiaticae herba</i>	170
9.1.1.8.2	Ligandenfischen aus Extrakten aus <i>Liquiritiae radix</i>	171
9.1.1.8.3	Ligandenfischen aus Extrakten aus <i>Lichen islandicus</i>	172
9.1.1.8.4	Ligandenfischen aus Opiumtinktur.....	173
9.1.1.8.5	Ligandenfischen aus einem Extrakt aus <i>Passiflorae herba</i>	173
9.1.1.8.6	Ligandenfischen aus einem selektiven Dichlormethanextrakt aus der Rinde von <i>Prunus africana</i> (HOOK. F.) KALKM.....	174
9.1.1.8.7	Ligandenfischen aus selektiven Extrakten aus <i>Quebracho cortex</i> sowie deren Fraktionen	175
9.1.1.8.8	Ligandenfischen aus einem Trockenextrakt aus <i>Solanum dulcamara L.</i>	178
9.1.2	Chromatographie	179
9.1.2.1	HPLC-Geräte	179
9.1.2.2	Übersicht über die verwendeten kapillaren (K) und analytischen (A) HPLC-Systeme	181
9.1.2.3	Übersicht über die verwendeten präparativen HPLC-Systeme	184
9.1.2.4	Verwendete Lösungsmittel	186
9.1.3	Spektroskopische Methoden	186

9.1.3.1	NMR-Spektroskopie	186
9.1.3.2	Massenspektroskopie	187
9.1.4	Weitere analytische Methoden.....	187
9.1.4.1	Schmelzpunktbestimmung	187
9.2	Herstellung der Pflanzenextrakte	187
9.2.1	<i>Allium sativum</i> L.	187
9.2.1.1	Herstellung eines ethanolischen Mazerates aus dem Pulver der Zwiebel	187
9.2.1.2	Herstellung eines ethanolischen Extraktes aus der frischen Zwiebel	188
9.2.1.3	Herstellung eines wässrigen Extraktes aus der frischen Zwiebel	188
9.2.2	<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i> SCHLECHT.	189
9.2.2.1	Selektive Extrakte im analytischen Maßstab	189
9.2.2.2	Selektive Extrakte im präparativen Maßstab	190
9.2.3	<i>Centella asiatica</i> (L.) URBAN	191
9.2.4	<i>Cetraria islandica</i> L.	192
9.2.5	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	192
9.2.6	<i>Papaver somniferum</i> L. ssp. <i>somniferum</i>	192
9.2.7	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	193
9.3	Verwendete Trockenextrakte	193
9.4	Bearbeitung verschiedener Extrakte und Isolierung von Reinsubstanzen	193
9.4.1	Bearbeitung des Trockenextraktes aus <i>Passiflorae herba</i>	193
9.4.1.1	Isolierung von Reinsubstanzen aus den Fraktionen des Trockenextraktes	195
9.4.2	Bearbeitung des Trockenextraktes aus <i>Solanum dulcamara</i> L.	198
9.4.3	Bearbeitung des selektiven Dichlormethanextraktes aus <i>Quebracho cortex</i>	200
9.4.3.1	Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode	200
9.4.3.2	Präparative Gradientenextrographie	201

9.4.3.3	Isolierung von Substanzen aus den Extrographiefraktionen.....	204
9.5	Verzeichnis der isolierten Substanzen	205
9.5.1	Isovitexin-2''- <i>O</i> - β -glucosid (1)	205
9.5.2	Isovitexin (2).....	207
9.5.3	Vitexin (3).....	209
9.5.4	Schaftosid (4).....	211
9.5.5	Isoschaftosid (5).....	213
9.5.6	Aspidospermin (6)	215
	Literatur- und Quellenverzeichnis	217

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (1 Ångström entspricht 10^{-1}nm)
^{13}C -NMR	breitbandenkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum
^1H -NMR	vollständig gekoppeltes ^1H -NMR-Spektrum
Abb.	Abbildung
AdoMet	S-Adenosylmethionin
AMP - PCP	β,γ -C-Methylenadenosin 5'-triphosphat
APT	Attached Proton Test
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUC	Area under the curve
BCL – X _L	B-cell lymphoma X _L protein
BCL 2	B-cell lymphoma 2 protein
BENTHAM ex KURZ	Bentham, G. aus Kurz, W. S.
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
C – Ara	C-glycosidisch verknüpfte Arabinose
C – Gluc	C-glycosidisch verknüpfte Glucose
CapLC	Kapillarhochleistungsflüssigchromatographie
cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
COSY	Correlated Spectroscopy
Cys	L-Cystein

D – Schleife	4 kb große Substruktur von tRNAs, deren Basensequenz häufig Dihydrouridin beinhaltet
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DC.	De Candolle, A. P.
<i>ddd</i>	Dubletts von Dubletts vom Dublett
DEA	Diethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-D6	Deutero-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELSD	Evaporative-Light-Scattering-Detector (Lichtstredetektor)
emend.	abgeändert durch
ETH-Zürich	Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (Schweiz)
F - Aktinschwanz	Struktur aus filamentärem Aktin
GABA	Gammaaminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Gln	L-Glutamin
Gly	L-Glycin
Grb-2	„Growth factor receptor bound protein 2“; cytoplasmatisches Adapter Protein
GRIN/DBMU	The Germplasm Resources Information Network Database Management Unit
GST	Glutathion S-transferase

GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPasen	Familie GTP-bindender und -hydrolysierender Enzyme
GUN	Aminosäuresequenz: Asparagin - Uracil - weitere Aminosäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His	L-Histidin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA – B27	Human Leukocyte Antigen B*27
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOOK. fil.	Hooker, J. D. (Sohn)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	High Resolution
html	hyper text mark up language
HTS	High Throughput Screening
http	hyper text transfer protocol
i.v.	intravenös
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1-RTK	Insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase
IL	Interleukin
Ipa A - D	Invasionsproteine A - D
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JACQ.	Jacquin, N. J. Baron von
K _a	Assoziationskonstante
KALKM.	Kalkman, C.
kb	Kilobasen

K_D	Dissoziationskonstante
K_i	inhibitorische Konstante
K_M	Michaelis-Konstante
Kommission D	Kommission des BfArM für homöopathische Arzneimittel
L.	Linné, C. Ritter von
LINDM.	Lindman, C. A. M.
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MART. ET ZUCC.	Martius, C. Fr. Ph. Von Zuccarini, J. G.
Met	L-Methionin
MG	Molekulargewicht
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
MM	maligne Melanome
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NGRL	National Germplasm Resources Laboratory's
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NMWL	Norminal Molecular Weight Limits
N-WASP	neuronalen Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
O - Antigen	Polysaccharid-Seitenkette gramnegativer Bakterien
oQ	Epoxy-Queuosin
PDA	Photodiodenarray
PhoP	virulence transcriptional regulatory protein
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMN – Zellen	Polymorphonucleare Zellen

POIR.	Poiret, J. L. M.
PP	Polypropylen
ppm	parts per million
preQ ₀	7-Cyano-7-deazaguanin
preQ ₁	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Queuosin
QueA	S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase
QueF	NADPH-abhängige Oxidoreduktase der Queuosinbiosynthese
Rac	GTPase aus der Rho-Familie
RAS	Familie von proto-Onkogenen
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed-Phase-Chromatographie = Umkehrphasen- chromatographie
RT	Raumtemperatur
S&S	Schleicher & Schüll, Dassel (Deutschland)
<i>S. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
s. l.	sensu longo (lat.) = im weiteren Sinne
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
SCHLECHT.	Schlechtendal, D. F. L. von
Shc	src homology and collagen protein
SIMS.	Sims, J.

SOS	"GTP-GDP exchange factor"; Abkürzung aufgrund der Homologie mit einem Protein aus <i>Drosophila</i> , das die Signaltransduktion des Gens "sevenless" reguliert ("son of sevenless")
sp.	Species, Art
src	rous Asian sarcoma tyrosine kinase
ssp.	Subspecies, Unterart
stip.	stipites = Stängel
TFA	Trifluoressigsäure
TGT	t-RNA-Guanin-Transglykosylase
TIC	total ion current
TIM – barrel	faßähnliches Faltungsmuster von Proteinen; erstmals entdeckt bei der Triosephosphat-Isomerase
TMS	Tetramethylsilan
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
tRNA	Transferribonukleinsäure
Tyr	L-Tyrosin
URBAN	Urban, J.
UV	ultraviolett / Ultraviolettspektroskopie
VirF	Virulenzfaktor F
VirG	Virulenzfaktor G
WHO	World Health Organisation
www	world wide web
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

1 Einleitung

Als im April 2003 durch Wissenschaftler des internationalen Konsortiums des Human-Genom-Projektes der Abschluss der Sequenzierung des menschlichen Erbgutes bekannt gegeben wurde, lagen bis dahin über 98 % der genetischen Information des Menschen mit einer Genauigkeit von 99,99 % entschlüsselt vor [1].

Ein Ziel dieser Forschung war, ist und bleibt, neben der Sequenzierung der humanen Erbinformationen, das Verstehen von Krankheiten sowie deren Heilungsmöglichkeiten. Vor allem erhofft man sich Fortschritte bei der Diagnose und Therapie von Herzerkrankungen, Krebs, Diabetes und Schizophrenie.

Um eine Krankheit verstehen und in das pathologische Geschehen eingreifen zu können, müssen krankheitsrelevante Gene und die von ihnen codierten Proteine identifiziert werden. Nicht zuletzt stieg durch die Arbeit an der Sequenzierung des menschlichen Genoms die Zahl der als pathologisch relevant identifizierten Gene bis zum Jahr 2003 auf etwa 1300 an [2].

Ein wichtiger Startpunkt für die Erforschung und die Entwicklung von Substanzen, die als Arzneimittel dienen könnten, sind die von den Genen codierten, pathologisch relevanten Proteine, die so genannten Targets. Vor der Entschlüsselung des menschlichen Genoms waren kaum mehr als 500 solcher Targets, die in der Arzneimittelentwicklung eine Rolle spielen, bekannt [3]. Unter anderem durch die Arbeit am Human-Genom-Projekt stieg die Zahl der als pathologisch interessant angesehenen Targets stetig an.

Aber auch die Suche nach neuen Targets in anderen Organismen gewinnt gerade wegen der dramatischen Zunahme von multiresistenten Bakterienstämmen, zu denen auch einige Zelllinien der Gattung *Shigella* gehören, wieder an Bedeutung [4] [5] [6].

Ist ein geeignetes Target gefunden, beginnt die Suche nach einer Leitstruktur für Liganden dieses Zielmoleküls. Für die Leitstruktursuche werden verschiedene Methoden herangezogen:

Beim High-Throughput-Screening (HTS) werden Molekülbibliotheken *in vitro* auf Aktivität durchmustert. Die große Anzahl an zu testenden Verbindungen wird dazu durch Verfahren der kombinatorischen Chemie bereitgestellt. Durch Automatisierung ist

es möglich, in sehr kurzer Zeit sehr viele Verbindungen zu testen. Allerdings sind die Erfolgsquoten ernüchternd [7]. Sie liegen oft unter 0,1 %, gemessen an der Anzahl der untersuchten Verbindungen [8].

Einen anderen Ansatz zum Auffinden von biologisch aktiven Substanzen stellen Dockingmethoden dar. Dabei werden durch virtuelles Screening von Datenbanken unter Angabe bestimmter struktureller Parameter, die sich aus Informationen des Aufbaus der Bindetasche des Zielproteins ableiten, wenige Verbindungen herausgefiltert, die wahrscheinlich biologische Aktivität aufweisen. Diese müssen dann synthetisiert und auf ihre Aktivität getestet werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass Informationen zum Aufbau der Bindetasche des Zielmoleküls oder die Struktur eines Liganden dieses Targets vorliegen müssen [9].

Dem gegenüber stellt die im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch entwickelte Methode des Ligandenfischens ein Verfahren zum Auffinden von biologisch aktiven Substanzen dar, bei dem das Target ganzen Substanzbibliotheken zugeführt werden kann, ohne dass Informationen zum Aufbau des Zielproteins vorhanden oder die Struktur eines Liganden bekannt sein müssen. Die Verbindungen werden hierbei dem Massenwirkungsgesetz folgend entsprechend ihrer Affinität durch das Protein aus dem Substanzpool „gefischt“ [10]. Ob in dem untersuchten Substanzgemisch eine aktive Verbindung, möglicherweise ein Inhibitor für das Targetprotein enthalten ist, wird durch anschließende kapillarchromatographische Vermessung der erhaltenen Proben festgestellt.

Das Ligandenfischen stellt gegenüber dem gerätetechnisch aufwendigeren HTS eine weniger zeitaufwendige sowie kostengünstigere Methode dar. Ein wesentlicher Vorteil des Ligandenfischens besteht in der Möglichkeit, biologisch aktive Substanzkombinationen in Substanzbibliotheken entdecken zu können [10]. Solche komplexen Substanzbibliotheken werden insbesondere durch Naturstoffextrakte repräsentiert.

Naturstoffe spielen in der Arzneimittelforschung wieder zunehmend eine größere Rolle. Nachdem die Ergebnisse aus HTS und kombinatorischer Chemie hinter den Erwartungen zurück blieben, wurde über die Gründe der geringen Erfolgsquoten diskutiert. Dabei gelangte immer mehr das Argument „Qualität statt Quantität“ der Substanzen in den Substanzbibliotheken in den Fokus der Debatte [11] [12]. Unter anderem stellen Naturstoffextrakte solch qualitativ hochwertigere Substanzbibliotheken dar [13]. Dies zeigt

sich auch darin, dass Naturstoffe immer noch die beständigste Quelle zur Auffindung neuer Leitstrukturen für die Arzneimitteltherapie sind. 61 % der zwischen 1981 und 2002 neu zugelassenen Arzneistoffe sind Naturstoffprodukte oder Derivate von diesen. Betrachtet man die Gruppe der Krebstherapeutika, so liegt dieser Anteil bei 74 %; im Falle der Antibiotika sogar bei 79 % [14]. Auch ökonomisch stellen Naturstoffe und ihre Derivate eine wichtige Säule in der Pharmazie dar. So reihte sich das 1994 aus der Pazifischen Eibe isolierte Zytostatikum Paclitaxel im Jahre 2000 auf Platz 25 der weltweit meistverkauften Arzneistoffe ein. Aber auch auf dem Gebiet der DNA-Topoisomerase-I-Inhibitoren, deren Leitstruktur das aus *Camptotheca acuminata* isolierte Camptothecin darstellt, wird weiter geforscht. Exatecan (Daiichi Pharmaceutical) steht in Phase III der klinischen Prüfung und für Rubitecan (SuperGen) wurde die Phase III bereits abgeschlossen. Antibiotisch wirksame Arzneistoffe wurden dagegen bisher vorrangig aus Bakterienstämmen isoliert. Auch diese Naturstoffquelle ist noch immer Gegenstand der aktuellen Forschung [15].

Ein Grund für diesen Erfolg der Naturstoffe bzw. deren Derivate liegt sicherlich in der Tatsache, dass Naturstoffe biologisch vorvalidierte Systeme sind, deren hohe strukturelle Diversität unter anderem auf der Bildung von Sekundärstoffen durch die Pflanze infolge unterschiedlicher biochemischer Einflüsse beruht [13] [16].

Mittels eines detaillierten statistischen Vergleiches der chemischen Struktur von Naturstoffen und Synthetika konnte gezeigt werden, dass Naturstoffe durchschnittlich höhere molekulare Massen aufweisen als synthetisch hergestellte Verbindungen. Auch hinsichtlich der Verteilung von Heteroatomen sowie in der Anzahl der Chiralitätszentren, die bei den Naturstoffen höher ist, unterscheiden sich die Verbindungsklassen. Ebenso besitzen Substanzen natürlichen Ursprungs eine im Mittel höhere Anzahl an Ringen als die synthetischen Vertreter. Naturstoffe stellen somit statistisch die räumlich komplexeren Strukturen dar [17].

Das Potential naturstoffbasierter Substanzbibliotheken ist von vielen Forschern wieder erkannt worden. Eine Betrachtung der Statistik zeigt, dass etwa 40 % der natürlich vorkommenden Strukturen in einer Beispieldatenbank nicht durch synthetisch hergestellte Verbindungen repräsentiert sind (zugrunde gelegte Datenbank: Dictionary of Natural Products, Chapman & Hall) [17]. Daher erscheint insbesondere eine weitere

Untersuchung von Pflanzenextrakten und anderen Quellen biologisch aktiver Naturstoffe, wie z.B. Pilze, Bakterien, Tiere und marine Organismen, hinsichtlich der Entdeckung neuer Strukturen sowie auch hinsichtlich biologischer Aktivität bereits bekannter Naturstoffe an neuen Targets sinnvoll.

2 Aufgabenstellung

Viele Krankheiten scheint der Mensch dank wirksamer Arzneimittel schon „in den Griff bekommen“ zu haben. Doch unter anderem im Falle bakterieller Erkrankungen tauchen neue Probleme in Form von resistenten oder sogar multiresistenten Stämmen auf. Eine Infektion mit Bakterien solcher Stämme kann zu lebensbedrohlichen Situationen führen.

Zu diesen multiresistenten Keimen gehören auch einige Bakterienstämme der Gattung *Shigella* [4] [6]. Deshalb gilt es nun Antibiotika zu entwickeln, die an neuen Zielstrukturen angreifen, damit die schnelle Entstehung einer Kreuzresistenz zunächst ausgeschlossen werden kann. Verschiedene Arbeiten [18] [19] lassen den Schluss zu, dass ein Inhibitor der tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT) ein selektives Antibiotikum gegen Shigellen-Ruhr darstellen sollte, welches die natürliche Darmflora des Menschen nicht schädigt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für das neue Target TGT aus Pflanzenextrakten Inhibitoren bzw. eine neue Leitstruktur für Inhibitoren zu isolieren und zu identifizieren. Dazu sollte das Ligandenfischen als Methode zur Identifizierung potentieller Inhibitoren in komplexen Naturstoffextrakten dienen.

Mit derselben Methode sollten ebenfalls aus Pflanzenextrakten Inhibitoren für die Insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase (IGF-1-RTK) gefunden, mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Methoden isoliert und mit gängigen Verfahren der Strukturaufklärung identifiziert werden. IGF-1-RTK stellt dabei ein Target aus der Krebsforschung dar, das im Proliferationszyklus der menschlichen Zelle eine wichtige Schaltstelle einnimmt.

Krebs ist die Ursache von ca. 12 % aller Todesfälle weltweit. Nach den kardiovaskulären Erkrankungen stellt Krebs damit die zweithäufigste Todesursache in Industrieländern dar. Jährlich werden weltweit über zehn Millionen Krebsneuerkrankungen registriert. Über die Hälfte davon tritt in Entwicklungsländern auf. Die World Health Organisation (WHO) schätzt, dass in den kommenden 20 Jahren die Anzahl der Neuerkrankungen auf 15 Millionen und die der tödlich endenden Krebserkrankungen von derzeit sechs auf zehn Millionen Fälle pro Jahr steigen wird [20].

3 Pathologisches Geschehen und ausgewählte Targets

3.1 Shigellenruhr

Die Shigellenruhr, auch Bakterienruhr, Shigellose oder Dysenterie genannt, ist eine durch Infektion mit Shigellen hervorgerufene Dickdarmerkrankung.

Shigellen sind unbewegliche, sporenlose, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe, gram-negative Bakterien der Gattung *Shigella* aus der Familie der Enterobacteriaceae. Nach ihren biochemischen Merkmalen und spezifischen O-Antigenen werden sie in die vier Untergruppen *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* und *S. sonnei* eingeteilt. Die ersten drei der genannten Spezies können weiterhin in verschiedene Serotypen unterteilt werden.

Die Pathogenität und das geographische Auftreten der vier Spezies sind unterschiedlich. Nur durch *S. dysenteriae* Serotyp 1 („Shiga bacillus“) wird die epidemische Form der Shigellose hervorgerufen. Infektionen mit *S. dysenteriae* Serotyp 1 haben vor allem wegen des durch ihn produzierten neurotoxischen Exotoxins (Shigatoxin) einen oft tödlichen Ausgang. Endemisch treten *S. sonnei* vor allem in Industrieländern und *S. flexneri* vor allem in Entwicklungsländern auf. Infektionen mit *S. boydii* werden dagegen meist in Vorderasien und in Nordafrika beobachtet [6] [21].

Eine Infektion mit Shigellen kann symptomlos verlaufen. In der Regel aber wird durch die Invasion der Shigellen eine akute lokale Entzündung des Dickdarms hervorgerufen, die mit kolikartigen Bauchschmerzen, schmerzhaften Tenesmen, Fieber sowie Erbrechen und starkem Durchfall mit anfangs wässrigen, später blutig-schleimigen Stühlen einhergeht. Besonders bei Kindern, alten Menschen und Menschen mit geschädigtem Immunsystem, z.B. HIV-Infizierten, können schwere, zum Teil tödliche Verläufe der Erkrankung mit Bewusstseinsverlust, Meningismus, Exikkose und hohem Fieber auftreten. Durch die Schädigung der Schleimhautbarriere im Darm ist es möglich, dass zusätzlich andere Keime in die Blutbahn gelangen und so zu einer Sepsis führen. Unbehandelt können die Geschwüre die Darmwand durchbrechen und dann eine lebensgefährliche Peritonitis verursachen. Bei besonderer genetischer Disposition (HLA-B27 positiv) und

chronischer Infektion ist mitunter die Ausbildung des Reiter-Syndroms (einseitige Entzündungen der großen Gelenke, Bindehaut- und Harnröhrenentzündung) zu beobachten [22].

Die Shigellenruhr ist weltweit endemisch. Jährlich erkranken etwa 165 Millionen Menschen, davon ca. 99 % in den Entwicklungsländern. Jedes Jahr sterben etwa 1,1 Millionen Menschen an dieser Infektionskrankheit, wobei mehr als 60 % davon Kinder bis zu einem Alter von fünf Jahren sind [22].

Shigellen werden oral-fäkal über kontaminierte Lebensmittel meist infolge mangelnder Hygiene übertragen. Auch kontaminiertes Trinkwasser sowie Fliegen kommen für die Übertragung der Erreger in Frage [21]. Das einzige Reservoir für Shigellen ist der Mensch. Außerhalb des menschlichen Körpers können die Erreger nur kurze Zeit überleben.

Shigellen sind hochinfektiös. Nur 10 – 100 dieser Bakterien sind für den Ausbruch der Krankheit ausreichend.

Zur Behandlung einer Shigelleninfektion wird Ciprofloxacin als first-line-Therapeutikum empfohlen. Daneben findet Nalidixinsäure noch vielfach Verwendung. Doch steigt auch hier die Anzahl der gegen dieses Antibiotikum resistenten Stämme. Da sowohl Ciprofloxacin als auch Nalidixinsäure zur Gruppe der Chinolone gehören, ist eine Kreuzresistenz gegen Ciprofloxacin bei bereits gegen Nalidixinsäure resistenten Keimen zu erwarten. Erste Hinweise darauf ergeben Beobachtungen, nach denen die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) für Ciprofloxacin bei Nalidixinsäure-resistenten Shigellenstämmen angestiegen ist [23] [24]. Die gängigen Antibiotika Tetracyclin und Ampicillin und sowie die Kombination von Trimethoprim mit Sulfamethoxazol sind resistenzbedingt nicht mehr effektiv bei Shigelleninfektionen [6] [23]. Aufgrund dieser rasanten Resistenzentwicklung ist die Entwicklung neuer, spezifischer Antibiotika dringend erforderlich. Daneben wird derzeit an der Entwicklung von Impfstoffen gearbeitet [22] [25].

3.1.1 Zelluläre und molekulare Betrachtungen der Pathogenese der Shigellenruhr

Shigellen benutzen den Menschen als Wirtsorganismus für ihre Vermehrung. Nach oraler Aufnahme dringen sie dazu in die Epithelzellen der Dickdarmwand ein. Dafür

benötigen die Bakterien eine Reihe von Virulenzfaktoren, die hauptsächlich auf dem 230 kb großen Virulenzplasmid, zum Teil aber auch auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sind.

Eingehend wurde die Pathogenese der Shigellenruhr an *Shigella flexneri* untersucht. Da Shigellen nur von der basalen Seite in die Colonepithelzellen eindringen können [26], müssen sie zunächst durch das Epithel hindurch gelangen. Es wurden verschiedene Wege gefunden, auf denen das Bakterium diese Zellbarriere überwinden kann:

S. flexneri ist in der Lage, die „tight junctions“ zwischen den Epithelzellen zu manipulieren und so die basale Seite des Colonepithels zu erreichen. Erste Untersuchungen zu den dabei genau ablaufenden Vorgängen zeigen, dass *S. flexneri* nach Kontakt mit den „tight junctions“ durch verschiedene Mechanismen in die Regulation von transmembran-assoziierten Proteinen eingreifen kann (Ziff. 1, Abb. 1) [27].

Die von *S. flexneri* hauptsächlich genutzte Möglichkeit zur Basalseite der Epithelzellschicht vorzudringen, ist die Ausnutzung von in diesem Gewebe häufig vorkommenden M-Zellen. Diese besitzen eine aus ihrer basolateralen Zellmembran gebildete Tasche, in der sich Makrophagen und Lymphozyten befinden. Die Bakterien werden in die Makrophagen aufgenommen. *S. flexneri* kann sich durch IpaB-vermittelte Lyse aus der phagozytierenden Vakuole der Makrophagen befreien. IpaB, einer der vier durch das *ipa*-Operon codierten Virulenzfaktoren Ipa A-D, wird in das Zytosol der Makrophage sezerniert und aktiviert dort Caspase-1, die ihrerseits die entzündungsfördernden Interleukine IL-1 β und IL-18 in ihre aktiven Formen überführt. Dies erklärt zum Teil die heftige Entzündung des Darmepithels, die durch Shigellen verursacht wird. Caspase-1 wirkt weiterhin pro-apoptotisch auf den Makrophagen, der somit das Bakterium, neben einer massiven Freisetzung von IL-1 β , wieder freigibt (Ziff. 3 u. 4, Abb. 1) [28] [29] [30].

Ein dritter Weg, der erst in den späteren Stadien der Infektion optimal durch das Bakterium genutzt werden kann, besteht darin, die durch bereits eingetretene Bakterien ausgelöste Antwort des menschlichen Körpers auf die Entzündungsreaktion auszunutzen. Wie bereits erwähnt, werden durch die Apoptose von Makrophagen größere Mengen von Interleukin IL-1 freigesetzt, welches neben einer proinflammatorischen Wirkung auch als Signal zur Anlockung von Polymorphonuklearen Leukozyten (PMN-Zellen) dient.

Ebenso besitzt das durch Invasion von Shigellen in die Epithelzellen freigesetzte Interleukin IL-8 chemotaktische Eigenschaften für PMN-Zellen. PMN-Zellen haben die Aufgabe, Antigene aufzunehmen und eine Immunantwort in der Mucosa zu initiieren. Fatalerweise bereiten sie durch die Interruption des Colonepithels den Shigellen einen weiteren Weg, um diese Barriere durchdringen zu können (Ziff. 2, Abb. 1) [31]. Die Shigellen scheinen sich durch ein Proteinsystem (virulence transcriptional regulatory protein (PhoP)-System) vor dem Angriff des Immunsystems in Form von PMN-Zellen zu schützen [32]. Weitere Untersuchungen deuten aber auch darauf hin, dass durch *S. flexneri* freigesetzte Lipopolysaccharide (LPS), neben IL-8, ein Teil einer Signalkaskade sind, durch die diese Interruption der Epithelzellschicht durch PMN-Zellen hervorgerufen wird [33]. Dazu werden LPS mittels Transcytose von der apikalen zur basalen Seite des Colonepithels transportiert [31].

Sobald die Shigellen das Epithel überwunden haben, dringen sie in die Epithelzellen von basaler Seite aus ein. Dazu benutzen sie vor allem Virulenzfaktoren, die durch die *mxi-spa*-Gene sowie durch das *ipa*-Operon codiert werden. Nach Kontakt des Bakteriums mit der Wirtszelle bindet sich IpaB an IpaC [34]. Dieser Komplex aus hydrophoben Proteinen bildet in der Membran der Wirtszelle eine Pore [35], wobei die Sekretion von IpaB und IpaC sowie die Effizienz dieser Membraninsertion durch IpaD gesteuert wird [36]. Durch IpaC wird zudem die GTPase Cdc42 in der Wirtszelle aktiviert, die sowohl ihrerseits, als auch über Aktivierung einer weiteren GTPase (Rac), eine Aktinpolymerisation in der Wirtszelle fördert [37]. Durch die in der Wirtszelle gebildete Pore werden die Invasionsproteine IpaA und IpaD mit Hilfe eines Typ III-Sekretionssystems, welches unter anderem aus Genprodukten der *mxi*- und *spa*-Gene aufgebaut ist, in diese Zelle geschleust [38]. Auch hier scheinen nach neuesten Untersuchungen LPS bzw. die Glykosylierungsstufe der LPS eine entscheidende Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass der Grad der Glykosylierung der O-Antigen-Seitenkette der LPS, der bei den einzelnen Serotypen der verschiedenen Shigella-Arten unterschiedlich ist, deren Länge beeinflusst. Bei optimaler LPS-Länge kann auch das Typ-III-Sekretionssystem seine Funktion optimal ausüben und das Bakterium ist optimal vor dem Angriff des menschlichen Immunsystems geschützt. Abweichungen von dieser optimalen LPS-Länge resultieren entweder in verminderter Virulenz oder erhöhter Eliminierung der Bakterien durch das Immunsystem des Wirtsorganismus [39].

Durch die oben beschriebene Einschleusung von IpaA und IpaD durch das Typ-III-Sekretionssystem wird, unter anderem durch die Bindung von IpaA an Vinculin, eine massive Zytoskelettlagerung in der Zelle ausgelöst. Dabei entstehen Membranausstülpungen, die über dem Bakterium verschmelzen und es in einem makropinocytotischen Prozess internalisieren [40] [41]. Das nun in einer phagosomalen Vakuole befindliche Bakterium lysiert diese wiederum mittels IpaB. Damit gelangt das Bakterium in das Zytosol der Wirtszelle, wo es sich vom Immunsystem unbemerkt vermehren kann (Ziff. 5, Abb. 1).

Um eine Ausbreitung der Infektion auf Nachbar epithelzellen zu ermöglichen, muss sich das Bakterium im Zytosol zur Zellwand der Epithelzelle bewegen können. Dazu bildet das Bakterium mit Hilfe des VirG (= IcsA) -Oberflächenproteins, ausgehend von einem der beiden Zellpole, einen F-Aktinschwanz [42]. Die Ausbildung dieser Fibrinstrukturen scheint aber auch von Faktoren der Wirtszelle, so z.B. von N-WASP, abhängig zu sein [43].

An der inneren Zellmembran angekommen, wird, wiederum durch den Kontakt des Bakteriums mit der Zellmembran, eine Membranausstülpung erzeugt. Diese Ausstülpung wird durch die Nachbar epithelzelle endocytisiert. Das nun zwischen zwei Membranen eingeschlossene Bakterium lysiert diese Membranen abermals mittels IpaB und IpaC und gelangt so in das Zytosol dieser Nachbarzelle (Ziff. 6, Abb. 1) [44].

Durch Infektion der Epithelzellen mit Shigellen wandeln sich diese in proinflammatorische Zellen um, die große Mengen an TNF α und IL-8 sezernieren (Ziff. 7, Abb. 1). Dadurch wird das Entzündungsgeschehen exponentiell verstärkt.

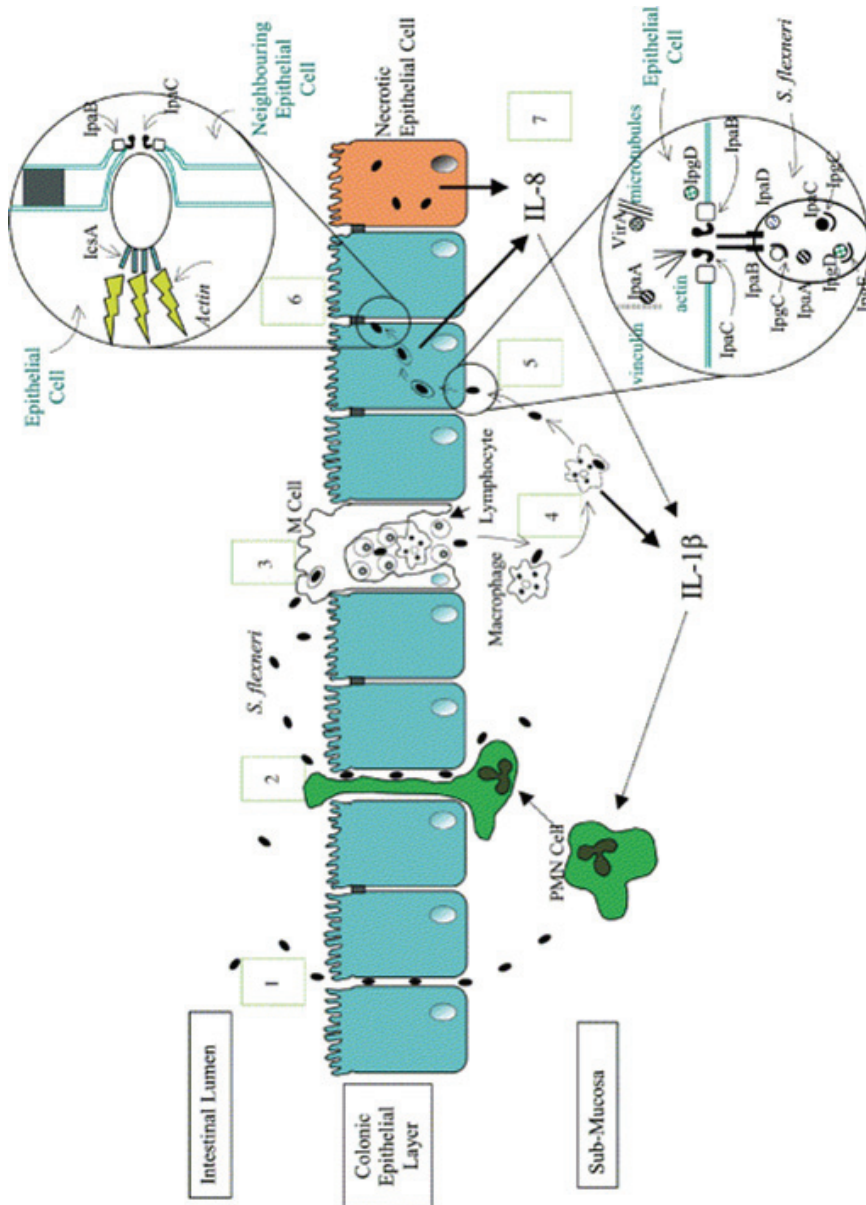


Abb. 1: Pathogenese der Shigellose

Abbildung entnommen aus [45].

3.1.1.1 Funktion der TGT in der Pathogenese

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, spielen verschiedene Virulenzfaktoren für die Invasion der Colonepithelzellen durch Shigellen eine Rolle. Eine entscheidende Position nimmt dabei, wie in Abb. 2 dargestellt, das Protein VirF ein, welches ebenfalls durch ein Gen auf dem Virulenzplasmid codiert wird [46].

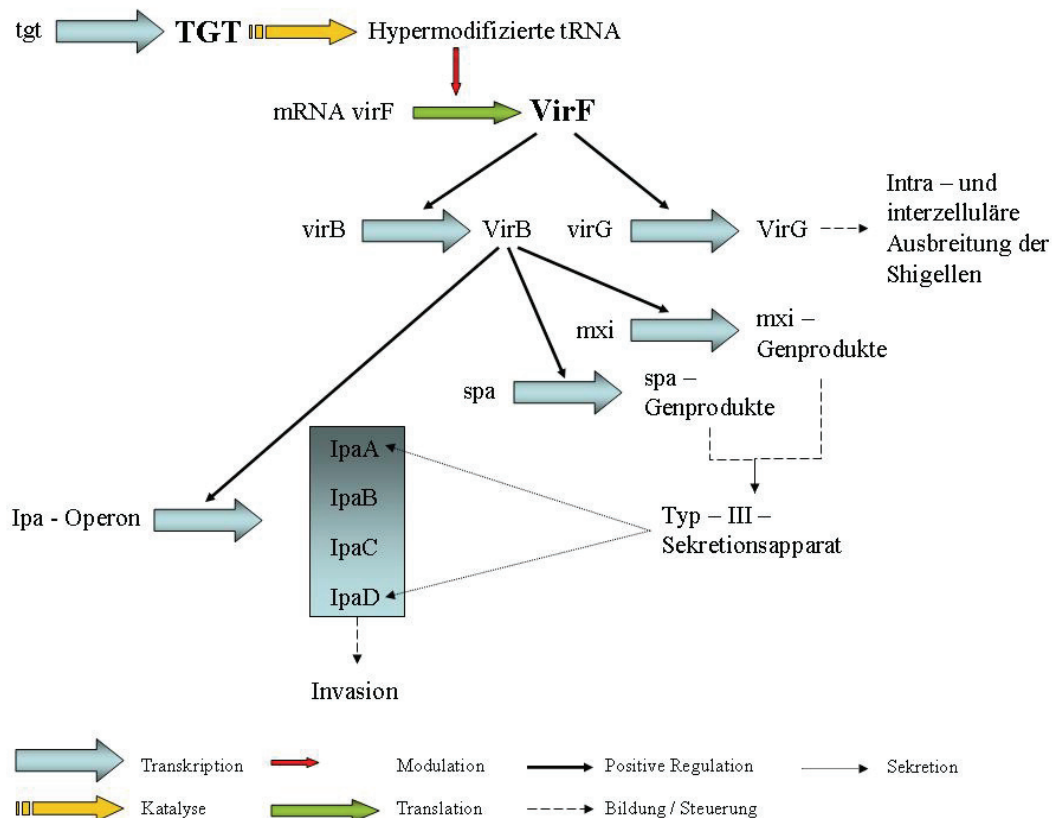


Abb. 2: Entscheidende Funktion der TGT bei der Ausbildung eines pathogenen Phänotyps von *Shigella flexneri*:

VirF ist ein übergeordnetes Regulatorprotein, welches bei der Ausbildung des virulenten Phänotyps eine zentrale Position einnimmt. Für die Translation von virF-mRNA werden modifizierte tRNAs benötigt. Das Enzym TGT ist an der Biosynthese einer dieser entscheidenden Basenmodifikationen beteiligt.

VirF beeinflusst die Expression des *virB*-Gens, dessen Genprodukt VirB wiederum die Transkription der Sequenzen des *ipa*-Operons sowie der *mxi*- und *spa*-Gene positiv reguliert. Dabei werden *ipaB* und *ipaC* in weitaus stärkerem Maße durch VirB beeinflusst als *ipaD* [47]. Die Funktionen der durch das *ipa*-Operon codierten Virulenzproteine IpaA-D wurden bereits in Abschnitt 3.1.1 näher beschrieben.

VirF kontrolliert weiterhin positiv die Transkription des VirG-Proteins, welches, wie bereits beschrieben, essentiell für die intra- und interzelluläre Ausbreitung der Shigellen ist [48].

Wachstumstemperatur sowie Superhelizität der DNA beeinflussen die Transkription von *virF*, wohingegen die Translation zu VirF und damit eine optimale Expression der Virulenzgene von *Shigella flexneri* von der Anwesenheit modifizierter tRNA abhängig ist [49]. Dabei muss diese Modifikation bestimmter tRNAs sowohl die hypermodifizierte Base Queuin in der wobble position als auch die Anknüpfung von 2-Methyl-N⁶-isopentenyladenosin an das 3'-Ende des Anticodons beinhalten, um die Pathogenität der Shigellen voll ausbilden zu können [19] [46]. Somit sind alle Enzyme der Biosynthese dieser Nucleoside bzw. diejenigen Enzyme, die ihren Einbau in die tRNAs bewerkstelligen, mögliche Targets für neue Antibiotika. Eine Inhibition dieser Enzyme mit solchen Substanzen müsste die VirF-Konzentration senken und damit würden die Shigellen ihre Pathogenität weitestgehend einbüßen.

Die Realisierung dieser Modifikationen in der tRNA ist von den Produkten des *tgt*-Gens sowie des *miaA*-Gens abhängig, wobei *tgt* für die tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT) codiert.

Für prokaryontische TGT stellt die für die Hypermodifikation von bestimmten tRNAs benötigte Base Queuin kein Substrat dar. Prokaryonten besitzen einen mehrstufigen Biosyntheseweg, in dem Queuosin ausgehend von Guanin und katalysiert durch verschiedene Enzyme synthetisiert wird (Abb. 3). Dabei wird zunächst aus aktiviertem Guanin (GTP) in einer bisher unbekanntenen enzymatischen Reaktion die Zwischenstufe 7-Cyano-7-deazaguanin (preQ₀) hergestellt. Aus preQ₀ entsteht dann mittels einer NADPH-abhängigen Oxidoreduktase (QueF) 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (preQ₁) [50], welches anschließend durch die TGT in die wobble position bestimmter tRNA's im Austausch gegen Guanin-34 eingebaut wird. Danach katalysiert die S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) eine S-Adenosylmethionin (AdoMet)-abhängige Reaktion, bei der ein 2,3-Epoxy-4,5-dihydroxycyclopentanrest auf das N-Atom der Aminomethylgruppe des an die tRNA gebundenen preQ₁ übertragen wird. Das dabei entstandene Epoxy-Queuosin (oQueuosin) wird in einer Vitamin B12-abhängigen Reduktion enzymatisch zu Q(34)tRNA umgesetzt [51].

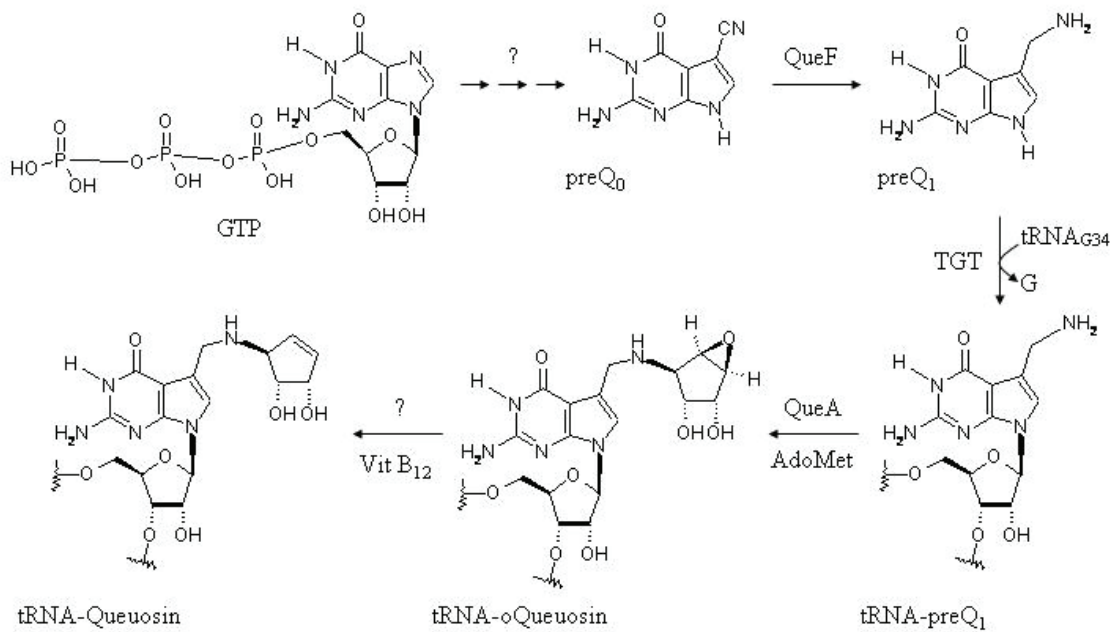


Abb. 3: Biosynthese von Queuosin in Prokaryonten

Mittels Mutationsstudien konnte festgestellt werden, dass eine Mutation des *miaA*-Gens die Wachstumsrate von *Escherichia coli*-Bakterien, einer vorherrschenden Spezies der natürlichen Darmflora, verringert [52]. Hingegen konnte bei einer Mutationsstudie des *tgt*-Gens eine nur unbedeutende Beeinflussung der Wachstumsrate von *E. coli*, aber ein Verlust der Virulenz bei Shigellen festgestellt werden [18]. Deshalb sollte ein Inhibitor der TGT ein selektives Antibiotikum gegen Shigellen darstellen, wobei davon auszugehen ist, dass eine Schädigung der natürlichen Darmflora nicht erfolgt.

3.1.1.2 Katalytischer Mechanismus der TGT

Eukaryontische TGT katalysiert den Austausch von preQ₁ gegen Guanin an Position 34, der wobble position, bestimmter tRNAs ohne dabei das sogenannte Rückgrat der tRNA zu brechen. Die Austauschreaktion folgt einer Ping-Pong-Kinetik (Abb. 4) [53]. Dazu erkennt und bindet die TGT zunächst an solche tRNAs, die die Nucleotidsequenz UGU an Position 33 – 35 besitzen. Nach initialer Erkennung der tRNA-Sequenz, wahrscheinlich durch das Uracil-Nucleotid an Position 33 der tRNA, finden während der Reaktion drastische Veränderungen in der räumlichen Struktur der tRNA-Schleife, nicht aber der TGT statt [54].

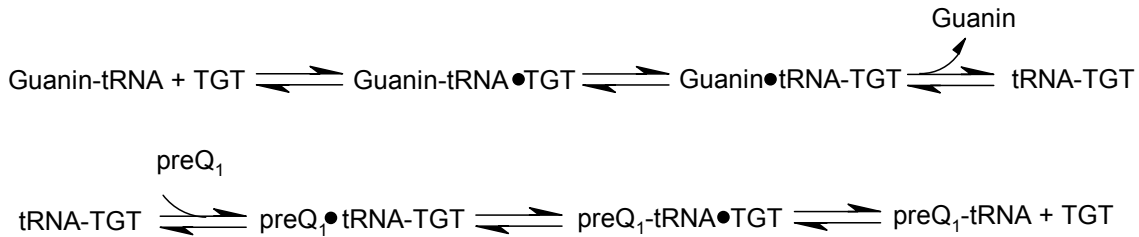


Abb. 4: Ping-Pong-Mechanismus der TGT-katalysierten Basenaustauschreaktion

Bei einem Ping-Pong-Mechanismus erfolgt die Substratbindung in einer bestimmten Reihenfolge. In der ersten Reaktionshälfte erfolgt tRNA-Bindung an die TGT, Guaninfreisetzung und -dissoziation. Ist die Bindetasche dann in der zweiten Hälfte der Reaktion zugänglich, bindet dort preQ₁ und es wird eine kovalente Bindung zur tRNA ausgebildet. Dieser Schritt bewirkt die Freisetzung von modifizierter tRNA und TGT infolge der Dissoziation des kovalenten Intermediats.

Zunächst erfolgt nach Bindung der tRNA durch die TGT ein nucleophiler Angriff am C1' des tRNA-Nucleotids an Position 34 durch die Asp 280-Seitenkette der TGT unter Bildung eines initialen Michaelis-Menten-Komplexes (Abb. 5).

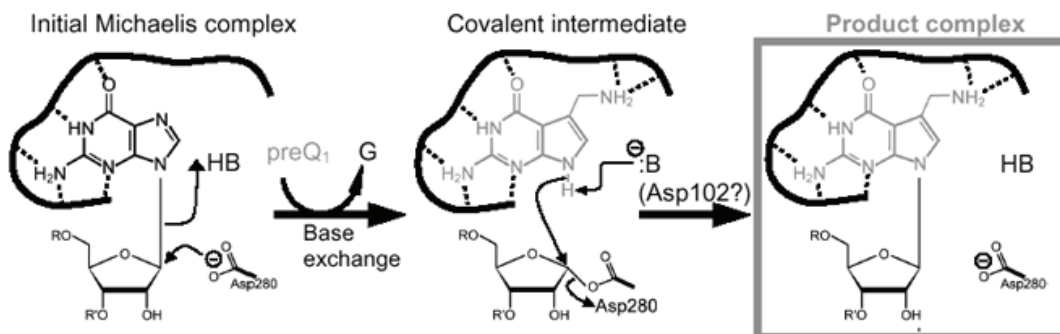


Abb. 5: Reaktionsschema für die durch die TGT katalysierte Basenaustauschreaktion nach [55]

Die TGT bildet sequenzspezifische Kontakte zwischen Basenbindetasche und Guanin (schwarz) bzw. preQ₁ (grau) aus. R und R' stellen tRNA-Sequenzen dar, die das Targetnucleotid flankieren.

Die optimale Orientierung der Asp 280 Seitenkette für die Katalyse wird durch eine Interaktion des zweiten Seitenkettensauerstoffs mit der Hydroxylgruppe der räumlich benachbarten Seitenkette von Tyr 258 ermöglicht. Durch das somit gebildete kovalente Intermediat zwischen TGT und tRNA ist es möglich, die Basen preQ₁ gegen Guanin auszutauschen, wobei das Ribosegerüst der tRNA während der Reaktion vollständig erhalten bleibt. Der Basenaustausch erfolgt in der Basensubstratbindetasche der TGT unter Konformationsänderung der Seitenketten von Tyr 106 und Cys 158. Diese Kon-

formationsänderungen dienen wahrscheinlich einer Unterbindung der Rückreaktion. Anschließend wird der Stickstoff N9 des Substrates preQ₁, wahrscheinlich durch die Seitenkette des Asp 102 unter Beteiligung eines gut positionierten, mit Asp 102 wasserstoffverbrückten Wassermoleküls als Protonenakzeptor, deprotoniert. Dieser deprotonierte Stickstoff ermöglicht nun einen erneuten nucleophilen Angriff am C1' der Ribose an Position 34, welcher letztendlich zum Produkt tRNA-preQ₁ führt (Abb. 5) [54].

3.1.1.3 Strukturvarianten der TGT

Wie schon in Abschnitt 3.1.1.1 dargestellt, sollte die Inhibition der Shigellen-TGT keine Nebenwirkung auf die natürliche Darmflora besitzen [18] [48]. Auch menschliche Zellen besitzen ebenso wie Archebakterien TGTs. Während die TGT-Aktivität bei Pro- und Eukaryonten letztendlich zu tRNAs führt, die die hypermodifizierte Base Queuin enthalten, findet bei den Archebakterien ein Basenaustausch von Guanin gegen Archaeosin (7-Formamidino-7-deazaguanin) unter TGT-Katalyse statt. Archaeosin, Queuin, preQ₀ sowie preQ₁ sind Guaninabkömmlinge (Abb. 6).

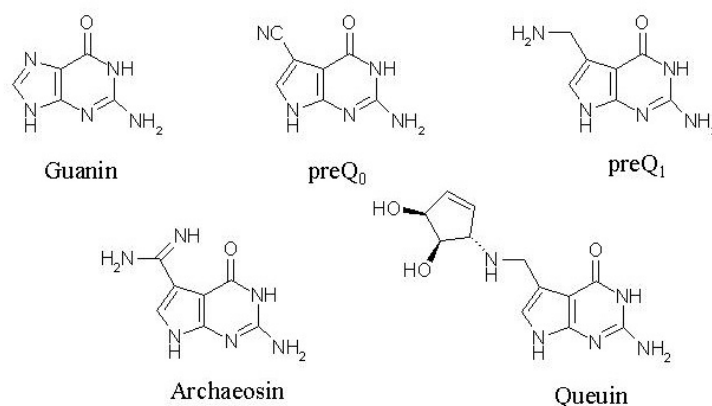


Abb. 6: Chemische Struktur von Guanin sowie verschiedener Guaninderivate

Obwohl sich diese Substanzen strukturell sehr ähnlich sind, fungieren sie keineswegs bei allen TGTs aus den unterschiedlichen Specien als Substrat. Prokaryontische TGT katalysiert den Austausch von preQ₁ gegen Guanin in Position 34, der wobble position, von tRNAs mit der Antikodonsequenz GUN. Diese tRNAs codieren für die Aminosäuren Asp, Asn, His und Tyr. Im Gegensatz dazu ist eukaryontische TGT in der Lage,

Queuin direkt in tRNAs einzubauen. Archebakterielle TGT unterscheidet sich sowohl von pro- als auch von eukaryontischer TGT in Basen- und tRNA-Substrat. Diese TGT katalysiert den Basenaustausch von preQ₀ gegen Guanin in Position 15 der D-Schleife verschiedener tRNAs. PreQ₀ wird anschließend über einen bisher noch nicht bekannten Biosyntheseweg in Archaeosin umgewandelt [51].

Neben ihren natürlichen Basensubstraten akzeptieren diese verschiedenen TGTs auch zusätzliche Substrate (Tab. 1).

Tab. 1: Substratspezifität von TGTs aus den verschiedenen Reichen

Enzym	Guanin	preQ₀	preQ₁	Queuin
Archaebakterielle TGT	X	X	-	-
Prokaryontische TGT	X	X	X	-
Eukaryontische TGT	X	X	X	X

Die geringste Substratspezifität besitzt dabei die eukaryontische TGT, die neben ihrem natürlichen Substrat ebenso die natürlichen Substrate von prokaryontischer als auch von archebakterieller TGT sowie Guanin selbst akzeptiert. Die höchste Substratspezifität besitzt archebakterielle TGT, die außer ihrem eigenen natürlichen Substrat nur Guanin akzeptiert. Diese Unterschiede in der Substratspezifität der TGTs von Organismen aus den drei Reichen der Lebewesen sind im unterschiedlichen Aufbau der Bindetasche für die Base begründet [56]. Zusätzlich zu der Bindetasche für das Basensubstrat befindet sich bei den TGTs in direkter Nachbarschaft die Bindetasche für das tRNA-Substrat (Abb. 7).

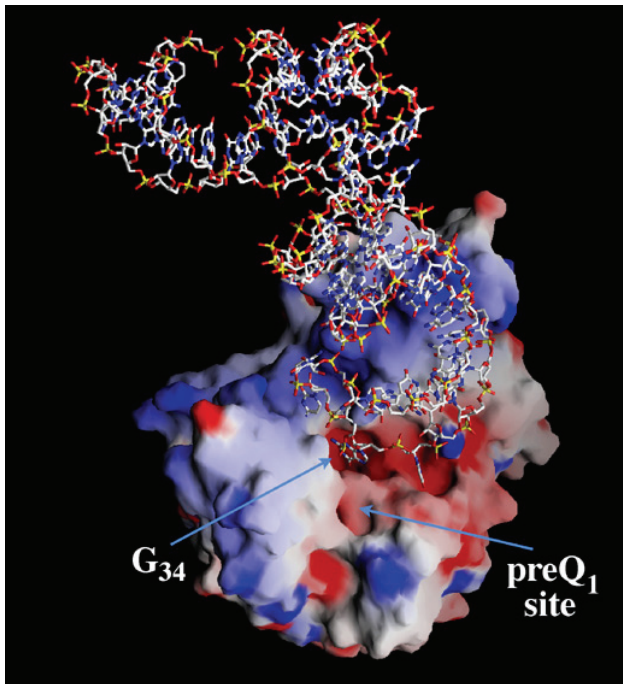


Abb. 7: Modell der Wechselwirkungen zwischen tRNA und *Z. mobilis*-TGT

Abbildung entnommen aus [57].

3.1.2 Strukturelle Betrachtungen der *Zymomonas mobilis*-TGT

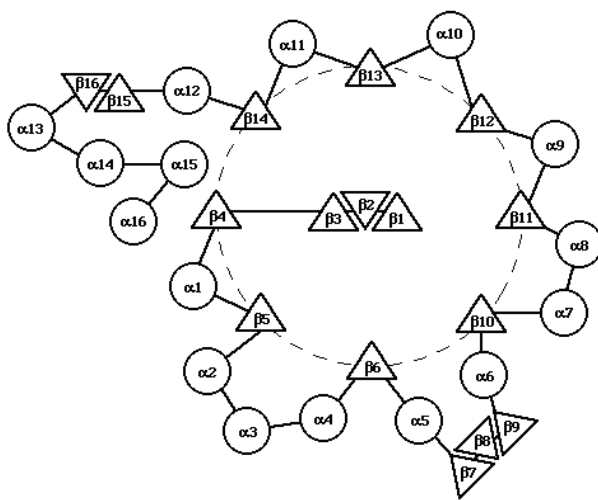
Neben den genannten Unterschieden in der Substratspezifität gibt es innerhalb der Reiche zwischen den verschiedenen Gattungen der Lebewesen in weiten Bereichen keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz der TGTs. Zudem sind die Abweichungen in der Aminosäuresequenz, abgesehen von der Basenbindetasche, bei den Lebewesen der verschiedenen Reiche erstaunlich gering [58].

Bei der in den Untersuchungen zu dieser Arbeit verwendeten TGT handelt es sich um die TGT aus *Zymomonas mobilis*, einem ebenfalls zum Stamm der Proteobacteria gehörenden Bakterium. Diese TGT hat eine Sequenzhomologie von 55,2 % zu der von *S. flexneri* und von 54,9 % zu der von *E. coli*. Die Bindetaschen für das Basensubstrat von *Z. mobilis*-TGT und *S. flexneri*-TGT unterscheiden sich jedoch nur in einer einzigen Aminosäure. Anstelle von Tyr 106 besitzt *S. flexneri* dort ein Phenylalanin [58].

Obwohl für die Inhibitorsuche mittels Ligandenfischen, wie bereits in der Einleitung angedeutet, nicht notwendig, so ist doch bei Verwendung von *Z. mobilis*-TGT von Vorteil, dass hier bereits eine mit einer Auflösung von 1,85 Å bestimmte Kristallstruktur vorliegt [59]. Somit können mögliche, mit dem Ligandenfischen gefundene Inhibitoren

im Kristall mit der *Z. mobilis*-TGT röntgenkristallographisch vermessen werden, um einen Bindungsmodus zu bestimmen.

Die *Z. mobilis*-TGT gehört zur Familie der $(\beta/\alpha)_8$ -Fassenzyme („TIM-barrel“). Das aus acht parallelen β -Strängen geformte Fass ist charakteristisch für diese Familie. Dabei sind in der Primärstruktur aufeinander folgende Stränge auch in der Sekundärstruktur nebeneinander liegend angeordnet. Je zwei aufeinander folgende β -Stränge sind durch einen Abschnitt miteinander verbunden, der eine α -Helix enthält. Die Helices liegen an der Außenseite des Fasses (Abb. 8).



A



B

Abb. 8: Faltungsmuster der *Z. mobilis*-TGT

Grafik A: Schematische Darstellung der topologischen Struktur der TGT. Die β -Faltblatt-Strukturen sind als Dreiecke, die α -Helices als Kreise dargestellt. Der gestrichelte Kreis verbindet die acht Stränge, die das Fass formen. Abbildungen entnommen aus [60].

Grafik B: Ribbon-Darstellung. Die acht Stränge, die das Fass formen, sind in grün dargestellt. Die blaue Kugel markiert ein Zink-Ion. Die violett eingefärbte α -Helix verbindet das Fass mit der Zink-bindenden Domäne der TGT und geht vermutlich mit dem tRNA-Rückgrat eine Wechselwirkung ein. Abbildungen entnommen aus [61].

Die acht das Fass formenden β/α -Einheiten folgen im Falle der *Z. mobilis*-TGT nicht immer unmittelbar aufeinander. An einigen Stellen sind verschiedene Sekundärstrukturelemente eingefügt (Abb. 8). Zusätzlich ist das Fass über eine α -Helix noch mit einer zinkbindenden Domäne verbunden.

Auf der C-terminalen Seite des Fasses befindet sich die Bindetasche für das Basensubstrat. Die Tasche ist in der apo-Struktur durch die Seitenkette von Tyr 106 verschlossen, indem sie Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Asp 156 und Gln 203 ausbildet. Durch die Substratbindung werden diese Wasserstoffbrücken aufgebrochen.

Das Substrat preQ₁ interkaliert zwischen den Seitenketten von Met 260 auf der einen Seite und Tyr 106 sowie Cys 158 auf der anderen Seite. Durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff von Leu 231 und der aliphatischen Aminogruppe von preQ₁, dem Amid von Gly 230 sowie der Seitenkette von Gln 203 und dem Sauerstoff an C6 sowie zwischen der Seitenkette von Asp 156 und der 1-NH-Gruppe und der 2-NH₂-Gruppe von preQ₁ wird das Substrat spezifisch erkannt (Abb. 9) [59].

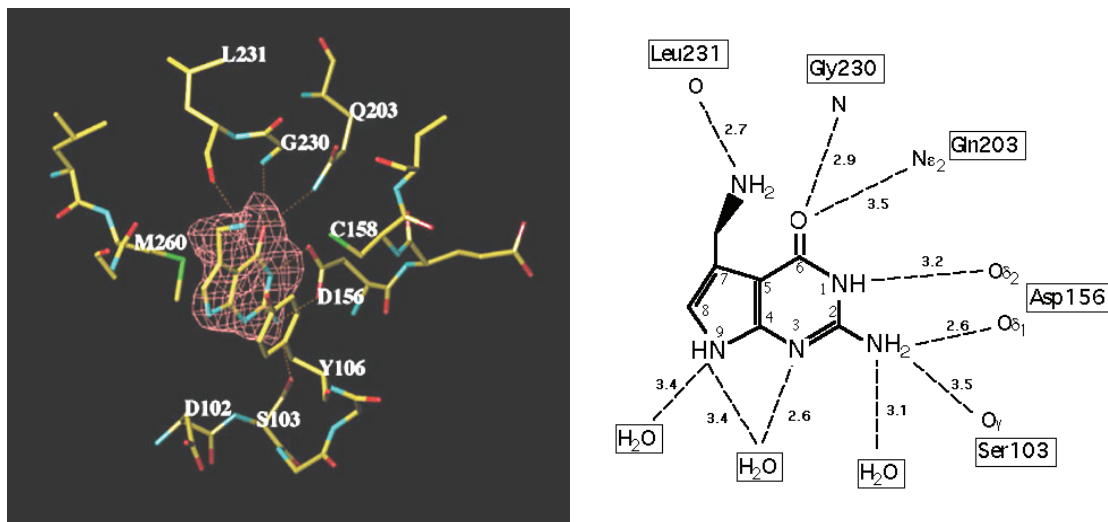


Abb. 9: Aktives Zentrum der *Z. mobilis*-TGT im Komplex mit preQ₁

Abbildungen entnommen aus [62] bzw. [63].

Eukaryontische TGT besitzt eine Sequenzidentität von 44 % zur *Z. mobilis* TGT und katalysiert den irreversiblen Austausch von Guanin gegen Queuin in bestimmten tRNAs [64]. Im Gegensatz zu Prokaryonten können Eukaryonten Queuin nicht De novo synthetisieren. Somit ist Queuin essentieller Nahrungsbestandteil von Eukaryonten. Die physiologische Rolle von Queuin beim Menschen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von Queuin an Differenzierungs-, Proliferations- und Signalprozessen sowie bei der Antwort auf oxidativen Stress. In Tumorzellen wurde festgestellt, dass dort oft eine Untermodifikation der tRNAs mit Queuin vorliegt [65]

[66]. Ergebnis anderer Studien war dagegen die Beobachtung höherer Expressionsraten einer TGT-Untereinheit in leukämischen und Colonkarzinomzellen im Vergleich zu normalen Zellen, allerdings bei gleichzeitig abnehmenden Queuosinkonzentrationen [67] [68].

3.2 Krebs

Die WHO erwartet bis zum Jahr 2020 einen Zuwachs der jährlich registrierten Krebsneuerkrankungen um etwa 50 % sowie der durch Krebs verursachten Todesfälle um mehr als 60 % [20]. Derzeit betreffen in der Europäischen Union die meisten der statistisch erfassten Krebserkrankungen das Colon bzw. das Rektum, gefolgt vom Befall des Brustgewebes. An dritter Stelle dieser Statistik stehen Tumorerkrankungen der Prostata [69].

Im Laufe eines Menschenlebens finden etwa 10^{16} Zellteilungen im Körper statt. Ohne Einfluss von Mutagenen treten pro Zellteilung Mutationen mit einer geschätzten Rate von 10^{-6} Mutationen pro Gen auf. Somit müsste jedes einzelne Gen im Genom eines Menschen bei 10^{10} voneinander unabhängigen Ereignissen wahrscheinlich eine Mutation erleiden. Doch für die Entartung einer normalen menschlichen Zelle ist mehr als eine Mutation notwendig. Typischerweise müssen in einer Zelle mehr als fünf oder sechs unabhängige Mutationen auftreten, um eine normale Zelle in eine Krebszelle zu verwandeln [70].

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Diagnostik von Krebserkrankungen, vor allem bei der Früherkennung erzielt. Auch in der Therapie konnten durch die Einführung von Antikörpern in die Therapieschemata große Erfolge erzielt werden. Doch trotz all dieser Fortschritte liegen die Heilungschancen für die am häufigsten auftretenden soliden Tumoren selten über 20 % [72].

3.2.1 Die Rolle von IGF-1 und seinem Rezeptor im Zellzyklus

Der Zellzyklus kann durch vier aktive Phasen beschrieben werden:

1. die G₁-Phase, eine prä-DNA-Synthesephase, in der die Zellen auf den Eintritt in die S-Phase vorbereitet werden, indem Protein- und RNA-Synthese sowie Zellwachstum und Differenzierung bestimmter Zellstrukturen stattfindet,

2. die S-Phase, in der DNA-Synthese und Chromosomenreplikation erfolgen,
3. die G₂-Phase, eine praemitotische Phase,
4. die M-Phase, in der die Mitose stattfindet.

Zellen, die nicht gerade eine dieser Phasen durchlaufen, befinden sich in der G₀-Phase.

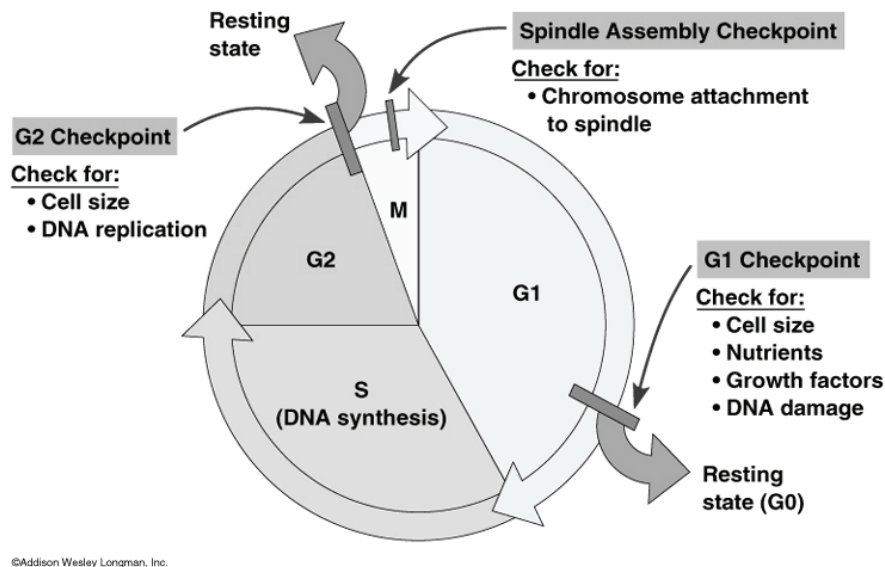


Abb. 10: Zellzyklus mit Angabe der Kontrollstationen

Abbildung entnommen aus [71].

Das Durchlaufen des Zellzyklus unterliegt positiven und negativen Regulatoren. Positive Regulatoren sind neben Wachstumsfaktoren insbesondere die an Cyclin-abhängige Kinasen (cdk) bindenden Cycline. Durch negative Regulation kann der Zellzyklus an definierten Punkten angehalten werden, um die Proliferation von Zellen zu kontrollieren und notfalls zu unterbrechen. Dies geschieht typischerweise beim Übergang von der G₁-in die S-Phase sowie beim Übergang von der G₂-in die M-Phase.

Der Eintritt der Zellen von der G₀-Phase in die G₁-Phase und von der G₁-Phase in die S-Phase wird neben den Cyclinen vor allem durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem Insulin-like growth factor 1 (IGF1), induziert (Abb. 10).

Onkogene können die Aktivität von Wachstumsfaktoren entweder durch direkte Bindung an den Rezeptor, durch Beeinflussung des Phosphorylierungsgrades oder durch Beeinflussung der Synthese des Rezeptors modulieren. Ebenso können durch Mutatio-

nen oder Deletionen von Tumorsuppressorgenen hervorgerufene Veränderungen des Zellzyklus die Tumorgenese beeinflussen.

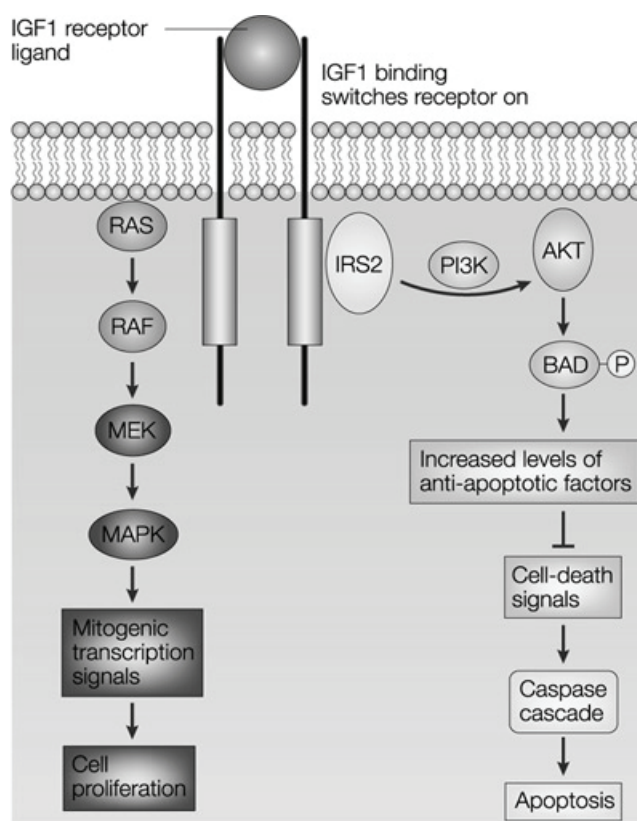
Lange ist man davon ausgegangen, dass das unkontrollierte, autonome Wachstum von Tumorzellen alleine auf einer erhöhten Zellteilungsrate beruht. Aus heutiger Sicht ist das normale (physiologische) Überleben einer Zellpopulation vom Gleichgewicht zwischen Zellreplikation und dem programmierten Zelltod (Apoptose) abhängig. Eine unkontrollierte Erhöhung der Zellzahl im Rahmen einer Tumorerkrankung kann somit dadurch zustande kommen, dass entweder die Zunahme der Zellzahl durch Funktionsstörungen der Zellzykluskontrolle größer ist als die Apoptoserate oder eine normal proliferierende Zellpopulation durch Störungen der Apoptose nur ungenügend zum Absterben gebracht wird [72].

Ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, der in beide die Zellzahl regulierende Prozesse eingreift, ist der IGF-1-Rezeptor. Er stellt eine in vielen menschlichen Zellen vorkommende transmembrane Tyrosinkinase dar und wird durch die Bindung seiner Liganden IGF1 oder dem weniger affinen IGF2 aktiviert. Unter normalen physiologischen Bedingungen spielt der IGF-1-Rezeptor eine entscheidende Rolle in Zellzyklus und Differenzierung. Weiterhin bewahrt eine Aktivierung dieses Rezeptors die Zelle vor Apoptose [73].

Nach Bindung von IGF1 bzw. IGF2 an den IGF-1-Rezeptor findet an den intrazellulären Tyrosinresten eine Autophosphorylierung statt, aus der eine Phosphorylierung der cytoplasmatischen Substrate resultiert. Neben den Insulin-Rezeptor-Substraten 1, 2, 3 und 4 (IRS 1 – 4) gehört das Adapterprotein Shc ebenfalls zu den cytoplasmatischen Substraten des IGF-1-Rezeptors. Durch die Aktivierung dieser Substrate werden zwei verschiedene, zum Teil miteinander verbundene Signalkaskaden in Gang gesetzt. Über die Phosphorylierung der IRS-Proteine wird die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktiviert, die ihrerseits eine Reaktionskaskade in Gang setzt, bei der verschiedene anti-apoptotische Faktoren, wie z.B. BCL 2 und BCL-X_L, gebildet werden. Damit wird bei Aktivierung des IGF-1-Rezeptors der Eintritt dieser Zelle in den Prozess des programmierten Zelltodes verhindert.

Auf der anderen Seite setzt die Bindung von IGF1 bzw. IGF2 an den IGF-1-Rezeptor eine Folge von Reaktionen in Gang, bei denen durch eine Kopplung von Shc mit Grb-2/SOS, eine Aktivierung von RAS erfolgt. RAS aktiviert wiederum MAPK, wo-

durch eine Reihe von mitogenen Transkriptionsfaktoren gebildet werden. Über diese Transkriptionsfaktoren wird die Zellproliferation positiv reguliert. Somit resultiert eine durch Aktivierung des IGF-1-Rezeptors hervorgerufene Anhebung der Konzentration an mitogenen Transkriptionsfaktoren in einer Steigerung der Zellteilungsrate (Abb. 11) [74].



Nature Reviews | Cancer

Abb. 11: IGF-1 Pathway

Abbildung entnommen aus [75].

Das extrazelluläre Angebot an IGF1 und IGF2 wird durch IGF-bindende Proteine kontrolliert.

In vielen Tumorzellen wird der IGF-1-Rezeptor überexprimiert [76]. In einer Studie wurde zudem festgestellt, dass in Burkitt-Zellen die Anzahl an IGF-1-Rezeptoren beim Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase ansteigt [77]. Weiterhin wurde in malignem Brustgewebe, neben einer 14fachen Erhöhung der IGF-1-Rezeptorexpression, eine

zwei- bis vierfach erhöhte Autophosphorylierung und Tyrosinkinaseaktivität des IGF-1-Rezeptors gefunden [78].

Der IGF-1-Rezeptor stellt somit ein wichtiges Target in der Onkologie dar.

3.2.2 Struktur und Autophosphorylierung der IGF-1-RTK

Der IGF-1-Rezeptor stellt ein Typ-1-Transmembranprotein dar. Dieses Protein besteht aus einer ligandbindenden extrazellulären N-terminalen Domäne, einer membrandurchdringenden Domäne und einer katalytischen, zytoplasmatischen Domäne, die die Bindestellen für ATP und die Tyrosinkinasedomäne (IGF-1-RTK) enthält. Durch Glykosylierung und proteolytische Spaltung wird die Aminosäurekette des Rezeptors in je zwei α - und β -Einheiten unterteilt. Der IGF-1-Rezeptor bildet ein $\alpha_2\beta_2$ Heterodimer, wobei die α - und β -Einheiten durch verschiedene Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die ligandbindenden Domänen sind auf den extrazellulären α -Untereinheiten lokalisiert. Etwa ein Drittel der β -Untereinheiten befindet sich außerhalb der Plasmamembran. Diese Teile der β -Untereinheiten sind durch je eine transmembrane Domäne jeweils mit ihrem intrazellulären Teil verbunden (Abb. 12 A) [73].

Abhängig von Alter und Gewebetyp wurden verschiedene Subtypen des IGF-1-Rezeptors gefunden. Diese unterscheiden sich im Molekulargewicht der β -Untereinheiten [73].

Aus der Bindung eines Liganden an die extrazelluläre α -Untereinheit des IGF-1-Rezeptors resultieren in der Kinasedomäne der β -Untereinheiten intermolekulare Autophosphorylierungen der drei Tyrosinreste der Aktivierungsschleife in der Reihenfolge Tyr 1135, Tyr 1131 und Tyr 1136 (Abb. 12 B). Dabei findet zunächst eine Destabilisierung der autoinhibitorischen Konformation der Aktivierungsschleife statt, die dann nach Änderung ihrer Konformation durch die Phosphorylierungen wieder stabilisiert wird. Dadurch liegt sie nun in veränderter Position zu den anderen Strukturen der Kinasedomäne vor. Jede Autophosphorylierung bewirkt daneben eine Erhöhung der Enzymaktivität bei gleichzeitiger Abnahme von K_M (Michaelis-Konstante) für ATP- und Peptidsubstrat [79].

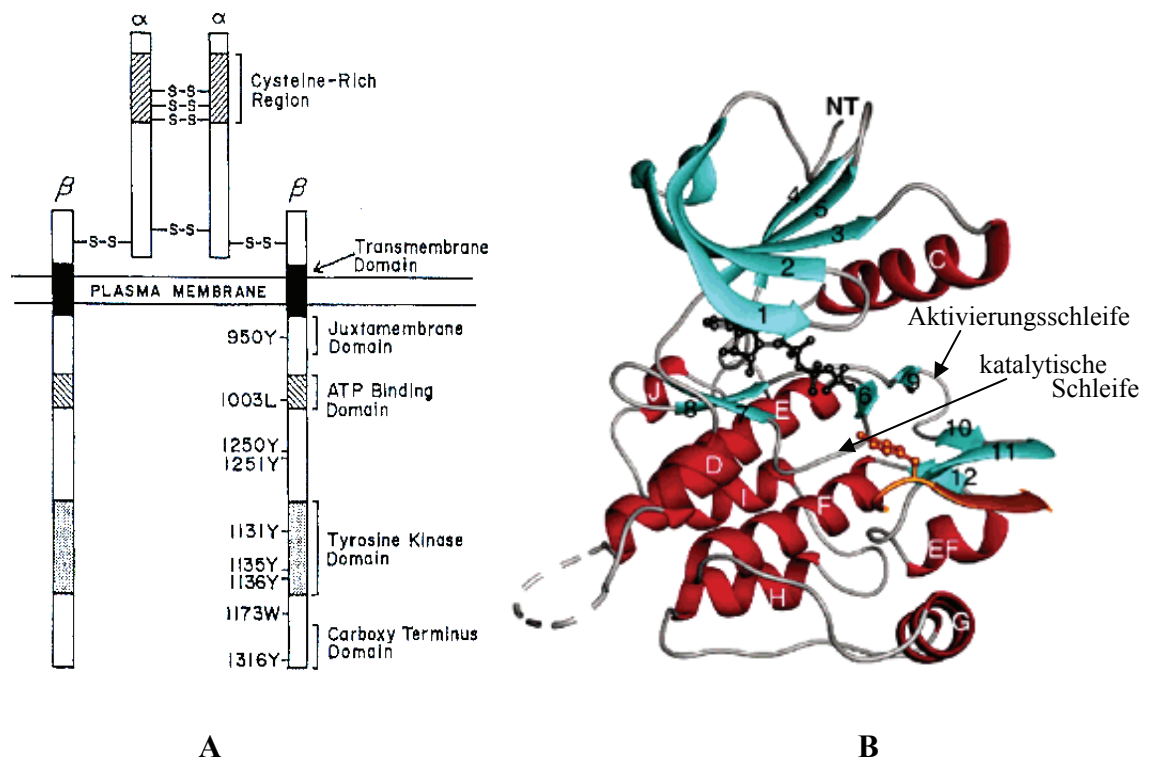


Abb. 12: Schematische Struktur des IGF-1-Rezeptors und dreidimensionale Struktur der isolierten Tyrosinkinasedomäne

Grafik A: Schematische Darstellung der Struktur des IGF-1-Rezeptors. Abbildung entnommen aus [73].

Grafik B: Ribbon-Darstellung der Tyrosinkinasedomäne: Die β -Stränge sind nummeriert und in blau dargestellt, die α -Helices sind rot eingefärbt und mit fortlaufenden Buchstaben bezeichnet. Das Substratprotein ist in orange abgebildet, wobei das als Phosphatakzeptor dienende Tyrosin ebenfalls in orange strukturell herausgestellt wurde. Ebenso strukturell herausgestellt, jedoch in schwarz eingefärbt, wurde das Nukleotidanalogue AMP-PCP. Der unterbrochene graue Strang repräsentiert den ungeordneten Teil der Kinaseregion. Das N-terminale Ende der Struktur ist mit NT gekennzeichnet. Das C-terminale Ende folgt nach α J und liegt hinter β 8. Abbildung entnommen aus [79].

Die Tyrosinkinasedomäne besteht, wie bei vielen Mitgliedern der Tyrosinkinasefamilie, aus zwei größeren Subdomänen: einem N-terminalen Lappen, der aus fünf antiparallel angeordneten β -Strängen und einer α -Helix besteht, und einem C-terminalen Lappen, der aus acht α -Helices und drei Paaren jeweils zueinander antiparallelen β -Strängen aufgebaut ist. Die ATP-Bindestelle befindet sich in der Spalte zwischen diesen beiden Lappen. Das Peptidsubstrat bindet an den C-terminalen Lappen, wobei das Tyrosin in der katalytischen Schleife zum Liegen kommt [79].

Infolge einer Bindung von ATP und Phosphorylierung der Aktivierungsschleife vollzieht der N-terminale Lappen eine Rotation zum C-terminalen Lappen hin. Dadurch

wird die katalytische Spalte geschlossen. Gleichzeitig erfolgt eine weitere Rotation, bei der sich die α -C-Helix unabhängig von den β -Strängen ebenfalls zum C-terminalen Ende dreht [79].

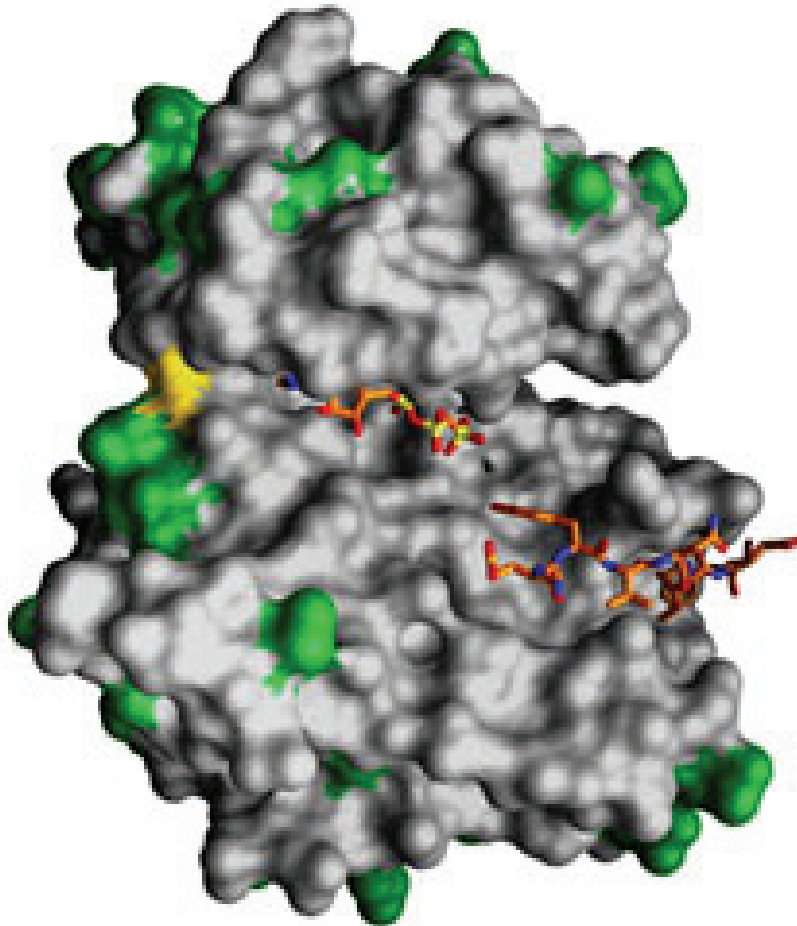


Abb. 13: Vergleich der Oberfläche der Tyrosinkinaseregion zwischen IGF-1-Rezeptor und Insulinrezeptor im Komplex mit Peptid- und ATP-Substrat

Abgebildet ist die Oberfläche der Tyrosinkinaseregionen beider Rezeptoren nach Übereinanderlegung der Strukturen. Die hellgrau dargestellten Bereiche sind bei beiden Rezeptoren identisch. Die grün markierten Bereiche stellen die durch verschiedene Aminosäureseitenketten hervorgerufenen unterschiedlichen Oberflächenregionen zwischen beiden Rezeptoren dar. Die gelbe Fläche kennzeichnet einen Bereich der Oberfläche, die Linkerregion zwischen dem C-terminalen und dem N-terminalen Lappen, an dem sich der IGF-1-Rezeptor stark vom Insulinrezeptor unterscheidet. Abbildung entnommen aus [79].

Die Tyrosinkinasedomänen von IGF-1-Rezeptor und Insulinrezeptor weisen eine Sequenzidentität von 84 % auf, während eine größere Divergenz bei den Ligandbindedomänen zwischen diesen beiden Rezeptoren besteht [79].

Ein genauerer Vergleich der Tyrosinkinasedomänen zwischen IGF-1-Rezeptor und Insulinrezeptor zeigt, dass die Nucleotidbindetasche beider Rezeptoren konserviert ist. Es bestehen aber Sequenzunterschiede in der angrenzenden Linkerregion, die die beiden Lappen miteinander verbindet. Da diese Region innerhalb der Reichweite eines ATP-kompetitiven Inhibitors liegt, kann die ATP-Bindetasche in Verbindung mit der Linkerregion für die Suche und Entwicklung selektiver Arzneistoffe gegen Krebs ausgenutzt werden (Abb. 13) [79].

In aktuellen Untersuchungen wurde bereits eine neue Klasse von Inhibitoren gefunden, die diesen strukturellen Unterschied zwischen den beiden Kinasen ausnutzt [80]. Vertreter der Klasse der Pyrrol-5-Carboxaldehyde zeigen eine gewisse Selektivität bezüglich der Bindung an IGF-1-RTK im Vergleich zur Bindung an die Tyrosinkinase-region des Insulinrezeptors.

Ebenso stellen Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine eine neue Klasse von Inhibitoren der IGF-1-RTK mit Selektivität zur Tyrosinkinasedomäne des Insulinrezeptors dar [81].

Des Weiteren konnte auch durch die Bindung von Catechol-Mimetika eine Inhibition der IGF-1-RTK erreicht werden. Diese Inhibitoren binden an die Tyrosinregion (Tyr 1158 und 1162) und wirken als ATP-un kompetitive Inhibitoren. Untersuchungen zur Selektivität wurden dabei nicht durchgeführt [82] [85].

Für die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die in Abb. 12 B dargestellte Tyrosinkinasedomäne als Konstrukt mit einem Fusionsprotein verwendet.

4 Auswahl der zu untersuchenden Pflanzen

Pflanzenextrakte stellen vorvalidierte Substanzbibliotheken mit äußerst hoher Diversität dar. In solchen Substanzbibliotheken sollte mit der Methode des Ligandenfischens nach potentiellen Inhibitoren der Zielproteine TGT und IGF-1-RTK gesucht werden. Zur Anwendung kamen sowohl kommerziell erhältliche Fertigextrakte als auch durch selektive Extraktion hergestellte Extrakte traditioneller Arzneipflanzen.

4.1 Pflanzenauswahl

Aufgrund der Fülle von zur Verfügung stehenden Arzneipflanzen musste eine Vorauswahl an Pflanzen getroffen werden, die an den Zielproteinen mittels Ligandenfischen untersucht werden sollten. Als Auswahlkriterien wurden Literaturdaten und Informationen aus Datenbanken herangezogen.

4.1.1 Auswahlkriterien für die Untersuchungen mit TGT

Bei einer Vielzahl der derzeit in der Medizin und Volksmedizin angewandten Pflanzen ist das wirksame Agens nicht bekannt. Das Wissen um die Wirksamkeit einer Pflanze bei einer bestimmten Erkrankung wurde von Generation zu Generation weitergegeben. Daher nutzen viele Forscher das Wissen der Naturvölker um die Heilkraft von Pflanzen.

Unter diesem Aspekt wurden die Datenbanken der National Germplasm Resources Laboratory's (NGRL) des United States Department of Agriculture [83] [84], für die The Germplasm Resources Information Network Database Management Unit (GRIN/DBMU) verantwortlich zeichnet, sowie Literatur nach Hinweisen auf Pflanzen, die eine Wirksamkeit bei Durchfallerkrankungen, insbesondere bei Dysenterie und / oder Shigellenruhr aufweisen, gesichtet. Aus der Reihe der erhaltenen Treffer wurden die Gerbstoffdrogen entfernt, da hier das Wirkprinzip vermutlich auf den adstringierenden Eigenschaften der Gerbstoffe beruht.

In das Screening mittels Ligandenfischen wurden daher Extrakte aus *Passiflora incarnata* L., *Allium sativum* L. und *Achillea millefolium* L. sowie *Urtica dioica* L. bzw. *Urtica urens* L. und *Centella asiatica* (L.) URBAN aufgenommen [86].

Für die TGT wurden auf synthetischem Wege über die Methoden des Virtuellen Screenings und des Molecular Modellings bereits Inhibitoren gefunden. Ihre mittels eines Enzymassays (siehe Abschnitt 7.1) bestimmten inhibitorischen Konstanten liegen im mikro- bis submikromolaren Bereich [87].

Einige der Verbindungen, die aus diesen Untersuchungen als wirksam hervorgegangen sind, weisen eine β -Carbolinon-Struktur auf (Abb. 14 A). Indolalkaloide besitzen eine β -Carbolin-Grundstruktur (Abb. 14 B). Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit auch Monoterpen-Indolalkaloide untersucht werden.



Abb. 14: β -Carbolinon (A) und β -Carbolin (B)

Unter diesem Aspekt wurden Extrakte und isolierte Alkaloide aus *Rauvolfia serpentina* (L.) BENTHAM ex KURZ sowie Extrakte aus *Aspidosperma quebracho-blanco* SCHLECHT. mittels Ligandenfischen auf Wirksamkeit an der TGT untersucht.

Um eine größere Anzahl an verschiedenen Strukturen einem Test auf Wirksamkeit zu unterziehen, wurden weiterhin die Monoterpen-Drogen *Valeriana officinalis* L. s. l. und *Vitex agnus-castus* L., die Steroidalkaloid-Droge *Solanum dulcamara* L., die Phytosterol-Droge *Pygeum africana* (HOOK. Fil.) KALKM. sowie die Isochinolinalkaloid-Drogen *Papaver somniferum* L. ssp. *somniferum* und *Chelidonium majus* L. ausgewählt.

Crataegus monogyna JACQ. emend. LINDM. bzw. *Crataegus laevigata* (POIR.) DC. wurden als weitere Flavonoiddrogen zur Untersuchung herangezogen, um auf eine generelle Wirksamkeit von Flavonoiden zu prüfen, nachdem in einem Extrakt der Flavonoiddroge *Passiflora incarnata* L. Substanzen mittels Ligandenfischen als potentielle Inhibitoren der TGT identifiziert werden konnten.

4.1.2 Auswahlkriterien für die Untersuchungen mit IGF-1-RTK

Die Auswahl der Pflanzen erfolgte nach Auswertung von Literatur und der Datenbanken. Genutzt wurden dazu die Datenbanken der NGRL des United States Department of Agriculture; Agricultural Research Service [83] [84].

Eine umfassende Zusammenstellung von Daten und Informationen aus wissenschaftlichen und ethnobiologischen Quellen zu bei verschiedensten Krebserkrankung wirksamen bzw. volksmedizinisch angewendeten Pflanzen lieferte J. L. Hartwell in den Jahren 1967 bis 1971 [88] [89], die ebenfalls zur Pflanzenauswahl herangezogen wurde.

Die Pflanzen, aus deren Extrakte mit der Methode des Ligandenfischens (Kapitel 5) eine Bindung von Substanzen an eines der beiden Targets (TGT bzw. IGF-1-RTK) festgestellt werden konnte, werden im Folgenden näher beschrieben.

4.2 *Passiflora incarnata* L.

Lange bevor die Passionsblume Einzug in den Arzneimittelschatz Europas hielt, faszinierte sie als eine Entdeckung der Seefahrer die Menschen der „alten Welt“. Vor allem wegen ihrer auffallenden Blütenform und deren vielfältiger Ausgestaltung in Form und Farbe in den etwa 500 Arten der Gattung, fanden diese Pflanzen insbesondere als Zierpflanzen viele Bewunderer. Es war der eigenartige Bau der weiß-violetten Blüten, der im frühen 17. Jahrhundert zur Namensgebung führte, da die fädige Nebenkrone als Symbol für die Dornenkrone, die fünf Staubblätter für die Wundmale, die Narben für den mit Essig getränkten Schwamm, der gestielte Fruchtknoten für den Kelch, die drei Griffel für die Nägel symbolisch mit dem Kreuzweg Christi verglichen wurden und die Ranken für die Geißel sowie die weiße Farbe in der Blüte für die Unschuld Christi standen. Diese Betrachtung schwingt im Namen noch mit: „Passio“ – das Leiden und „incarnata“ – die Fleischgewordene [90].

Ihre mystische Bedeutung hat die Passionsblume mittlerweile verloren. Heute wird der methanolische oder ethanolische Extrakt aus dem Kraut von *Passiflora incarnata* L. als Sedativum in Kombinationspräparaten (z.B. Kytta-Sedativum Dragees, Moradorm S, Vivinox Day Beruhigungsdragees) eingesetzt.

Volksmedizinisch wird die Droge in Amerika auch bei Diarrhoe eingesetzt [91]. J. C. Th. Uphof beschreibt in seinem „Dictionary of economic plants“ ebenfalls die Anwen-

derung der Droge bei Diarrhoe [92]. Pedro Montenegro, ein heilkundiger Missionar, berichtete im 17. Jahrhundert in seiner „Materia medica misionara“ von der Anwendung eines Extraktes der Wurzelrinde aus *Passiflora incarnata* L. als Trank gegen blutige Durchfälle [93].

Weitaus größere wirtschaftliche Bedeutung hat allerdings ein anderer Vertreter dieser Gattung, *Passiflora edulis* SIMS.. Wenn auch die Früchte von bis zu 60 Arten der Gattung *Passiflora* essbar sein sollen, werden nur aus den Früchten von *Passiflora edulis* SIMS., nach Abtrennung der Samen, Aromatika für Fruchtsäfte, Konfitüren, Milch-, Konditorei- und Desserterzeugnisse gewonnen. Im Handel befindet sich aber auch die ganze Frucht dieser Art.

4.2.1 Verbreitung und taxonomische Einordnung

Die Gattung *Passiflora* ist die größte der zur Familie der Passifloraceae gehörenden Gattungen. Botaniker und Sammler sorgten im 18. und 19. Jahrhundert für eine fast weltweite Verbreitung in milden Klimata, so dass die verschiedenen Arten der Gattung *Passiflora* heute in allen tropischen und subtropischen Gebieten anzutreffen sind. Einige gegen Kälte resistente Arten sind auch in milderer Gegenden Europas vorzufinden.

Passiflora incarnata L. ist ein in den tropischen Regenwäldern im Südosten der USA, auf den Bermuda-Inseln, den Antillen, in Mittelamerika, Brasilien und Argentinien heimischer, bis zu zehn Meter hoch werdender Kletterstrauch [94].

4.2.2 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung von *Passiflorae herba*

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde ein Trockenextrakt der Firma Finzelberg verwendet. Dieser wurde unter Verwendung von 60%igem Methanol aus dem Kraut von *Passiflora incarnata* L. gewonnen. *Passiflorae herba*, das Passionsblumenkraut, ist die im Europäischen Arzneibuch aufgeführte Droge dieser rankenden Pflanze.

Die leicht aromatisch riechende Droge besteht aus bis zu fünf Millimeter, seltener bis acht Millimeter dicken, rundlichen, hohlen, längsgestreiften Stängelstücken von grau-grüner, grüner oder bräunlicher Farbe mit grobporigem Bruch. Die lang gestielten, tief dreilappig geteilten, 6 – 15 Zentimeter langen Blätter sind unterseits fein behaart und besitzen einen einfach gesägten Rand sowie eine netzartige Nervatur. Am Blattgrund

entspringen zwei 2 – 8 Millimeter lange Nebenblätter; oberseits sind zwei höckerartige extraflorale Nektarien vorhanden. Weiterhin sind glatte, runde, aus den Blattachseln entspringende Ranken, die am Ende korkenzieherartig eingerollt sind, zu erkennen.



Abb. 15: *Passiflora incarnata* L.

Abbildung entnommen aus [95].

Die Pflanze bildet bis zu neun Zentimeter große, langgestielte Blüten mit drei Hochblättern mit papillösem Rand und zwei seitlich randständigen Höckern, einem fünfblättrigen Kelch mit grüner Außen- und weißlicher Innenseite, einer aus fünf weißen Kronblättern und aus mehreren weißen und purpurroten, fädigen Nebenkronblättern bestehenden Korolle sowie fünf auffällig großen Staubblättern. Der graugrüne, behaarte Fruchtknoten ist oberständig; der Griffel trägt auf drei langen Ästen kopfige Narben. Die flachgedrückten, grünlichen bis bräunlichen Früchte enthalten zahlreiche grubigpunktierte, bräunlichgelbe Samen.

Mikroskopisch sind besonders die auf den Stängel- und Blattanteilen vorkommenden, dünnwandigen Gliederhaare, die häufig in einer abgerundeten, hakig gebogenen Spitze enden, für die Droge charakteristisch [94] [96].

4.2.3 Inhaltstoffe der Droge Passiflorae herba

Passiflorae herba enthält hauptsächlich Flavonoide des Apigenin- und Luteolin-Typs, die überwiegend als C-Glycosylverbindungen vorliegen (Tab. 2).

Tab. 2: Flavonoide vom Apigenin- und Luteolin-Typ (C-Gluc = C-glycosidisch verknüpfte β -D-Glucose; C-Ara = C-glycosidisch verknüpfte α -L-Arabinose)

Apigenin-Typ				
Flavonoid	R1	R2	R3	R4
Apigenin	H	H	H	H
Vitexin	H	H	H	C-Gluc
Isovitexin	H	C-Gluc	H	H
Schaftosid	H	C-Gluc	H	C-Ara
Isochaftosid	H	C-Ara	H	C-Gluc
Luteolin-Typ				
Flavonoid	R1	R2	R3	R4
Luteolin	H	H	H	H
Orientin	H	H	H	C-Gluc
Iso-Orientin	H	C-Gluc	H	H

Harmanalkaloide, die zunächst für die sedative Wirkung des Passionsblumenkrautes verantwortlich gemacht wurden, kommen nur in Spuren vor und können deshalb nicht als alleinig wirksame Komponenten für die schlafanstoßende, spasmolytische und anxiolytische Wirkung angesehen werden. Dagegen konnte für die ebenfalls vorkommenden Flavonoidaglyka Chrysin und Apigenin gezeigt werden, dass sie anxiolytische Wirksamkeit besitzen. Chrysin entfaltet dabei seine Wirkung durch Aktivierung des GABA(A)-Rezeptors [94] [100].

4.3 **Aspidosperma quebracho-blanco SCHLECHT.**

Der Name der Pflanze kommt aus dem Griechischen, wobei *Aspidosperma*, abgeleitet von zwei Wörtern, die mit rundem Schild und Same übersetzt werden, Schildsame bedeutet. *Quebracho* ist an die beiden Wörter *quebar* = brechen und *hacha* = Axt angelehnt und wird mit *Axtbrecher* übersetzt; ein Ereignis, dass beim Fällen des Baumes aufgrund seines sehr harten Holzes oft eingetreten sein muss.

Erstmalige Erwähnung fand die Pflanze als H. Burmeister im Jahre 1860 Teile des Baumes zugleich mit Proben des roten *Quebrachoholzes* an D. F. L. von Schlechtendal sendete. Dieser hielt die Stammpflanzen beider für nahe verwandt, bis A. Grisebach ihre Verschiedenheit nachwies.

Die Rinde des Baumes gelangte zuerst 1878 durch F. Schickedanz nach Deutschland, wo G. Fraude noch im selben Jahr das *Aspidospermin* und O. Hesse im Jahr 1881 weitere Alkaloide fand [97].

4.3.1 **Verbreitung und botanische Beschreibung**

Aspidosperma quebracho-blanco, der Weiße *Quebracho*, ist ein bis zu 20 Meter hoher Baum, der in den Trockenwäldern von Südostbolivien, Chile, Südbrasilien und Argentinien in Höhenlagen zwischen 1400 und 1800 Metern beheimatet ist.

Der Stammdurchmesser kann bis zu 1,20 Meter betragen. Im folgenden werden die Teile der Pflanze beschrieben, die auch in Abb. 16 zu sehen sind. Die schlanken, hängenden Zweige sind glatt und mit leicht ablösbarem Periderm überzogen. Die immergrünen, lederartigen, einfachen, ungeteilten, ganzrandigen, länglichen oder länglich-lanzettlichen, drei bis fünf Zentimeter langen und etwa ein Zentimeter breiten Blätter stehen gegenständig oder dreizählig dicht gedrängt an den Zweigen. Blattrand und Mittelnerv vereinigen sich in einer bis zu einen Zentimeter langen Stachelspitze. Die in ausgebreiteten, reichblütigen Trugdolden angeordneten weißen bis gelbgrünen Blüten stehen achsel- oder endständig. Die Frucht besteht zunächst aus zwei Balgkapseln. Durch Fehlbildung der einen ist aber meist nach Ausreifung nur noch eine Kapsel vorhanden. Die reife Frucht erscheint graugrün, kahl, warzen- und drüsenlos und stark seitlich zusammen gedrückt. Sie kann entweder eine kreisrunde Form mit einem Durchmesser von etwa sechs Zentimetern besitzen oder oval bis schiefoval geformt

sein. Auf einer Seite sind die stark verholzten Balgkapseln mit einer erhabenen Linie gekennzeichnet.



Abb. 16: Illustration von *Aspidosperma quebracho-blanco* SCHLECHT.

A: Blütentragender Zweig; B: Fruchtweig; 1: Kelch; 2: Blütenknospe; 3: geöffnete Corolle von außen; 4: Corolle von innen; 5: Fruchtknoten, Längsschnitt; 6: Fruchtschale von innen mit Nabelsträngen; 7: Samen mit Nabelstrang; 8: Keimling. Abbildung entnommen aus [97].

Die Gattung *Aspidosperma* MART. ET ZUCC. wurde 1824 geschaffen, gehört zur Familie der Apocynaceae und umfasst etwa 80 Arten. Die *Aspidosperma*-Systematik wird allerdings dadurch erschwert, dass verschiedene Arten, die im gleichen Gebiet vorkommen, aufgrund von Hybridisation variieren und nicht eindeutig gegeneinander abzugrenzen sind [94].

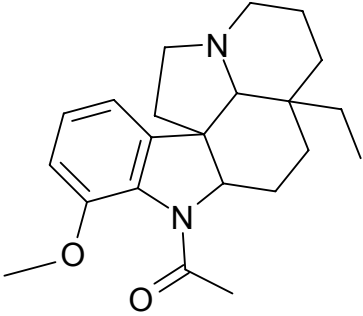
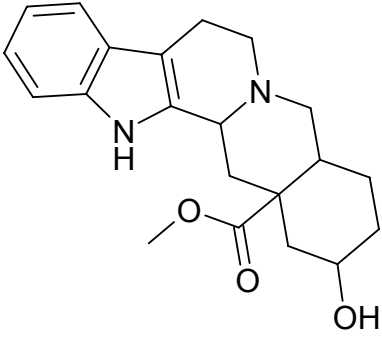
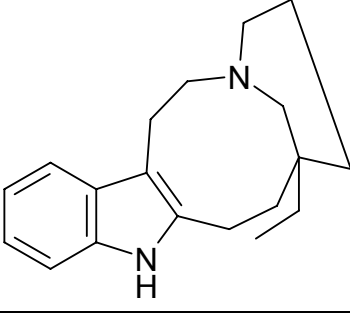
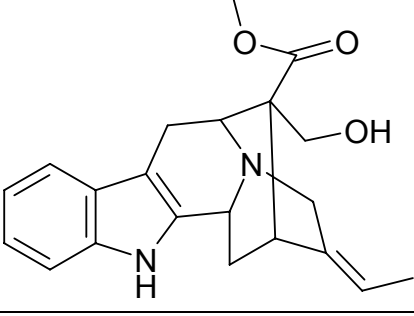
4.3.2 Quebracho cortex

Für die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die offizinelle Droge der Pflanze, Quebracho cortex DAC, verwendet. Die geruchlose, bitter schmeckende Droge wird aus der Rinde älterer Stämme gewonnen. Die ein bis drei Zentimeter flachen Rindenstücke sind auf der Außenseite mit einer dicken Borke überzogen. Die grobwulstige, mit zahlreichen Korklamellen durchzogene Borke zeigt tiefe Längs- und Querrisse. Ihre Außenseite hat eine schmutziggraue oder graubraune Farbe und lässt in den tieferen Schichten eine gelbrote oder ziegelrote Färbung erkennen. Im Querschnitt hebt sich die Borke scharf von der gleichstarken, blassen Mittel- und Innenschicht ab. Die innere Rinde ist von zwei- bis dreireihigen Markstrahlen durchzogen. Bastfasern kommen häufig isoliert und von Kristallzellreihen umgeben vor. Zum Teil sind Steinzellnester, zwei- bis vierfach zusammengesetzte Stärkekörner mit exzentrischem Spalt, dagegen aber keine Milchsaftröhren zu erkennen. Das Nichtvorhandensein der Milchsaftröhren dient neben weiteren Merkmalen als Unterscheidungskriterium dieser Art von anderen Aspidospermaarten. Sowohl in der Borke als auch in der Mittelrinde zeigen sich zahlreiche, rundliche, weiße Punkte, welche aus Gruppen von Sklerenchymzellen bestehen [98].

4.3.2.1 Quebracho-Alkaloide

Die Droge enthält 1 – 2,5 % Indolalkaloide (nach DAC 1986 mind. 1,0 % Gesamtalkaloide, berechnet als Yohimbin) mit den Hauptalkaloiden Aspidospermin, Yohimbin, (-)-Quebrachamin und Akuammidin (Tab. 3).

Tab. 3: Indolalkaloide aus *Quebracho cortex*

Vertreter	Strukturtyp	Struktur
Aspidospermin	Aspidospermin-Typ	
Yohimbin	Yohimbin-Typ	
Quebrachamin	Quebrachamin-Typ	
Akuammidin	Sarpagin-Typ	

Laut gaschromatographischen Bestimmungen liegt der Anteil am Gesamtalkaloidgehalt für Aspidospermin bei ca. 30 %, für Yohimbin bei ca. 10 % und für (-)-Quebrachamin bei ca. 2,5 %. Der durch präparative Dünnschichtchromatographie ermittelte Akuammidin-Anteil am Gesamtalkaloidgehalt beträgt ca. 10 %. Das Vorkommen von Gerbstoffen wird kontrovers diskutiert [94] [99].

Abgeleitet aus empirischen Beobachtungen, auch aus der Volksmedizin, wird die Droge als Atemanaleptikum bei Asthma, Bronchitis und Affektion der Atmungsorgane angewendet. Kontrollierte klinische Studien fehlen derzeit. Für *Aspidospermin* wurde am Kaninchen nach i.v. Gabe eine deutliche Zunahme der Atemfrequenz festgestellt [94].

Quebrachorinde wird ferner auch bei Fieber, Krämpfen sowie, wegen ihres bitteren Geschmackes, auch zur Appetitanregung und in der Lebensmittelindustrie als Geschmackskorrigenz eingesetzt. In der Homöopathie wird die Rinde bei Atemwegserkrankungen verwendet (Bomapect forte Hustentropfen). Die Kommission D hat dazu eine Monographie erstellt. Eine weitere Anwendung der Rindendroge besteht auch bei verminderter Libido und Ejakulationsstörungen (Afrodor 2000). Aus den auf dem deutschen Arzneimittelmarkt befindlichen Fertigarzneimitteln ist die Quebrachorinde fast verschwunden [99] [100].

4.4 Centella asiatica (L.) URBAN

Die Gattung *Centella* L. gehört zur Familie der Apiaceae (Umbelliferae) und besteht aus etwa 20 Arten. Die drogenliefernde Art *Centella asiatica* (L.) URBAN ist ein an Gewässern sowie feuchten und sumpfigen Stellen Südasiens, Indiens, Sri Lankas, in Teilen Chinas, auf westlichen Südseeinseln und Madagaskar, in Südafrika, dem Südosten der USA sowie im Osten Südamerikas beheimatetes Kraut. Von der Art sind unterschiedliche chemische Rassen bekannt. *Centella asiatica* (L.) URBAN ist eine kriechende, an den Knoten bewurzelte Pflanze, dessen oberirdische Teile zur Gewinnung der Droge *Centellae asiaticae herba* (asiatisches Wassernabelkraut) dienen. Die Droge enthält etwa 0,1 % ätherisches Öl, Flavonolderivate des Quercetin- und Kämpferoltyps und Triterpensäuren sowie Triterpensäure-Zuckerester (Pseudosaponine).

In Tierversuchen wurden für einen mit 50%igem Ethanol hergestellten Auszug der Droge psycho-neuropharmakologische Wirkungen festgestellt. Für das in der Droge gefundene Asiaticosid bzw. für ein Asiaticosidgemisch werden eine am Tiermodell untersuchte ulcus-protective sowie eine wundheilende und venentonisierende Wirkung beschrieben. Außerdem zeigt Asiaticosid antimikrobielle Wirkungen im Agardiffusionstest gegen *Pseudomonas pyocyaneus* und *Trichoderma mentagrophytes*.

Volkstümliche Anwendung findet die Droge in Indien bei Hautkrankheiten, Syphilis und Rheumatismus sowie als Adjuvans in der Leprabehandlung und wird weiterhin zur Entwässerung eingesetzt. Auf Java verwendet man die Droge bei zu geringer Harnausscheidung, in China bei körperlicher und geistiger Erschöpfung, auf Sri Lanka und Madagaskar gegen Lepra, auf den Fidschi-Inseln gegen Diarrhoe und Augenkrankheiten, in Thailand gegen Entzündungen, Asthma und Bluthochdruck und in Indonesien bei Harnwegsinfekten [94].

4.5 Glycyrrhiza glabra L.

Liquiritiae radix, die officinelle Droge der bis zu 1,70 Meter hohen Staude, wird aus der geschälten oder ungeschälten kräftigen Pfahlwurzel, ihren etwa zwei Zentimeter dicken Nebenwurzeln und viele Meter lang werdenden unterirdischen Ausläufern gewonnen. Sie enthält 3 – 9 % Triterpensaponine, Flavon- und Isoflavonglykoside, Cumestan- und Hydroxycumarinderivate sowie saure Heteropolysaccharide (Glycyrrhizane). Hauptkomponente der Saponinfraktion ist die Glycyrrhizinsäure. Die Staude selbst gehört der Familie Fabaceae an. Von der Art *Glycyrrhiza glabra* sind vier Varietäten bekannt, die in Süd-, Südosteuropa, dem Kaukasusgebiet, West- und Mittelasien beheimatet sind.

Über die Droge wird berichtet, dass sie neben den spasmolytischen Eigenschaften auch resorptionsfördernde, antibakterielle, antiinflammatorische, östrogene, antivirale, antipyretische, antirheumatische, antihepatotoxische, diuretische, choloretische, antihypercholesterämische sowie das Wachstum von Tumoren und die Metastasenbildung hemmende Wirkungen besitzt. Durch die enthaltenen Saponine besitzt die Droge darüber hinaus auch oberflächenaktive Eigenschaften [94] [100].

4.6 Solanum dulcamara L.

Die aus der Familie der Nachtschattengewächse stammende Pflanze dient zur Gewinnung der Droge *Dulcamarae stipites* (Stängel des Bittersüßen Nachtschattens), die als Adjuvans bei der Behandlung chronischer Ekzeme eingesetzt wird. Der Halbstrauch ist in Europa, Nordafrika, Ost- und Westasien, Indien sowie in Nordamerika beheimatet. Alle Pflanzenteile besitzen einen zunächst bitteren, dann süßen Geschmack, woraus auch die Namensgebung der Pflanze resultierte. Als Hauptinhaltsstoffe der Droge *Dulcamarae stipites* sind die Glykoalkaloide Solanin, Solasonin, Soladulcidin und Solama-

rin zu nennen. Dies sind Steroidalkaloide, die auch als Pseudosaponine bezeichnet werden. Ferner sind als echte Saponine Dulcamaretinsäure und Dulcamarinsäure bekannt, die ebenso wie Gerbstoffe und Dulcamarin (glykosidischer Bitterstoff) zu dem Inhaltsstoffspektrum der Droge gehören [94] [100].

Aus Teilen der in diesem Kapitel näher beschriebenen und weiteren Pflanzen wurden verschiedene Extrakte hergestellt. Zum Teil standen auch kommerziell erhältliche Trockenextrakte zur Verfügung. Die Extrakte wurden mit der Methode des Ligandenfischens auf Vorhandensein von an die TGT oder an die IGF-1-RTK bindende Substanzen untersucht.

5 Ligandenfischen

In diesem Kapitel wird die Methode des Ligandenfischens näher erläutert. Im Anschluss daran werden im selben Kapitel die Ergebnisse der Ligandenfischversuche aus den verschiedenen Extrakten mit den beiden Targets TGT und IGF-1-RTK vorgestellt.

Wie schon in der Einleitung angeführt, steht mit dem Ligandenfischen eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt, ein kostengünstiges und schnelles Screening von Naturstoffgemischen im Hinblick auf potentielle neue Pharmaka durchzuführen. Diese Screeningmethode wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch speziell zur Identifizierung von Liganden in komplexen Substanzbibliotheken und im Hinblick auf Durchführbarkeit an der Hochschule entwickelt [10]. Die Umsetzung des Ligandenfischens an der Universität wird gegenüber dem sonst für diese Zielsetzung angewendeten Hochdurchsatzscreening (HTS) vor allem durch den geringen apparativen Aufwand ermöglicht. Zur Durchführung des Ligandenfischens ist neben üblichen Laborgeräten, wie z.B. einer Zentrifuge, nur die zur Vermessung der Proben benötigte analytische HPLC-Anlage mit geeignetem Detektor erforderlich. Ebenso sind keine besonderen Anforderungen an die Laboratorien zu stellen, da eine radioaktive oder andersartige Markierung der Liganden nicht notwendig ist.

Die zeitaufwendige und lösungsmittelintensive Auftrennung eines Pflanzenextraktes erfolgt bei Anwendung des Ligandenfischens, im Gegensatz zum HTS, erst nach mit dieser Methode festgestellter Wirksamkeit. Zudem kann die Auftrennung des wirksamen Pflanzenextraktes nun gezielt im Hinblick auf die bindende(n) Substanz(en) erfolgen. Dies zieht eine weitere Zeit- und Kostenersparnis nach sich, da nicht notwendige Trennungen unwirksamer Fraktionen vermieden werden.

Weiterhin besteht in der Möglichkeit, mit dieser Methode auch wirksame Substanzkombinationen entdecken zu können, ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem HTS [104].

Im Vergleich mit anderen Verfahren zur Leitstruktursuche, wie z.B. dem „Molecular Modelling“, bietet das Ligandenfischen den Vorteil, dass weder die dreidimensionale Struktur oder die Sequenz des Proteins, noch die Struktur eines Inhibitors oder des natürlichen Substrates bekannt sein müssen.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Pflanzenextrakte an einem Enzym und an einer Untereinheit eines Rezeptors mittels des Ligandenfischens auf bindende Substanzen untersucht werden. Große Konzentrationsunterschiede der Inhaltsstoffe eines Extraktes können dabei, wie im folgenden Abschnitt erläutert, zu ungünstigen Bindungsverhältnissen von Protein zu potentielltem Ligand führen. Um das Konzentrationsverhältnis zwischen Protein und Ligand vorteilhafter einzustellen, können Experimente mit Extraktfraktionen oder sogar Einzelsubstanzen, wie im Abschnitt 5.3 zu lesen, sinnvoll sein.

Da mit der Bindung eines Liganden an das Zielprotein zunächst nur ein biochemischer Nachweis erfolgt, sollte die pharmakologische Wirksamkeit mit anderen Assays oder durch HPLC-Analytik nach Verdrängung des potentiellen Liganden durch einen bekannten, stärker an das Targetprotein bindenden Liganden belegt werden.

5.1 Prinzip und Durchführung der Bindungsexperimente

Enzyme katalysieren durch erleichterte Bildung und selektive Stabilisierung des jeweiligen Übergangszustandes eines Substrates eine von verschiedenen möglichen Reaktionen. Aufgabe der meisten Arzneistoffe ist, den Ablauf der durch ein Enzym katalysierten oder durch Bindung an einen Rezeptor ermöglichten biochemischen Reaktion zu verhindern. Um die Frage, in wie weit ein potentieller Arzneistoff dieser biochemischen Anforderung gerecht wird, zu beantworten, werden Bindungsassays, wie z.B. das Ligandenfischen (Abb. 17), durchgeführt.

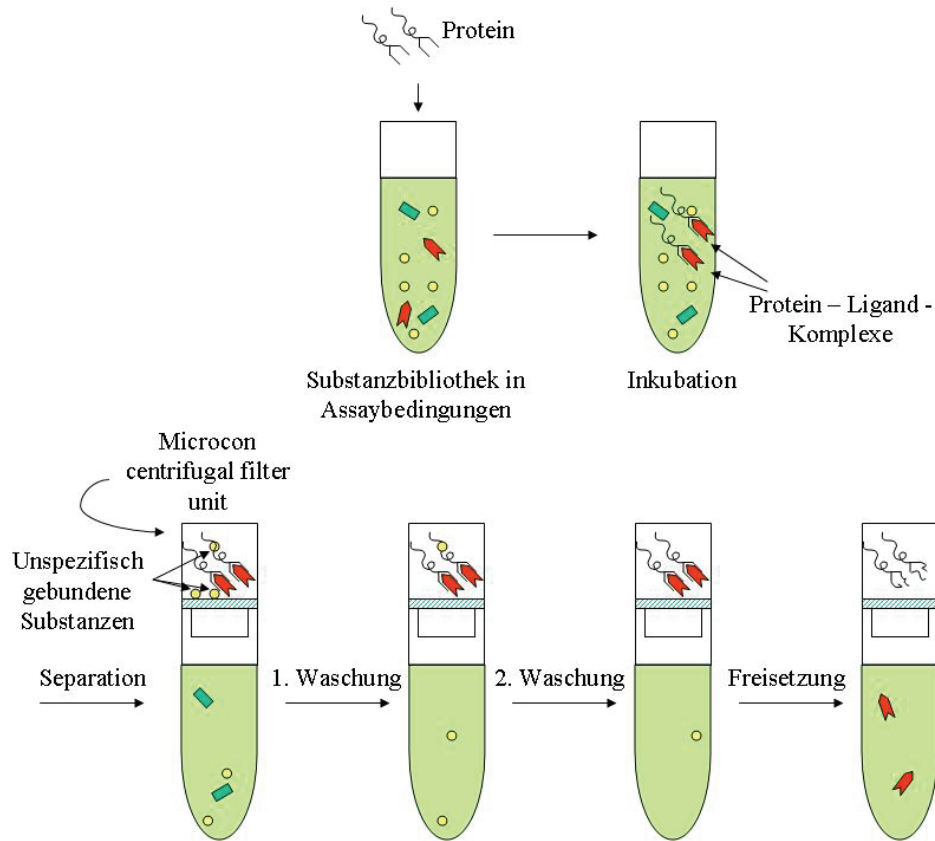


Abb. 17: Schematische Darstellung zur Durchführung des Ligandenfischens

5.1.1 Theoretische Betrachtungen der Vorgänge während der Inkubation

Zunächst wird beim Ligandenfischen dem Zielprotein, z.B. einem Enzym oder Rezeptor, die mehr oder weniger heterogene Substanzbibliothek präsentiert. Unter den für die Aktivität des Proteins optimalen Bedingungen kommt es, bei entsprechender sterischer und elektronischer Komplementarität, im abgeschlossenen Reaktionsraum zur Ausbildung von Protein-Ligand-Komplexen. Die Bildung dieser Komplexe erfolgt nach E. Fischers Schlüssel-Schloss-Prinzip [105] und der von D. E. Koshland aufgestellten „Induced-fit-Theorie“ [106]. Aufgrund dessen sind im Reaktionsansatz während der Inkubation folgende Reaktionen zwischen dem Protein und den Substanzen aus der zugefügten Substanzbibliothek denkbar (Abb. 18):

Die Methodik des Ligandenfischens kann sowohl mit einer an das Target bindenden Einzelsubstanz (Abb. 18 a), als auch mit einem Gemisch an Substanzen durchgeführt werden. Bei Inkubation des Proteins mit einem komplexen Substanzgemisch, etwa einem Naturstoffextrakt, sucht sich das Protein den passenden Liganden aus dem Ge-

misch an Verbindungen (Abb. 18 b). Aufgrund der Vielzahl an Verbindungen, die ein Pflanzenextrakt enthält, kann das Targetprotein auch zu mehr als einer Substanz eine Affinität besitzen. Diese Substanzen konkurrieren dann um die Bindungsstelle am Protein (Abb. 18 c). Im Gegensatz dazu können aber auch synergistische Effekte bei der Ligandenbindung auftreten. So ist es möglich, dass eine wirksame Kombination von zwei Substanzen auftritt, indem diese nur zusammen die Bindetasche optimal besetzen (Abb. 18 d). In getrennten Bindungsexperimenten wäre jede Substanz für sich genommen gar nicht oder nur in geringem Ausmaß an das Protein gebunden worden. Das Auftreten eines pharmakologischen Effektes mit nur einer der beiden Substanzen ist unwahrscheinlich. Aber auch das Vorkommen von allosterischen Mechanismen nach dem „Induced-fit-Modell“ ist denkbar. Dabei bindet eine Substanz an das Protein, wodurch an einer anderen Stelle des Proteins eine Konformationsänderung resultiert, die die Bindung einer zweiten Substanz in der geänderten Bindetasche ermöglicht (Abb. 18 e). Wären die Substanzen in getrennten Bindungsexperimenten dem Protein zugeführt worden, hätte nur eine Substanz als biochemisch wirksam erkannt werden können, ohne jedoch in weiteren Tests pharmakologische Wirkung zu zeigen. Möglicherweise kann die Bindung einer zweiten Substanz aufgrund des Mangels eines nun passenden Liganden bei Untersuchungen mittels Ligandenfischen nicht beobachtet werden (Abb. 18 f). Generell können neben den genannten Komplexierungen auch unspezifische Bindungen von Substanzen am Protein auftreten (Abb. 18 g).

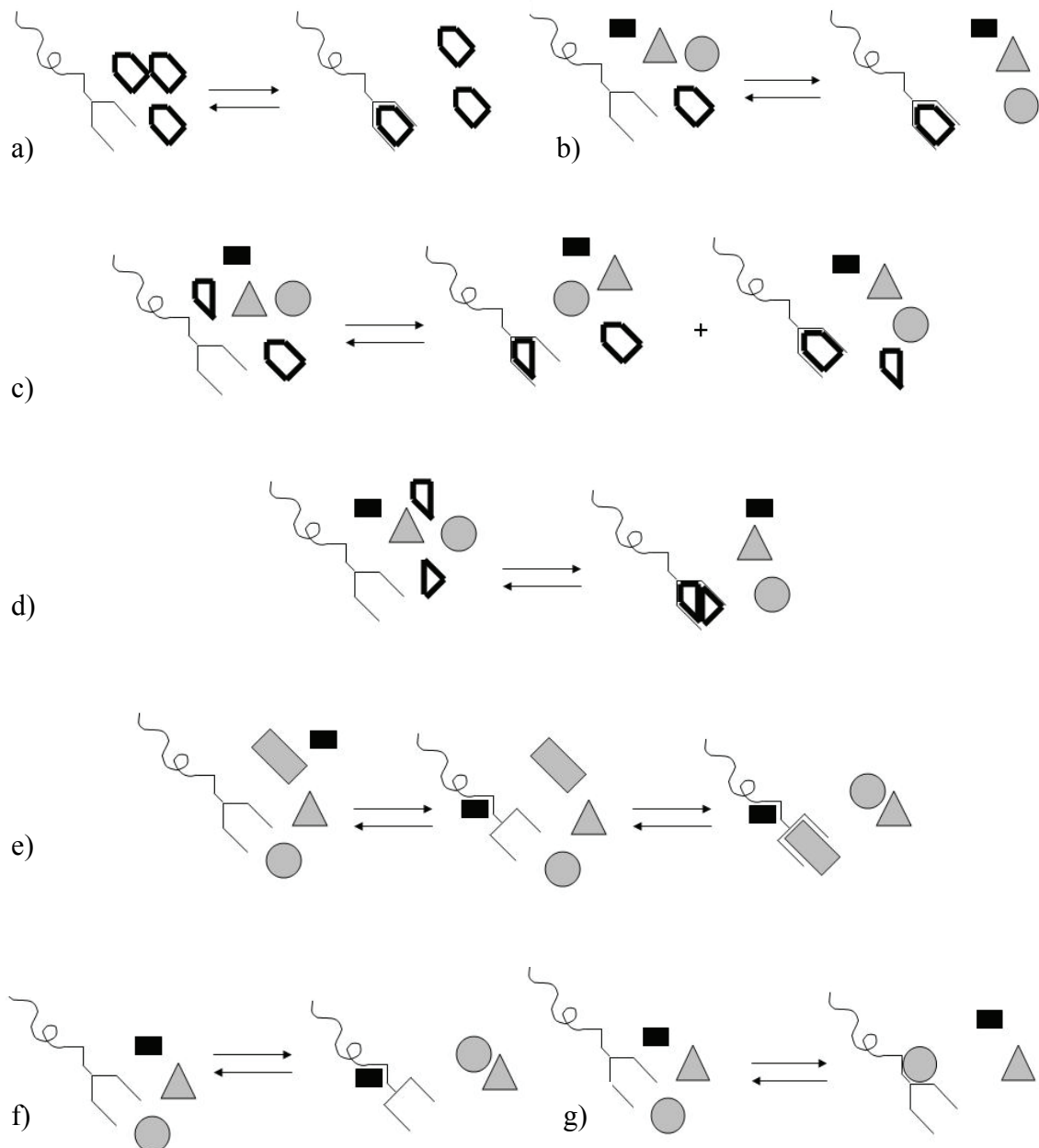


Abb. 18: Schematische Darstellung möglicher Protein-Ligand-Interaktionen beim Ligandenfischen während der Inkubation

a) Inkubation mit nur einer bindenden Substanz, b) Inkubation mit einem Substanzgemisch, c) Inkubation mit einem Substanzgemisch, wobei zwei Liganden enthalten sind, d) synergistischer Effekt durch optimale Bindung eines Substanzkomplexes, e) allosterische Bindung nach der „Induced-fit-Theorie“, f) allosterische Bindung ohne Bindung eines zweiten Liganden in der veränderten Bindetasche, g) unspezifische Bindung an der Proteinoberfläche.

In einem Pflanzenextrakt können, wie bereits oben erwähnt, oftmals viele hundert verschiedene Verbindungen enthalten sein. Daher ist das Vorliegen mehrerer potentieller Liganden in dem Substanzgemisch möglich. Aus diesem Grund spielen bei der Bildung

der einzelnen oben beschriebenen Komplexe die Größen der Dissoziationskonstanten sowie die Konzentrationen der möglichen Liganden eine entscheidende Rolle.

Die Bindung eines Liganden (also Substrat- oder Inhibitormolekül) A an ein Makromolekül E in Form eines Protein-Ligand-Komplexes EA lässt sich mit der Gleichung



wiedergeben.

Dabei kann die Assoziationskonstante K_a (2) oder deren Kehrwert, die Dissoziationskonstante K_D (3), nach dem Massenwirkungsgesetz in verdünnten Lösungen, wie sie beim Ligandenfischen vorliegen, folgendermaßen beschrieben werden:

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[EA]}{[A] \cdot [E]} \quad (2)$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[A] \cdot [E]}{[EA]} \quad (3)$$

Bei Bindungsexperimenten sind in der Regel die Ausgangsmengen an Protein $[E]_0$ und Ligand $[A]_0$ bekannt:

$$[E]_0 = [E] + [EA] \quad (4)$$

$$[A]_0 = [A] + [EA] \quad (5)$$

Abgeleitet aus diesen beiden Gleichungen entspricht in einem einfachen Reaktionsgleichgewicht und bei äquimolaren Verhältnissen der Anteil an gebundenem Ligand $[A]_{\text{geb}}$ dem Anteil an besetzten Bindungsstellen θ im Protein.

$$[EA] = [A]_0 - [A] = [A]_{\text{geb}} = [E]_0 - [E] = \theta \quad (6)$$

Durch Einsetzen von (6) in (3) ergibt sich:

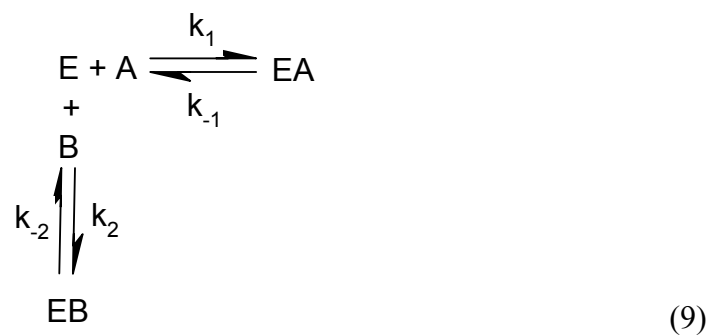
$$K_D = \frac{([E]_0 - [EA]) * [A]}{[EA]} \quad (7)$$

Nach Einsetzen von (7) in (6) kann (8) formuliert werden:

$$[A]_{geb} = [EA] = \frac{[E]_0 * [A]}{K_D + [A]} = \theta \quad (8)$$

Nach Gleichung (8) gilt: je kleiner die Dissoziationskonstante oder / und je größer die Konzentration des Liganden A, desto mehr Bindungsstellen können im Protein besetzt werden. Ebenso verhält sich die Inhibitionskonstante im Falle eines Inhibitors als Ligand.

Betrachtet man nun den Fall, dass zwei potentielle Liganden in einem Substanzgemisch vorliegen (9), können sich folgende Konstellationen der Parameter Affinität des Proteins zur Substanz und Konzentration der Substanzen ergeben (13):



$$K_{DA} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[A] * [E]}{[EA]} \quad (10)$$

$$K_{DB} = \frac{k_{-2}}{k_2} = \frac{[B] * [E]}{[EB]} \quad (11)$$

Die Gesamtmenge an Protein ergibt sich damit aus:

$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EB] \quad (12)$$

Nach den Gleichungen (10) und (11) lassen sich [E] und [EB] durch K_{DA} und K_{DB} ersetzen. Durch Umstellung und Kombination mit Gleichung (6) ergibt sich:

$$[EA] = \frac{[E]_0 * [A]}{[A] + K_{DA} * \left(1 + \frac{[B]}{K_{DB}}\right)} = [A]_{geb} = \theta \quad (13)$$

Wie aus Gleichung (13) ersichtlich, wird diejenige Verbindung mit der kleineren Dissoziationskonstante K_D bzw. der höheren Konzentration mehr Bindungsstellen belegen können. Extreme Unterschiede dieser beiden Parameter zwischen zwei möglichen Liganden können dazu führen, dass nur einer der beiden vom Protein gebunden wird. Die Bindung der schwächer affinen bzw. geringer konzentrierten Substanz würde also nur in Abwesenheit der anderen erfolgen und auch dann, nach Gleichung (8), nur gering ausgeprägt sein [107]. Folglich kann die Anwesenheit eines hoch potenten, jedoch gering konzentrierten Liganden durch die Anwesenheit eines in großen Mengen im Substanzgemisch vorkommenden, schwach potenten Liganden überdeckt und auch mit dem Ligandenfischen übersehen werden. Deshalb vermag die Durchführung des Ligandenfischens auch mit Fraktionen oder Einzelsubstanzen durchaus sinnvoll zu sein.

Des Weiteren ist aus Gleichung (13) ebenso zu erkennen, dass die Menge des eingesetzten Proteins gerade entscheidend für die Detektion von schwächeren Liganden ist.

5.1.2 Praktischer Ablauf der Inkubation

Eine grafische Darstellung zu den in diesem und in den folgenden Abschnitten gemachten Erläuterungen zur Durchführung des Ligandenfischens befindet sich in Abb. 17 (Seite 47).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche des Ligandenfischens wurde zu der in einem Eppendorfgefäß befindlichen, gepufferten Lösung des Pflanzenextraktes bzw. der Substanz eine definierte Menge an Protein in ebenfalls gepufferter Lösung gegeben. Die Eppendorfgefäße wurden vor Verwendung mit Methanol im Ultraschallbad behandelt, um Weichmacher aus der Gefäßwand herauszulösen, die anderenfalls in den Chromatogrammen der mit dem Ligandenfischen erhaltenen Proben stören würden.

Diese Ansätze wurden zusammen mit parallel angefertigten Proben, die kein Protein enthielten, über eine bestimmte Zeit bei definierter Temperatur inkubiert. Die Blindproben dienen dem Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen, die etwa durch unspezifische Bindung an die Filtermembran entstehen können.

5.1.3 Filtration des Inkubationsansatzes

Die unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführten Bindungsstudien erfordern eine Abtrennung der während der Inkubation nicht gebundenen Substanzen vom Protein-Ligand-Komplex. Diese Abtrennung erfolgte durch Anwendung einer Ultrafiltration durch einen Filter geeigneter nominaler Ausschlussgröße. Die Ausschlussgröße muss so gewählt werden, dass die Protein-Ligand-Komplexe auf der Membran liegen bleiben, während niedermolekulare, nichtbindende Substanzen die Membran passieren können. Die Ultrafiltration wurde bis zur vollständigen Filtration des auf den Filter aufgebrauchten, kompletten Volumens der Inkubationslösung betrieben. Sie stellt unter anderem eine gängige Methode zur Konzentrierung und Entsalzung von Proben sowie zur Trennung von Molekülen unterschiedlicher Molekulargewichtsbereiche dar.

5.1.4 Waschungen

Um unspezifisch an das Protein oder an die Filtermembran adsorbierte Substanzen zu entfernen, schlossen sich nun zwei Waschschrte an. Dazu wurden auf die auf der Filtermembran liegenden Protein-Ligand-Komplexe in jedem Waschschrte je 150 µl kalte Pufferlösung gegeben und anschließend jeweils eine Ultrafiltration durchgeführt. Durch die Verwendung von etwa 4 °C kalter Pufferlösung sollte eine Dissoziation der während der Inkubation gebildeten Protein-Ligand-Komplexe vermieden werden. Auch hier erfolgte die Filtration vollständig.

5.1.5 Freisetzung

Um nun die an das Protein gebundenen Substanzen aus dem Protein-Ligand-Komplex zu befreien, wurden auf die reinen, sich auf der Filtermembran befindlichen, Komplexe 200 µl einer Freisetzungslösung gegeben. Diese setzte sich aus Methanol, Wasser und Trifluoressigsäure zusammen.

Mit diesem Freisetzungsreagenz lassen sich alle nicht-kovalent an das Protein gebundenen Substanzen erfassen. Da das Freisetzungsreagenz aber einen sehr niedrigen pH-Wert besitzt, sind auch Spaltungen von Bindungen kovalenter Art, etwa im Falle einer Esterbindung, die zur Freisetzung eines kovalent gebundenen Liganden führen, denkbar.

Nach zehnminütiger Einwirkzeit der Freisetzungslösung auf die Komplexe wurden die freigesetzten Ligandmoleküle nach abermaliger, vollständiger Ultrafiltration im Filtrat der Freisetzung qualitativ und quantitativ analysiert.

5.1.6 Vermessung und Auswertung der mit dem Ligandenfischen erhaltenen Proben

Die aus den vier Ultrafiltrationen erhaltenen Filtrate sowie eine Probe der gleichen Menge an in der Inkubation verwendeter Pflanzenextrakt- oder Substanzlösung wurden bis zur Trockne im Vakuumkonzentrator eingeengt. Die getrockneten Proben wurden anschließend in einem definierten Volumen der für die kapillar-HPLC-analytische Vermessung zu verwendenden mobilen Phase gelöst und vermessen.

Die Auswertung der fünf erhaltenen Chromatogramme erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Die Zuordnung der Peaks ein und derselben Substanz in den vier Chromatogrammen der Filtrate aus dem Ligandenfischen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und des mit einem Photodiodenarraydetektor (PDA-Detektor) gemessenen Elektronenspektrums. Zusätzlich wurden die UV-Spektren der aufsteigenden Flanke und der absteigenden Flanke eines Peaks voneinander substrahiert (Ratio Plot), um die Identität weiter zu erhärten.

Über die Integration der Peaks einer gefischten Substanz in den einzelnen Chromatogrammen lassen sich Rückschlüsse auf die Konzentrationsverhältnisse dieser Substanz in den einzelnen Proben im Verlauf des Ligandenfischens ziehen. Aus diesen Verhältnissen können Aussagen über das Bindungsverhalten einer Substanz an das Protein getroffen werden. Dabei ist jedoch ein Vergleich mit dem Verlauf der Konzentrationen dieser Substanz in den Filtraten der Blindprobe unerlässlich.

5.1.7 Abschließende Bemerkungen zur Methode des Ligandenfischens

Die angegebenen Volumina, die zur Waschung der Komplexe und zur Freisetzung der Substanzen aus den Komplexen verwendet wurden, haben sich laut den Versuchen von J. Lenz [10] als ausreichend erwiesen. Die Zusammensetzung der Freisetzungslösung wurde ebenfalls aus dieser Arbeit übernommen.

Tritt während des Ligandenfischens trotz der Waschungen eine starke Bindung von Substanzen an die Filtermembran auf, könnte sie durch geeignete Absättigung der Filter

umgangen werden. Dazu sind aus der Proteinanalytik verschiedene Verfahren bekannt, die in diesem Fall wirksam sein können [108]. Außerdem ist eine Bindung von Substanzen an die Gefäßwände der verwendeten Eppendorfcaps denkbar. Diese Substanzen wären der Detektion entzogen.

Um eine chemische Veränderung der in der Substanzbibliothek enthaltenen Substanzen, vor allem eine Umsetzung mit dem Freisetzungsreagenz ausschließen zu können, ist ein chromatographischer Abgleich mit der Inkubationslösung sinnvoll. Aus diesem Grund wurde, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, eine entsprechende Menge an unbehandelter, lediglich in Puffer gelöster Pflanzenextrakt- oder Substanzlösung getrocknet und chromatographisch vermessen werden.

Damit eine Substanz, die während der Inkubation an das Protein gebunden wurde, auch als solche detektierbar ist, muss sie neben der chemischen Stabilität auch die nötige Löslichkeit im Puffersystem der Inkubationslösung und im Freisetzungsreagenz sowie in der mobilen Phase unter Anfangsbedingungen der HPLC aufweisen.

Das in dieser Arbeit verwendete kapillarchromatographische System war mit einem PDA-Detektor ausgestattet. Deshalb konnten nur solche an das Protein gebundene Substanzen detektiert werden, die ein Chromophor besitzen, welches im ultravioletten Bereich absorbiert. Aus diesem Grund wäre für die Vermessung der Proben aus dem Ligandenfischen ein kapillarchromatographisches System mit universellem Detektor, z.B. einem Lichtstredetektor (ELSD) oder einer Kopplung mit einem Massenspektrometer als Detektor (HPLC-MS-Kopplung) wünschenswert. Damit könnten neben bindenden Einzelsubstanzen ohne Chromophor vor allem auch Substanzkombinationen erfasst werden, bei denen beide oder auch nur eine Substanz bisher nicht detektierbar war. Im ersten Fall wären die entsprechenden Substanzbibliotheken fälschlicherweise als nicht wirksam deklariert worden. Im zweiten Fall hätte in der Substanzbibliothek durchaus die Bindung einer Substanz nachgewiesen werden können. Deren Bindungseigenschaft wäre allerdings nach Isolierung dieser Substanz aus dem Gemisch nicht oder nur in schwächerem Ausmaß reproduzierbar, da die zweite, zum synergistischen Effekt beitragende Substanz für eine Bindung am Protein nun nicht zur Verfügung stünde. Des Weiteren könnten mit einer HPLC-MS-Kopplung zusätzliche Daten zur schnelleren Identifizierung einer bindenden Substanz erhalten werden.

Generell können mit dem Ligandenfischen aber nur hoch bis mäßig potente Inhibitoren erfasst werden. Der Grund liegt in der Größe der Dissoziationskonstante des Enzym-Ligand-Komplexes im Vergleich zur Zentrifugationsdauer. Aber auch die Aktivität des verwendeten Proteins ist entscheidend. Nach A. Levitzki [114] ist die Anwendbarkeit der Ultrafiltration auf Liganden mit einer Dissoziationskonstante kleiner als 5 nM beschränkt. J. Lenz konnte bei ihren Versuchen mit dem Ligandenfischen an Thrombin den Nachweis erbringen, dass mit dieser Methode auch noch Liganden mit einer um den Faktor 84 höheren Dissoziationskonstante nachweisbar sind [10]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Grenze bei Ligandenfischexperimenten mit der TGT nochmals um den Faktor 48 hin zu höheren Dissoziationskonstanten verschoben werden (siehe Abschnitt 5.2.5).

5.2 Ergebnisse der Ligandenfischversuche mit TGT

Im Folgenden sollen die unter Verwendung des Targets TGT mit verschiedenen Monosubstanzen und Pflanzenextrakten erzielten Ergebnisse näher erläutert werden. Die genauen Bedingungen der jeweiligen Versuche sind im Abschnitt 9.1.1 des experimentellen Teils aufgeführt.

5.2.1 Einstellung der Versuchsbedingungen für das Ligandenfischen mit TGT

Durch „Molecular Modelling“ konnten in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. G. Klebe, Philipps-Universität Marburg, und Prof. Dr. F. Diederich, ETH Zürich, bereits Inhibitoren der *Z. mobilis*-TGT gefunden werden. 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$) stellte zu Beginn der Versuche zu der vorliegenden Arbeit den potentesten Inhibitor aus den beiden Forschungsgruppen dar [110]. Dieser sollte zur Optimierung der Parameter für das Ligandenfischen, wie z.B. benötigte Enzymmenge und Einstellung eines optimalen Enzym-Ligand-Verhältnisses, genutzt werden.

Die Inkubationstemperatur und die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wurden den Versuchsbedingungen des Enzymassays (siehe Abschnitt 7.1) entnommen. Als Inkubationsdauer wurden die in den Patenten zum Ligandenfischen genannten 60 Minuten gewählt [111] [112] [113]. Veränderungen erfolgten bei der eingesetzten Enzym- und Inhibitormenge (9.1.1.7.1, Methode 1). Die Protein-Ligand-Verhältnisse variierten dabei zwischen 1:1 und 1:40. Es wurden zwischen 2 nmol und 800 pmol TGT pro Probe

eingesetzt. Nur bei Verwendung von 800 pmol TGT konnte eine Zunahme der Peakfläche des Inhibitors in der Freisetzungslösung gegenüber der Blindprobe beobachtet werden (Abb. 19).

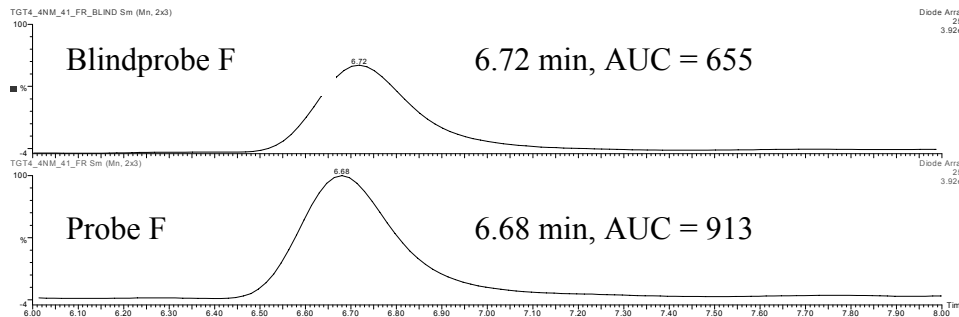


Abb. 19: Chromatogramme der Freisetzungen von Probe F und zugehöriger Blindprobe aus dem Ligandenfischen mit TGT

Exemplarische Darstellung der kapillarchromatographisch vermessenen Proben der Freisetzung aus einem Ligandenfischen mit 800 pmol TGT. In diesem Fall wurden 3200 pmol Inhibitor eingesetzt (siehe Abschnitt 9.1.1.7, Methode 1, Probe F). Die Peakfläche in der Probenfreisetzung ist größer als die in der Blindprobe.

Das Enzym-Ligand-Verhältnis wurde unter Verwendung von 800 pmol TGT zwischen 1:1, 1:2 und 1:4 variiert.

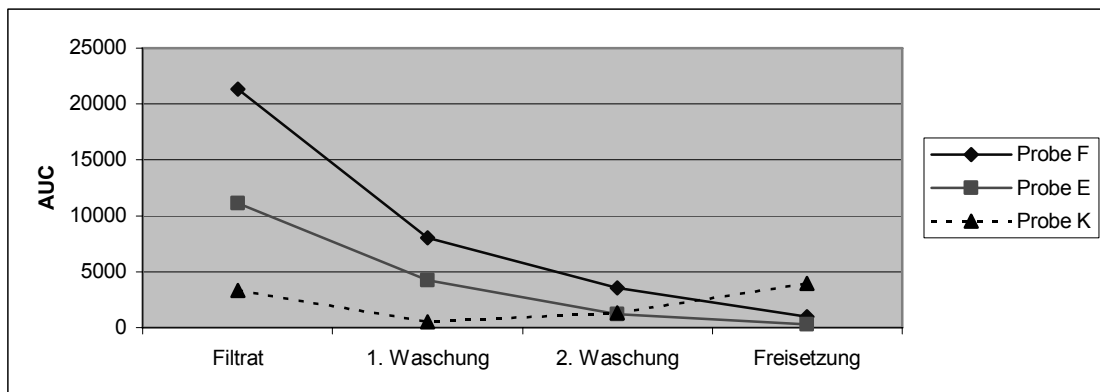


Abb. 20: Darstellung der Konzentrationsverläufe der Proben des Ligandenfischens mit 800 pmol TGT und verschiedenen Konzentrationen an 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid

Protein-Ligand-Verhältnisse: Probe F = 1:4; Probe E = 1:2; Probe K = 1:1. Die Konzentrationsverläufe der jeweils dazu bearbeiteten Blindproben sind nicht dargestellt.

Bei Einsatz eines Inhibitorüberschusses war eine stetige Abnahme des Konzentrationsverlaufes während des Ligandenfischens zu beobachten. Nur bei einem

TGT-3,5-Diaminophthalsäurehydrazid-Verhältnis von 1:1 in Gegenwart von 800 pmol TGT konnte der Inhibitor gefischt werden (Abb. 20).

Jedoch scheint der aus TGT und Inhibitor gebildete Komplex (Abb. 20, Probe K) schon während der zweiten Waschung an Stabilität zu verlieren, da die Konzentration des Inhibitors in der Lösung der Probe bereits hier eine steigende Tendenz aufweist (Abb. 21).

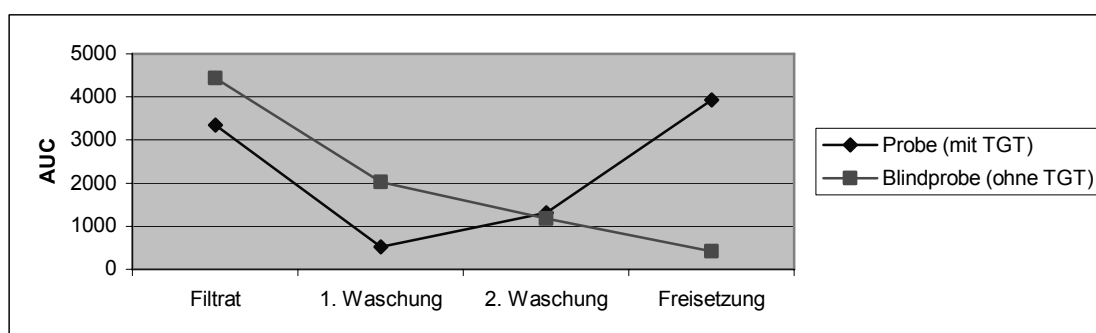


Abb. 21: Abbildung des Konzentrationsverlaufes bei einem positiv verlaufenen Ligandenfischversuch von 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid mit TGT

Das Auftreten von Inhibitormolekülen im Filtrat der Freisetzung der Blindprobe zeigt eine Filterbindung an, die aufgrund der hohen Lipophilie der Verbindung auch zu vermuten war. Es ist aber auch möglich, dass in diesem Fall die durchgeführten Waschschritte für eine vollständige Eliminierung von unspezifisch gebundenem Inhibitor nicht ausreichen.

Aufgrund dieser aufgetretenen Adsorption an den bisher verwendeten Filtereinheiten mit einer aus regenerierter Cellulose bestehenden Filtermembran wurden diese mit Filtereinheiten, die eine Polyethersulfonmembran besitzen, verglichen. Es sollte entschieden werden, welches Filtersystem die günstigeren Eigenschaften für die Ultrafiltrationen im Verlaufe der weiteren Ligandenfischversuche hinsichtlich einer nicht gewollten Adsorption besitzt. Dazu wurde ein definiertes Volumen an 3,5-Diaminophthalsäurehydrazidlösung auf beide Filter gegeben und eine Ultrafiltration durchgeführt. Danach erfolgten zwei Waschungen und die Freisetzung mit jeweils anschließender Ultrafiltration. Die erhaltenen Filtrate wurden getrocknet, in mobiler Phase aufgenommen und kapillarchromatographisch vermessen (9.1.1.7.1, Methode 2).

Wie in Abb. 22 gezeigt, wird der Inhibitor von der Cellulosemembran langsamer heruntergewaschen als von der Polyethersulfonmembran. Die Konzentrationsunterschiede in den Lösungen nach der 1. Waschung zeigen, dass die Polyethersulfonmembran 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid in geringerem Maße adsorbiert.

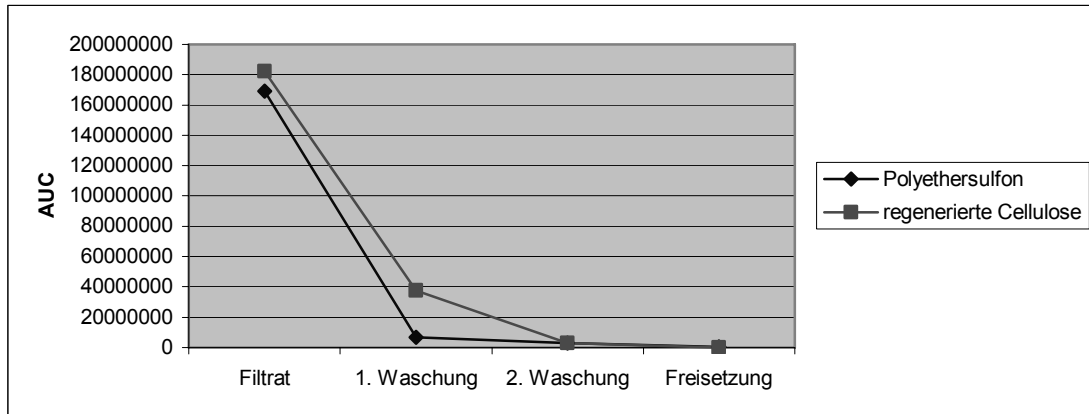


Abb. 22: Vergleich von Filtereinheiten mit unterschiedlicher Filtermembran

Die Polyethersulfonmembran erscheint nach Abb. 22 infolge einer geringeren Adsorptionsrate von 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid geeigneter. Werden jedoch die durch die Freisetzungslösung von den Filteroberflächen desorbierten 3,5-Diaminophthalsäurehydrazidmengen betrachtet, zeigt sich, dass die desorbierte Substanzmenge bei Verwendung der Celluloseacetatmembran deutlich geringer ausfällt (Abb. 23).

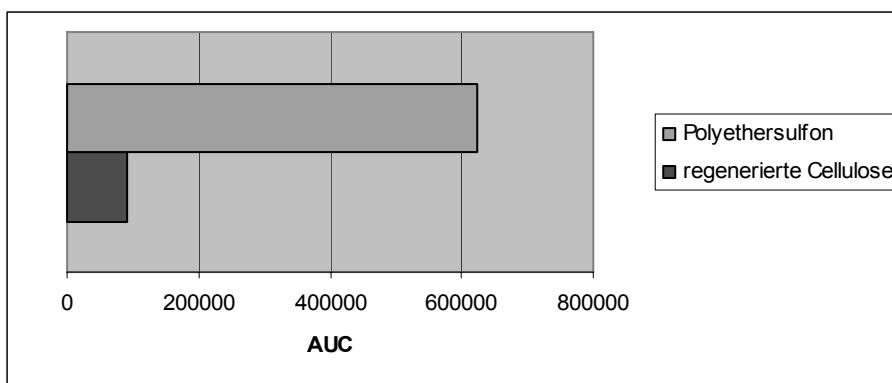


Abb. 23: Nach der Freisetzung desorbierte Menge an 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid

Von der Cellulosemembran wird das Hydrazid demnach zwar langsamer, aber effizienter durch die Waschungen desorbiert.

Für die weiteren Fischversuche mit TGT wurden demzufolge Filtereinheiten mit Cellulosemembran (Microcon) verwendet. Zum Einsatz kamen in der Regel 800 pmol Enzym. Die Inkubationstemperatur sowie das Inkubationsmedium wurden nicht variiert, da sich diese im Enzymassay (siehe Abschnitt 7.1) als gute Bedingungen erwiesen haben. Als Freisetzungslösung wurde ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis von 49,5/49,5/1 angewendet.

5.2.2 Erfolgreich verlaufene Ligandenfischversuche mit TGT aus verschiedenen Pflanzenextrakten

In einem Extrakt aus *Passiflorae herba*, einem Extrakt aus *Centellae asiaticae herba* sowie in einem Extrakt aus *Dulcamarae stipites* konnten an die TGT bindende Substanzen mit der Methode des Ligandenfischens gefunden werden. Tab. 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Extrakte der genannten Pflanzen.

Tab. 4: Erfolgreich auf TGT-bindende Substanzen untersuchte Extrakte

Stammpflanze	Verwendete Droge	Verwendeter Extrakt
<i>Passiflora incarnata</i> L.	<i>Passiflorae herba</i>	Trockenextrakt (Auszugsmittel: 60 %iger Methanol)
<i>Centella asiatica</i> (L.) URBAN	<i>Centellae asiaticae herba</i>	Dichlormethanextrakt
<i>Solanum dulcamara</i> L.	<i>Dulcamarae stipites</i>	Trockenextrakt (Auszugsmittel: 45 %iger Methanol) sowie dessen Extraktfraktionen

5.2.2.1 Ligandenfischen aus einem *Passiflorae herba*-Extrakt

Eine Lösung des aus dem Passionsblumenkraut gewonnenen, methanolischen Trockenextraktes in TGT-Assay-Puffer (PL 02) diente als Extraktlösung für mehrere Ligandenfischversuche. Nach einem ersten erfolgreichen Versuch wurde bei weiteren Experimenten sowohl die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse überprüft, als auch eine Variation der Extraktkonzentrationen vorgenommen. Dazu wurden 0,5 bzw. 5 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung gelöst und in verschiedenen Mengen dem Protein zugeführt, so dass sich unterschiedliche Protein-Extrakt-Verhältnisse ergaben. Dieses Vorgehen resultierte aus den bereits in Abschnitt 5.1.1 erläuterten Gründen. Zusätzlich erfolgte

eine Variation der eingesetzten Proteinmenge, um die Ergebnisse aus den Versuchen mit 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid zu bekräftigen. Die Inkubationszeit musste teilweise versuchsbedingt verlängert werden, da in einigen Fällen das Freiwaschen der Filter vom Glycerol mehr Zeit als gewöhnlich in Anspruch nahm (siehe Abschnitt 9.1.1.7.1, experimenteller Teil).

Nachdem im ersten Fischversuch mit diesem Pflanzenextrakt mehrere Substanzpeaks, bei denen eine Proteinbindung vorliegen könnte, aufgefallen waren, erwies sich in den folgenden Experimenten lediglich das Fischen einer Substanz dieses Extraktes als reproduzierbar (Abb. 24). Im Chromatogramm der Freisetzung ist bei der Probe im Vergleich zur Blindprobe eine Flächenzunahme für den gekennzeichneten Peak zu sehen. Die Substanz, die sich hinter diesem Peak verbirgt, sollte nun mittels chromatographischer Methoden isoliert und im Anschluss daran identifiziert werden (siehe Kapitel 6).

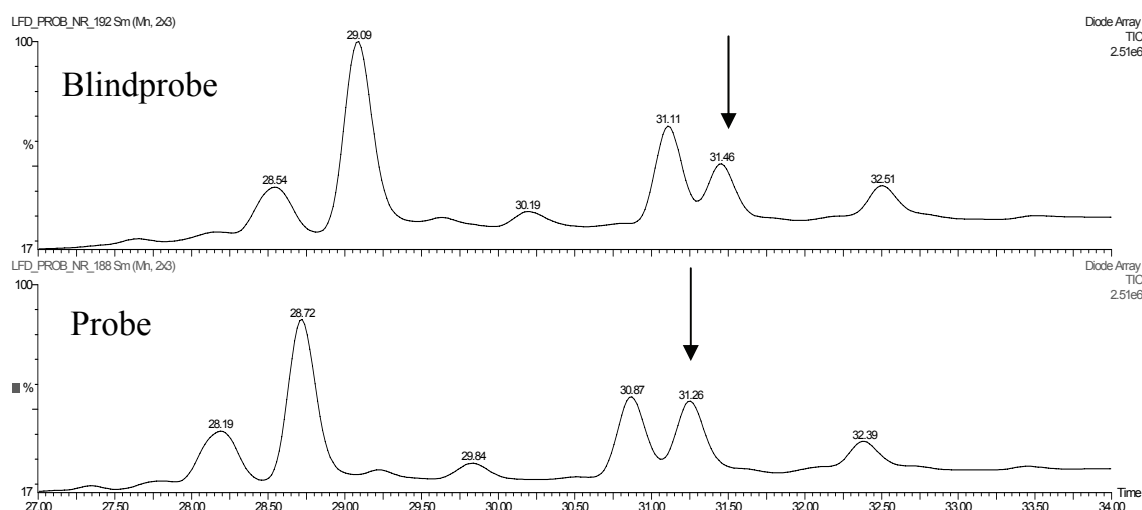


Abb. 24: Chromatogramme der Freisetzungen von Probe und Blindprobe aus dem Ligandenfischen des *Passiflorae herba*-Extraktes mit TGT

In der Freisetzung der Probe ist der mit einem Pfeil gekennzeichnete Peak größer als der entsprechende Peak in der Blindprobe (9.1.1.7.2, Probe 08 bzw. 08 Blind).

Es wurden 13 Ligandenfischversuche mit dem Trockenextrakt aus *Passiflorae herba* durchgeführt. Bei neun der 13 Proben konnte stets dieselbe Substanz aus dem Extrakt mit der TGT gefischt werden (Abb. 25). Die deutlichsten Fischergebnisse wurden bei Verwendung von 800 pmol Enzym pro Probe erreicht (Proben 3, 11, und 13). Dies bekräftigt auch die Ergebnisse der Ligandenfischversuche von 3,5-Diaminophthalsäure-

hydrazid mit der TGT. Danach erwies sich der Einsatz von 800 pmol Enzym pro Versuch als geeignet (Abschnitt 5.2.1).

Mit dem verwendeten Passifloraextrakt sind auch positive Ergebnisse bei einer TGT-Menge von nur 400 pmol erzielt worden (Abb. 25, Proben 1, 2, 5, 6 und 9). Jedoch erscheinen die Ergebnisse bei Verwendung von 800 pmol Enzym, wie bereits erwähnt, eindeutiger.

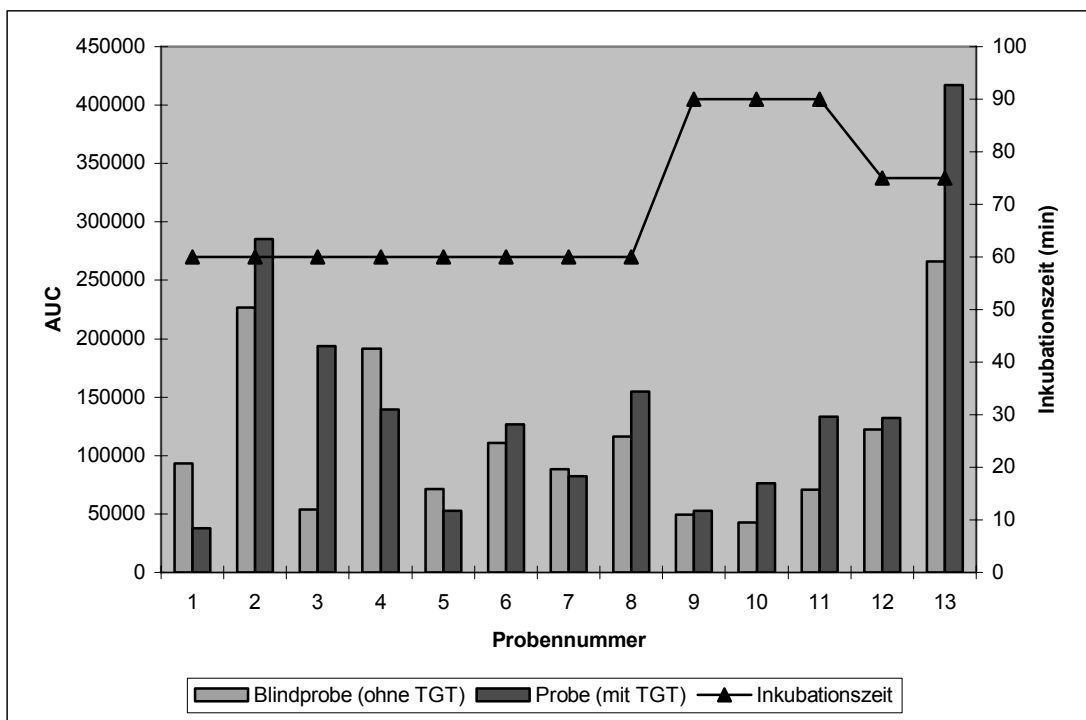


Abb. 25: Vergleich der Peakflächen der aus *Passiflorae herba*-Extrakt mit TGT gefischten Substanz bei verschiedenen Fischbedingungen

Von 13 durchgeführten Fischversuchen waren hinsichtlich eines bestimmten Peaks neun positiv. Die deutlichsten Fischergebnisse wurden mit 800 pmol TGT (Proben 3, 11 und 13) unabhängig von der Inkubationsdauer erzielt (experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 9.1.1.7.2).

Bei Einsatz von nur einem Zehntel der sonst eingesetzten Extraktmenge und jeweils 800 pmol TGT war eine genauso deutliche Freisetzung der in den anderen Versuchen ebenfalls gefischten Substanz zu verzeichnen (Probe 3 versus Probe 13). Dazu musste allerdings die Einspritzmenge für die HPLC-analytische Vermessung verzehnfacht werden. Bei vier der 13 Proben konnte, wie Abb. 25 zeigt, für die Substanz keine Bindung an die TGT festgestellt werden (Proben 1, 4, 5 und 7). Dies ist durch aufgetretene

Unregelmäßigkeiten während der Ultrafiltrationen zu erklären. Eine Variation der Inkubationsdauer dagegen hatte auf das Ergebnis keinen Einfluss (Abb. 25).

5.2.2.2 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Centellae asiaticae herba*

Bei der Untersuchung des aus dem Wassernabelkraut, *Centellae asiaticae herba*, gewonnenen Dichlormethanextraktes (Herstellung des Extraktes siehe Abschnitt 9.2.3, experimenteller Teil) konnte eine Flächenzunahme eines Peaks im Vergleich zur Blindprobe festgestellt werden. Die in der Freisetzung der Probe festgestellte Menge der Substanz ist im Vergleich zur Blindprobe viermal so hoch, während die Peakflächen der anderen detektierten Substanzen annähernd gleich bleiben. In den Waschungen der Probe ist diese Substanz nicht mehr nachweisbar, wohingegen in den Waschlösungen der Blindprobe eine stetige Konzentrationsabnahme zu sehen ist (Abb. 26 A und B). Das lässt auf eine Bindung der Substanz an die TGT schließen.

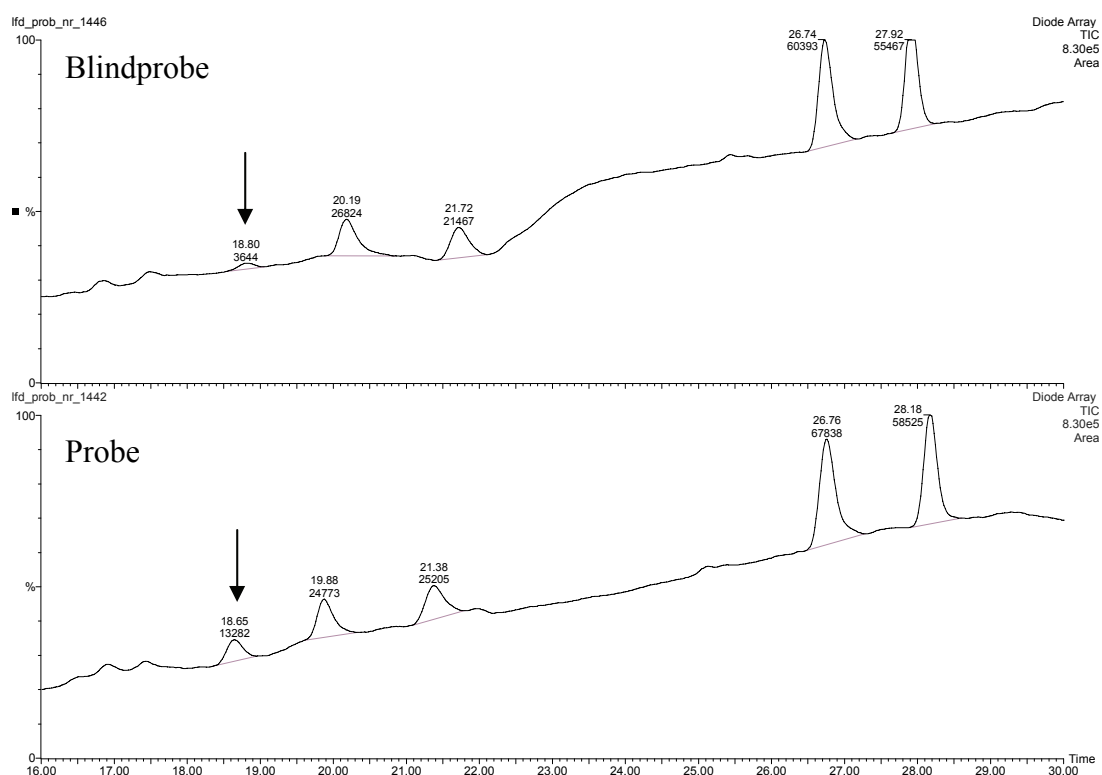


Abb. 26 A: Chromatogramme des Ligandenfischens mit TGT aus dem Dichlormethanextrakt aus *Centellae asiaticae herba*

Dargestellt sind die Kapillar-HPLC-Chromatogramme der Freisetzungen von Probe und Blindprobe.

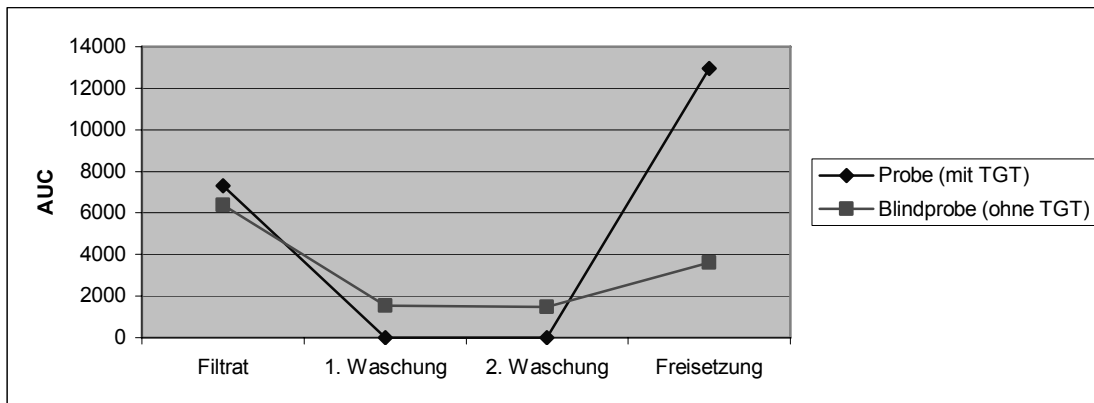


Abb. 26 B: Auswertung des Ligandenfischens mit TGT aus dem Dichlormethan-extrakt aus *Centellae asiaticae herba*

Aus dem Vergleich der Konzentrationsverläufe wird eine starke Bindung der Substanz an die TGT, bei allerdings ungenügender Übereinstimmung der Peakflächensummen, deutlich.

In beiden Abbildungen (Abb. 26 A und B) ist die Zunahme der Peakfläche der beobachteten Substanz in der Blindprobe nach Zugabe des Freisetzungsreagenzes zu sehen. Dies kann mit einer Bindung der Substanz an den Filter erklärt werden.

Wie aus dem in Abb. 26 B gezeigten Diagramm hervorgeht, ist bei Addition aller Peakflächen der Probe sowie der Blindprobe keine gute Übereinstimmung der Peakflächensummen zu verzeichnen. Um die Bindung dieser Substanz an die TGT abzuklären müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

5.2.2.3 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Solanum dulcamara* L.

Fünf Milligramm des Trockenextraktes aus *Solanum dulcamara* L. wurden in TGT-Assay-Puffer (Abschnitt 9.1.1.2, PL 02) suspendiert. In einem ersten Versuch wurden nicht lösliche Bestandteile abzentrifugiert und der klare Überstand dem Ligandenfischen zugeführt. Zum Einsatz kamen verschiedene Mengen der Extraktlösung.

Während bei Verwendung von 800 pmol TGT und 100 µl der Extraktlösung mehrere Substanzen gefischt werden konnten, war bei Einsatz derselben Proteinmenge aber 150 µl der Extraktlösung keine Flächenvergrößerung eines Peaks in der Freisetzung der Probe im Vergleich zur Blindprobe mehr feststellbar (siehe 9.1.1.7.4, Proben 16, 16 Blind, 17, 17 Blind).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse machten eine Wiederholung dieses Ligandenfischens notwendig. In den nun folgenden Versuchen wurde die oben erwähnte Zentrifugation durch eine Filtration ersetzt, um auch hier zu einer klaren Extraktlösung zu gelangen. Von dieser Lösung wurden wiederum unterschiedliche Mengen verwendet oder Verdünnungen hergestellt, um verschiedene Protein-Ligand-Verhältnisse zu erhalten.

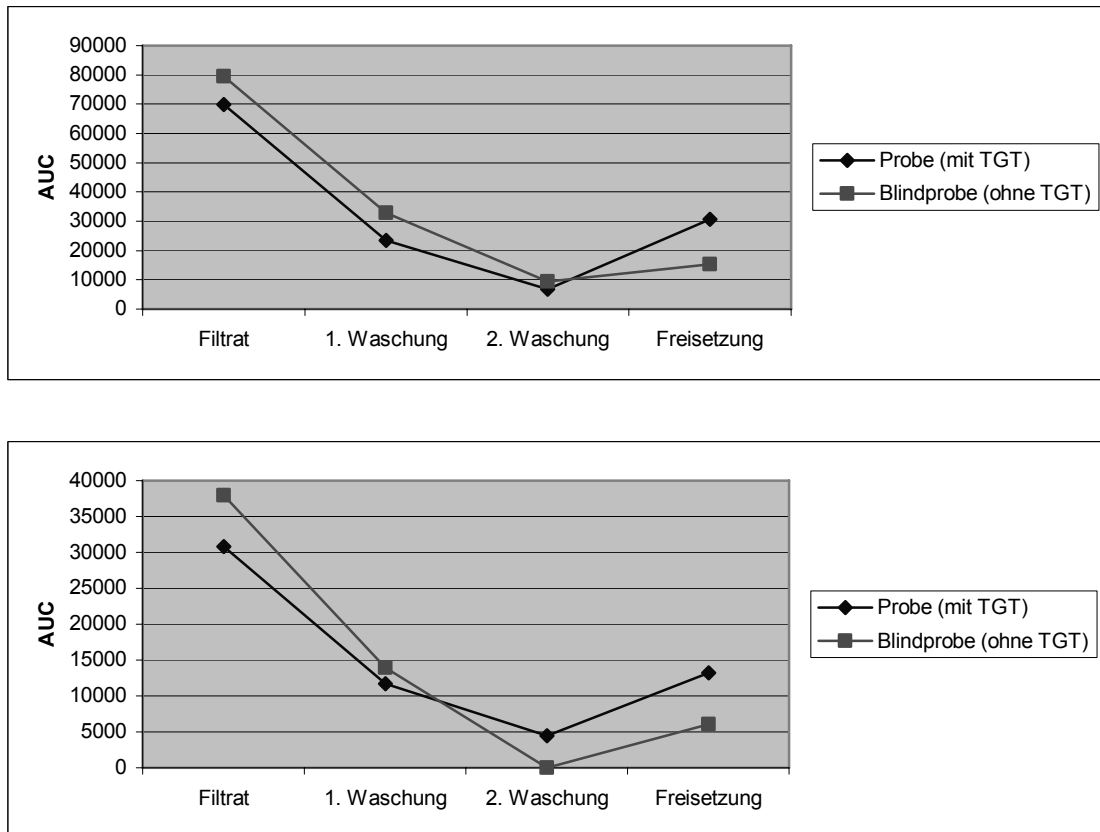


Abb. 27: Konzentrationsverlauf einer Substanz aus dem Ligandenfischen mit TGT aus einem methanolischen Trockenextrakt der Stängel von *Solanum dulcamara* L.

Obere Grafik: Ligandenfischen mit 800 pmol TGT und 5mg/ml Extrakt in TGT-Assay-Puffer.

Untere Grafik: Ligandenfischen mit 800 pmol TGT und einer 1:1-Verdünnung der Extraktlösung mit TGT-Assay-Puffer.

Der jeweils betrachtete Peak lag bei einer Retentionszeit von etwa 29,2 min.

Sowohl bei Verwendung von 100 µl einer mit fünf Milligramm des Extraktes hergestellten Lösung als auch unter Einsatz einer 1:1-Verdünnung dieser Lösung sowie jeweils 800 pmol TGT konnte eine Substanz gefischt werden. Dies ist aus den im Gegensatz zu der Blindprobe ansteigenden Graphen erkennbar (Abb. 27). Das Fischen dieser Sub-

stanz, deren Elektronenspektrum in Abb. 28 dargestellt ist, war schon im oben beschriebenen Versuch gelungen (Bedingungen siehe experimenteller Teil 9.1.1.7.4, Methode 1).

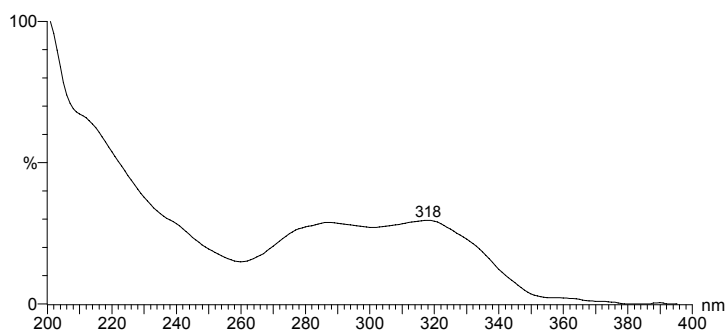


Abb. 28: UV-Spektrum der aus dem methanolischen Trockenextrakt aus den Stängeln von *Solanum dulcamara* L. gefischten Verbindung

Das UV-Spektrum wurde bei der kapillarchromatographischen Vermessung der Freisetzung der Probe mit dem PDA-Detektor bei einer Auflösung von 1,2 nm und einer Zusammensetzung der mobilen Phase von 38 % Acetonitril - 62 % Wasser - 0,05 % TFA erhalten.

Aufgrund dieser ermutigenden Ergebnisse schien eine Fraktionierung des Extraktes zur weiteren Charakterisierung der gefischten Substanzen sinnvoll. Dabei wurde eine Hexan/Diethylether-, eine Chloroform/Ethanol-, eine Methanol-, eine in Wasser und Methanol unlösliche und eine methanolisch-wässrige Fraktion sowie ein mit Methanol erhaltener Niederschlag gewonnen. Die sich daran anschließenden Ligandenfischversuche sollten die Zahl der aufzutrennenden Fraktionen einschränken. Die Fraktionierung des Trockenextraktes ist in Abschnitt 6.2 beschrieben. Genauere Erläuterungen dazu finden sich im Abschnitt 9.4.2 des experimentellen Teils.

Die getrockneten Fraktionen wurden in TGT-Assay-Puffer, teilweise unter DMSO-Zusatz, wieder gelöst und nötigenfalls filtriert. Es wurden mehrere Ligandenfischversuche mit den Fraktionslösungen durchgeführt. Ein 10%iger DMSO-Zusatz wurde bei unzureichender Löslichkeit der Fraktion im TGT-Assay-Puffer verwendet. Dies war insbesondere bei der Hexan/Diethylether-Fraktion der Fall.

Die in der Hexan/Diethyletherfraktion angereicherten Substanzen zeigten keine Bindungsaffinität. Dagegen konnten aus der Chloroform/Ethanol-Fraktion zwei Substanzen in geringen Mengen wiederholt gefischt werden (Abb. 29).

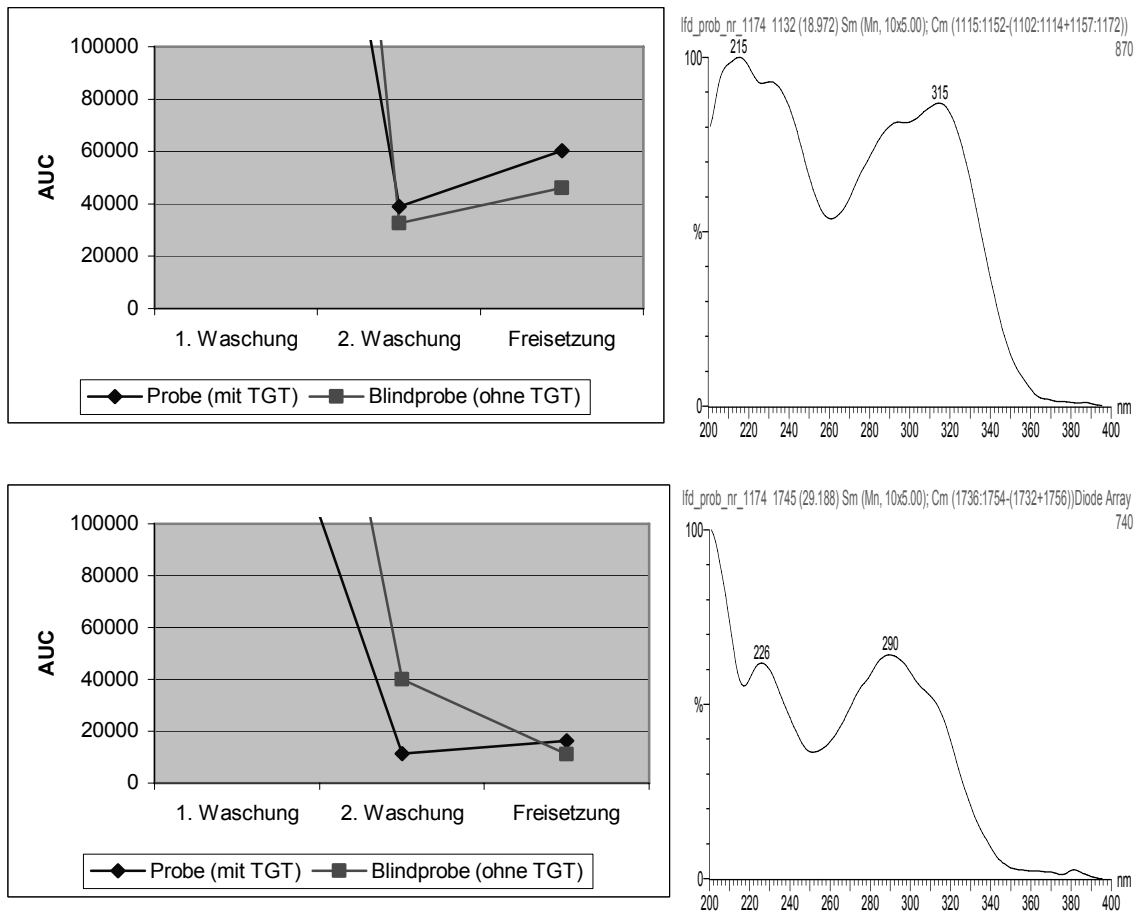


Abb. 29: Konzentrationsverläufe für zwei verschiedene Substanzen während des Ligandenfischens aus der Chloroform/Ethanol-Fraktion des Dulcamara-Trockenextraktes mit TGT mit dazugehörigen UV-Spektren

Obere Abbildung: Die betrachtete Verbindung wies eine Retentionszeit von etwa 19 min sowie das nebenstehende UV-Spektrum auf. Aus dem Anstieg der Geraden der Blindprobe nach der zweiten Waschung kann eine Filterbindung der Substanz abgeleitet werden. Der Anstieg der Probengeraden im selben Abschnitt ist jedoch etwas stärker.

Untere Abbildung: Die betrachtete Substanz wies eine Retentionszeit von etwa 29,3 min sowie das nebenstehende UV-Spektrum auf. Der Anstieg der Probengeraden nach der zweiten Waschung ist zwar sehr gering, jedoch fällt im gleichen Abschnitt die Gerade der Blindprobe merklich ab.

Die UV-Spektren wurden während der kapillarchromatographischen Vermessung der Proben mit einer Auflösung von 1,2 nm bei einer Zusammensetzung der mobilen Phase von 27 % Acetonitril - 73 % Wasser - 0,05 % TFA bzw. 38 % Acetonitril - 62 % Wasser - 0,05 % TFA aufgenommen.

Diese Substanzen stimmten in ihren UV-Spektren und Retentionszeiten aber nicht mit der aus dem Gesamtextrakt gefischten Substanz überein. Dies ließ den Schluss zu, dass bei der aus dem Gesamtextrakt gefischten Substanz ein synergistischer Effekt für die Bindung an die TGT verantwortlich sein könnte. Mittels UV-Detektion war jedoch in den Chromatogrammen aus den Ligandenfischversuchen mit dem Gesamtextrakt keine

weitere gefischte Substanz aufgefallen. Es ist möglich, dass die mit der detektierten Substanz gemeinsam wirkende Verbindung mit dem verwendeten PDA-Detektor nicht erfasst werden kann. Möglicherweise würde in einem erneuten Ligandenfischversuch mit einem zusätzlichen Detektionsverfahren, wie z.B. einem Massendetektor, diese weitere Substanz identifiziert werden können. Durch Kombination der Fraktionen könnte auch mit dem für die Vermessung der Proben zu der vorliegenden Arbeit verwendeten PDA-Detektor eine Eingrenzung der für eine chromatographische Auftrennung in Frage kommenden Fraktionen vorgenommen werden. Die die synergistisch wirkenden Verbindungen enthaltenden Fraktionen sind dann gefunden, wenn aus deren Kombination die bereits aus dem Gesamtextrakt gefischte Verbindung erneut gefischt werden kann.

Ein erstes Ligandenfischen mit einer 1:1-Mischung der Hexan/Diethyletherfraktion mit der Chloroform/Ethanolfraktion war dahingehend nicht erfolgreich. Dagegen konnte wiederum eine der beiden Substanzen gefischt werden, die auch bei alleiniger Verwendung der Chloroform/Ethanol-Fraktion eine Bindung an die TGT gezeigt hatte (Abb. 30). Im Chromatogramm der Freisetzung der Probe zeigen mehrere Peaks eine Flächenvergrößerung im Vergleich zur zweiten Waschung. Bei dem Vergleich mit den entsprechenden Chromatogrammen der Blindprobe fällt diese Zunahme ebenfalls auf. Daher ist bei diesen Verbindungen davon auszugehen, dass hier lediglich eine unspezifische Bindung vorlag. Bei dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Substanzpeak ist jedoch im Chromatogramm der Probenfreisetzung eine, wenn auch nur geringfügige, Zunahme zu beobachten, während gleichzeitig in der Blindprobe deutlich eine Abnahme der Peakfläche von der zweiten Waschung hin zur Freisetzung zu erkennen ist.

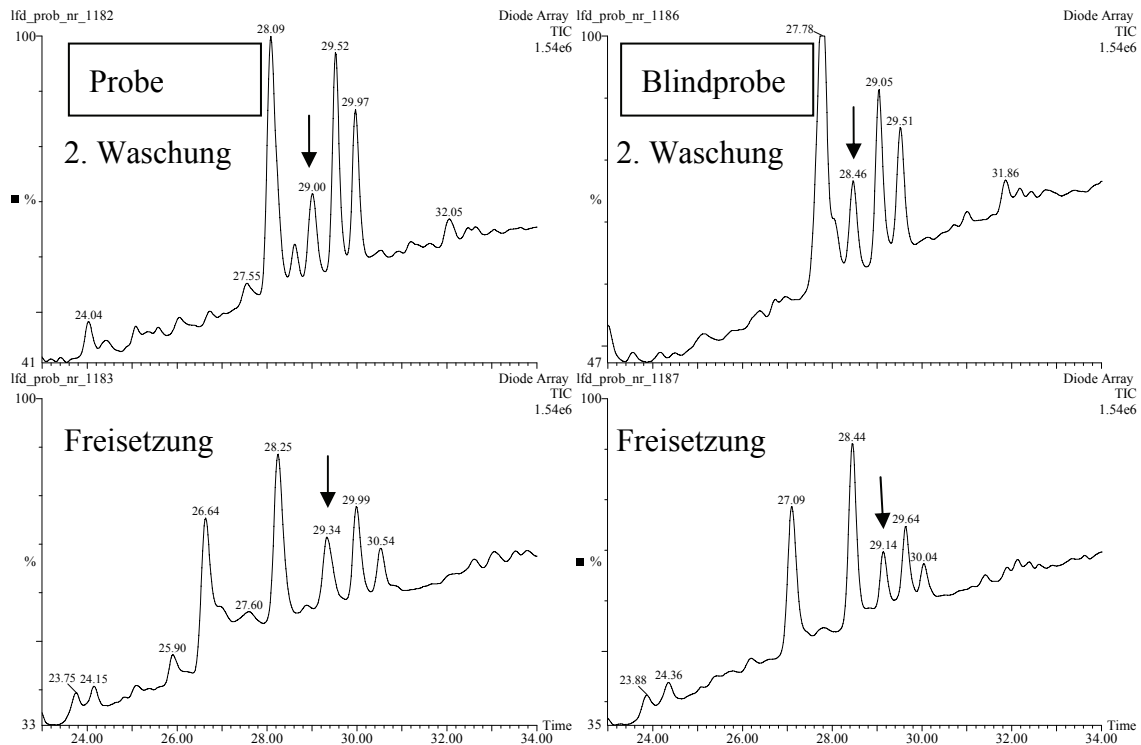


Abb. 30: Chromatogramme der zweiten Waschung und der Freisetzung von Probe und Blindprobe aus dem Ligandenfischen mit TGT aus einem 1:1-Gemisch der Hexan/Diethylether- und der Chloroform/Ethanol-Fraktion

Der mit dem Pfeil gekennzeichnete Peak repräsentiert die gefischte Substanz. Der Peak im Chromatogramm der Probenfreisetzung ist geringfügig größer als der in der zweiten Waschung. In der Blindprobe ist dagegen deutlich eine Abnahme der Peakfläche von der zweiten Waschung hin zur Freisetzung zu sehen.

Abb. 31 verdeutlicht noch einmal, aufgrund der gegensätzlichen Verläufe der Geraden von Probe und Blindprobe, dass diese Substanz an die TGT gebunden hat. Jedoch wird nur eine geringe Menge der Verbindung freigesetzt (geringer Anstieg der Probengeraden nach der zweiten Waschung), was auf eine eher schwache Bindung hindeutet, da die Substanz in der Inkubationslösung durchaus in größeren Mengen vorhanden war.

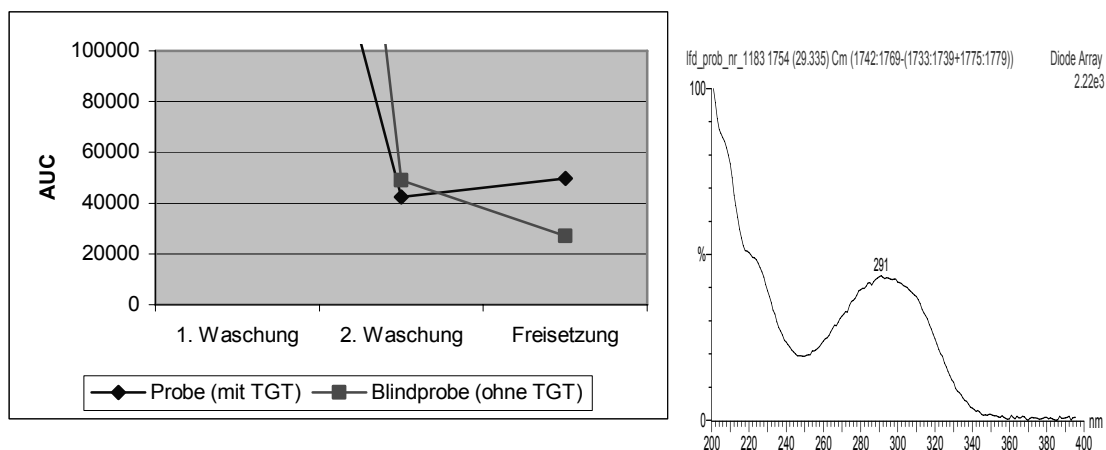


Abb. 31: Vergleich der Peakflächen von Probe und Blindprobe während des Ligandenfischens des in Abb. 30 gekennzeichneten Peaks mit zugehörigem UV-Spektrum

Zu beobachten ist ein gegensätzlicher Verlauf der Geraden von Probe und Blindprobe. Der Anstieg der Probengeraden von der zweiten Waschung hin zur Freisetzung ist gering. Die Gerade der Blindprobe dagegen fällt im gleichen Abschnitt deutlich ab.

Die zweite bereits in der Chloroform/Ethanol-Fraktion gefischte Verbindung ließ sich in den Chromatogrammen der Kombination nicht eindeutig identifizieren. Um eine Aussage zur Bindung dieser Substanz an die TGT treffen zu können, wäre eine Wiederholung des Versuchs notwendig.

Der Grund dafür, dass die Substanzen aus der Chloroform/Ethanol-Fraktion sowie aus der Kombination dieser Fraktion mit der Hexan/Diethyletherfraktion, jedoch nicht aus dem Gesamtextrakt gefischt wurden, könnte in der durch die Fraktionierung hervorgerufenen Konzentrationserhöhung dieser Verbindungen liegen (siehe Abschnitt 6.2). Es ist daher anzunehmen, dass diese Substanzen schwächere Bindungen mit der TGT eingehen, als die aus dem Gesamtextrakt gefischte Substanz.

In den anderen Fraktionen (Methanol- und methanolisch-wässrige Fraktion sowie in dem mit Methanol erhaltenen Niederschlag) konnte keine Substanz gefischt werden.

5.2.3 Ligandenfischversuche mit TGT aus verschiedenen Pflanzenextrakten ohne Feststellung einer Proteinbindung

Für die in Tab. 5 aufgeführten Extrakte konnte unter den im Abschnitt 9.1.1.7 angegebenen Bedingungen keine Bindung einer Substanz aus dem jeweiligen Extrakt an die TGT festgestellt werden.

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Pflanzenextrakte

Stammpflanze	Verwendete Droge	Verwendeter Extrakt
Achillea millefolium L.	Millefolii herba	Trockenextrakt (Auszugsmittel: Wasser)
Allium sativum L.	Allii bolus	Mazerat aus dem getrockneten Zwiebelpulver (Auszugsmittel: 50 %iger Ethanol) Extrakte aus der frischen Zwiebel (Auszugsmittel: 50 %iger Ethanol bzw. Wasser)
Aspidosperma quebracho-blanco SCHLECHT.	Quebracho cortex	selektiver Methanolextrakt und selektiver Dichlormethanextrakt (jeweils analytischer Maßstab (siehe Abschnitt 5.3.4))
Chelidonium majus L.	Chelidonii herba	Trockenextrakt (Auszugsmittel: Methanol)
Crataegus monogyna JACQ. emend. LINDM. bzw. Cratae- gus laevigata (POIR.) DC.	Crataegi folium cum flore	Trockenextrakt (Auszugsmittel: Ethanol)
Papaver somniferum L. ssp. somniferum	Getrockneter Milchsaft der angeschnittenen, unreifen Früchte	Opiumtinktur
Rauwolfia serpentina (L.) BENTHAM ex KURZ	Rauwolfiae radix	Selektiver Methanolextrakt
Urtica dioica L. bzw. Urtica urens L.	Urticae folium	Trockenextrakt (Auszugsmittel: Wasser)
Vitex agnus-castus L.	Agnus castus fructus	Fertigarzneimittel: Castufemin

5.2.4 Ligandenfischen mit verschiedenen Einzelsubstanzen

Die aus dem methanolischen Trockenextrakt aus Passiflorae herba gefischte Substanz konnte als Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) identifiziert werden (siehe Kapitel 6). Diese Verbindung stellt ebenso wie Vitexin (**3**) ein Apigeninderivat dar. Beim Vitexin (**3**) ist im Gegensatz zum Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) der Zucker C-glykosidisch an C-8

gebunden, während an C-6 lediglich ein Proton positioniert ist (Abschnitt 7.1.2, Tab. 8). Apigenin (Abschnitt 4.2.3, Tab. 2) wurde als Einzelsubstanz für ein Ligandenfischen herangezogen, um eine generelle Bindung von Flavonoiden an die TGT aufgrund des Grundgerüsts auszuschließen. Wie aus Abb. 32 klar ersichtlich ist, konnte für Apigenin mit dem Ligandenfischen keine Bindung an die TGT nachgewiesen werden. Aus dem abfallenden Verlauf beider Geraden kann abgeleitet werden, dass Apigenin hier lediglich vom Filter heruntergewaschen wurde.

Somit müssen die an dem gefischten Flavonid stehenden Substituenten des Apigenin-Grundgerüsts für die Bindung an die TGT ausschlaggebend sein.

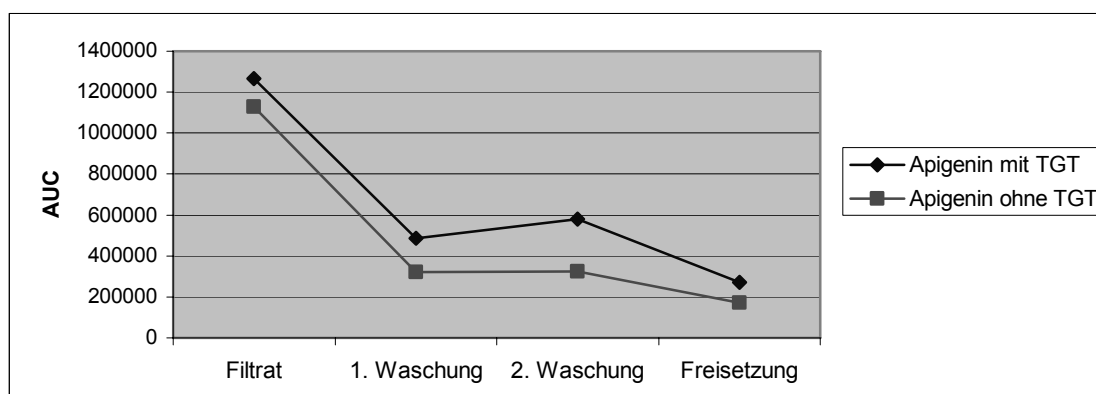


Abb. 32: Konzentrationsverlauf für Apigenin während des Ligandenfischens mit TGT

Zwar enthält die Freisetzung der Probe mehr Apigenin als die der Blindprobe, doch zeigt sich in beiden Proben ein abnehmender Verlauf. Dieser Verlauf ist außerdem in der Probe mit TGT von der zweiten Waschung hin zur Freisetzung stärker abnehmend als in der Blindprobe.

Aufgrund der Ergebnisse wurde das substituierte Apigenin Vitexin, ein Hauptinhaltsstoff von Passiflora-Arten, einem Ligandenfischen unterzogen. Mit diesem Versuch sollten erste Hinweise auf eine mögliche Struktur-Wirkungsbeziehung erhalten werden. Es sollte geprüft werden, ob die Position der Glykosylierung einen Einfluß auf die Bindung der Substanz an die TGT hat. Da beim Ligandenfischen mit TGT unter den gewählten Testbedingungen keine Bindung von Vitexin an die TGT festgestellt werden konnte, ist das Substitutionsmuster von erheblicher Bedeutung. Dieses negative Ergebnis konnte mit einem radioaktiven Assay, der in Kapitel 7 besprochen wird, bestätigt werden.

Die Monoterpen-Indolalkaloide Ajmalin, Yohimbin, Reserpin und Rescinnamin wurden aus den bereits in Abschnitt 4.1.1 genannten Gründen zum Ligandenfischen herangezogen (Abb. 33). Für alle vier Alkaloide konnten mit den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen keine Beweise für eine Bindung an die TGT gefunden werden.

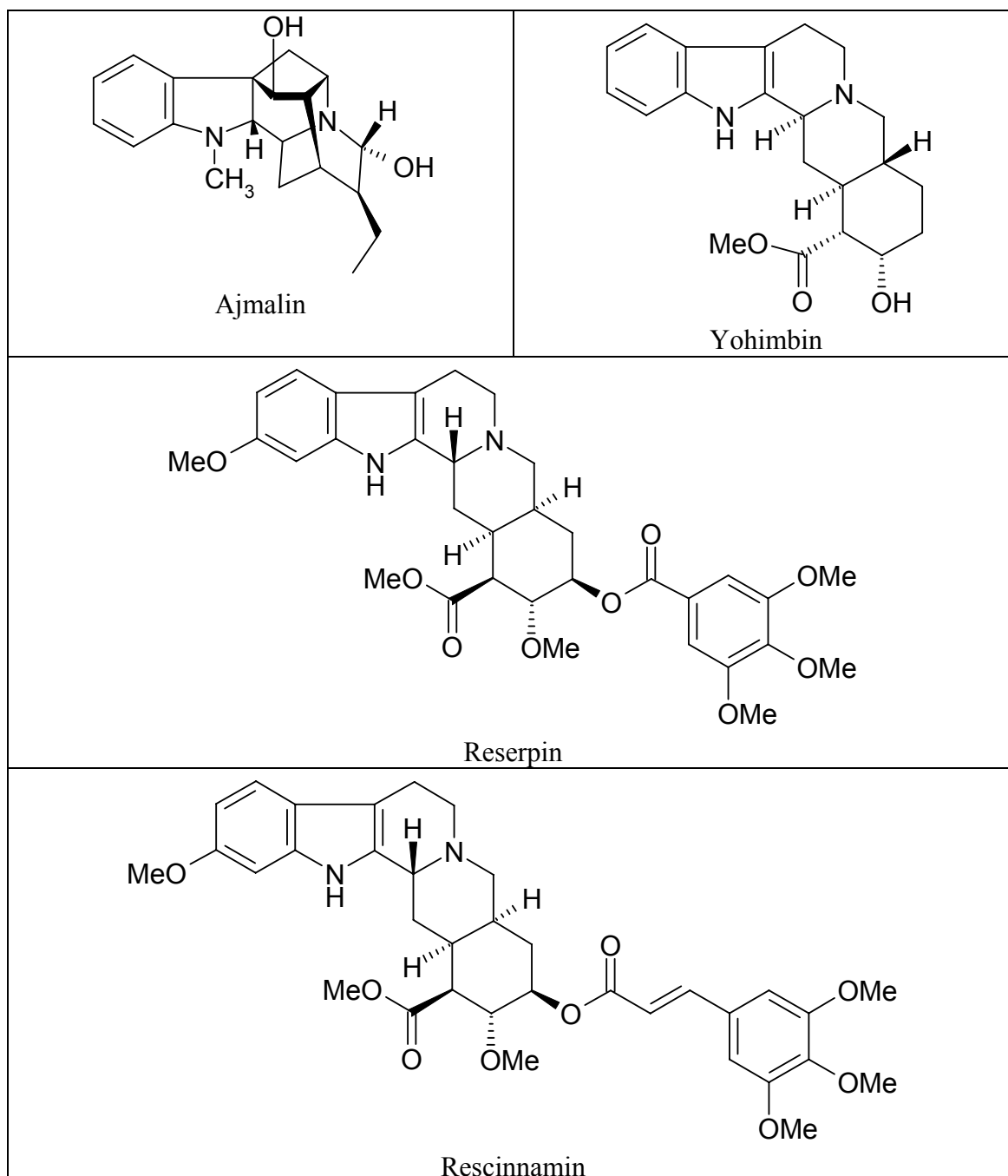


Abb. 33: Alkaloide mit β -Carboline-Struktur

Neben einer anderen Positionierung der Protonen- und der Elektronenpaardonatoren könnte ein Grund für die fehlende Affinität in der Größe der untersuchten Substanzen im Vergleich zu den von R. Brenk [87] beschriebenen Inhibitoren der TGT liegen (Abb. 34).

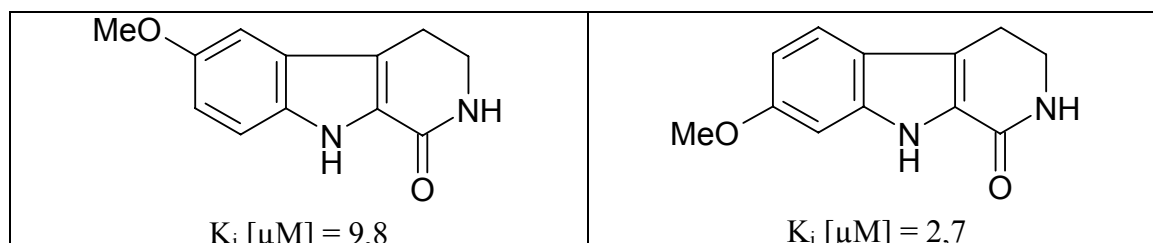


Abb. 34: Inhibitoren der TGT (Strukturformeln und K_i -Werte aus [87])

Mit Pegenon und seinem Desoxyderivat, Desoxypeganin, wurden Ligandenfischversuche durchgeführt, da Pegenon eine Chinazolin-4-on-Grundstruktur aufweist, die bereits als Leitstruktur identifiziert worden ist (Abb. 35) [87].

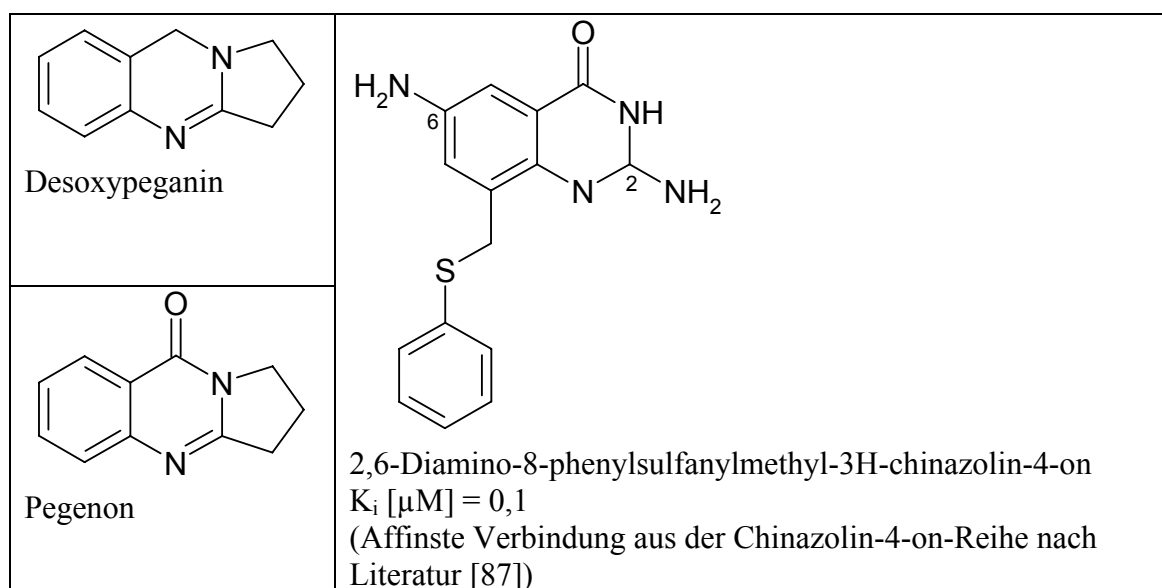


Abb. 35: Chinazolin-4-one und ein Desoxyderivat

Bei der Aufstellung der Leitstruktur war allerdings festgestellt worden, dass eine Aminogruppe an Position 6 des Grundgerüsts als essentiell für eine starke Bindung in der Basensubstratbindetasche der TGT anzusehen ist. Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Ligandenfischversuche mit Pegenon und Desoxypeganin nicht erfolgreich verliefen.

5.2.5 Ergebnisse im Hinblick auf eine Verbesserung der K_i -Wert-Grenze

Maßgeblich für die Anwendbarkeit der Ultrafiltration zur Separation von gebundenem und ungebundenem Ligand ist die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Dissoziationsrate des Protein-Ligand-Komplexes. Da der Verlust von gebundenem Ligand innerhalb der ersten Halbwertszeit nahezu linear erfolgt, muss eine Trennung innerhalb von 0,15 Halbwertszeiten abgeschlossen sein, um maximal 10 % des gebundenen Liganden zu verlieren [109]. Diese Separationszeit setzt sich aus der Filtrationszeit und der Zeit für die Waschungen zur Entfernung von unspezifisch adsorbierten Substanzen zusammen.

Gleichzeitig trägt die während des Versuchs abnehmende Aktivität des Proteins zur Erhöhung der Dissoziationsrate des Protein-Ligand-Komplexes bei.

Tab. 6 gibt den Zusammenhang zwischen Dissoziationskonstante und möglicher Separationsdauer wieder.

Tab. 6: Zusammenhang zwischen Dissoziationskonstante K_D und der möglichen Separationszeit (Kalkulation bei Assoziationsrate = $10^6 M^{-1} s^{-1}$) [109]

K_D [M]	Mögliche Separationszeit (0,15 $t_{1/2}$)
10^{-12}	1,2 d
10^{-11}	2,9 h
10^{-10}	17 min
10^{-9}	1,7 min
10^{-8}	10 s
10^{-7}	0,1 s
10^{-6}	0,01 s

Die Anwendbarkeit der Ultrafiltration sollte sich damit auf Protein-Ligand-Komplexe mit einer Dissoziationskonstante von maximal 5 nM beschränken [114]. J. Lenz konnte jedoch in ihrer Arbeit die Anwendbarkeit dieser Filtrationstechnik zur Separation von gebundenen und ungebundenen Liganden für eine Dissoziationskonstante von 420 nM nachweisen [10].

Für die aus dem methanolischen Extrakt aus *Passiflorae herba* gefischte Substanz konnte mit dem in Kapitel 7.1 beschriebenen Verfahren ein K_i -Wert von 20 μ M bestimmt werden. Die hier experimentell ermittelte Nachweisbarkeit von Substanzen mit einem K_i -Wert von 20 μ M ist somit um den Faktor 4000 günstiger als der in der Literatur angegeben Wert (5 nM) [114] und um den Faktor 48 günstiger als der von J. Lenz ermittelte Wert [10].

In einer anderen Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer Ligandenbindung mit einem K_i -Wert des Liganden von 600 μM . Die dazu durchgeführte Ultrafiltration erfolgte bis zu einem Restvolumen von 40-60 μl , wodurch während der Ultrafiltration eine Störung der Gleichgewichtsbedingungen vermieden werden sollte [115]. Allerdings kann aufgrund fehlender Waschschrte eine unspezifische Bindung des Liganden an das Target nicht ausgeschlossen werden. Bei neueren Untersuchungen mit Ultrafiltrationskammern gelang per online-Kopplung mit einem HPLC-MS-Gerät die Bestimmung von Dissoziationskonstanten von maximal 5 μM [116].

5.3 Ergebnisse der Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK

Im Folgenden sollen die unter Verwendung des Targets IGF-1-RTK mit verschiedenen Pflanzenextrakten erzielten Ergebnisse des Ligandenfischens näher erläutert werden. Die Versuchsbedingungen für das Ligandenfischen mit diesem Target wurden bereits durch E. Wächter optimiert [104].

In den folgenden fünf Abschnitten werden zunächst die Versuche beschrieben, bei denen Substanzen aus dem jeweiligen Extrakt gefischt werden konnten. Die genauen Bedingungen der jeweiligen Versuche sind im experimentellen Teil (Abschnitt 9.1.1.8) aufgeführt.

5.3.1 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Liquiritiae radix*

Sowohl das Ligandenfischen mit dem methanolischen Extrakt aus der Wurzel von *Glycyrrhiza glabra* L. (Abb. 36 und Abb. 37) als auch unter gleichen Bedingungen durchgeführte Ligandenfischversuche mit dem Dichlormethanextrakt der Droge (Abb. 38 und Abb. 39) verliefen erfolgreich. Es konnte jeweils eine Substanz gefischt werden.

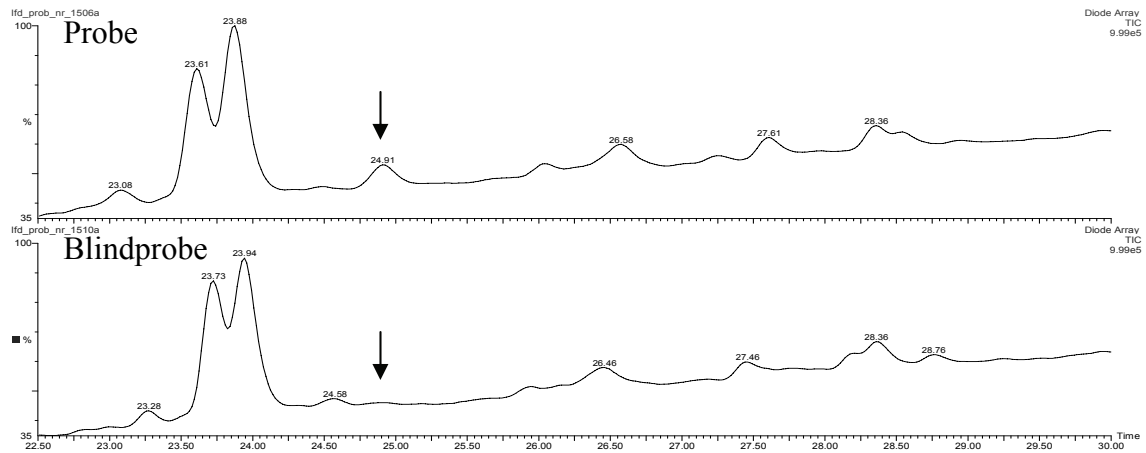


Abb. 36: Chromatogramme der Freisetzungen von Probe und Blindprobe des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus dem Methanolextrakt aus *Liquiritiae radix*

Bei der mit einem Pfeil gekennzeichneten Substanz erkennt man deutlich den Flächenunterschied zwischen Probe und Blindprobe.

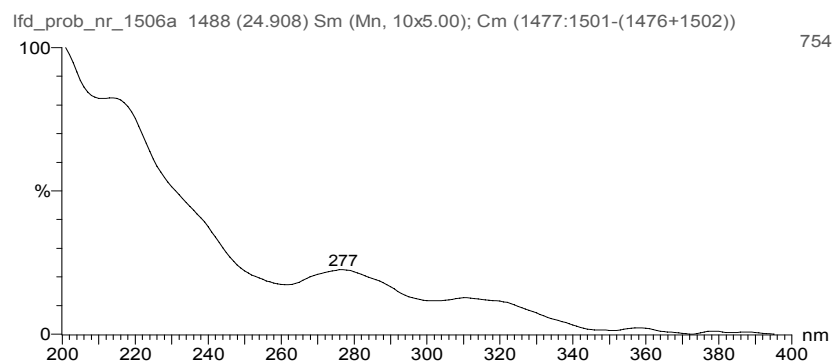


Abb. 37: UV-Spektrum der aus dem Methanolextrakt aus *Liquiritiae radix* gefischten und in Abb. 36 gekennzeichneten Substanz

Abb. 38 zeigt Ausschnitte der Chromatogramme, die durch kapillarchromatographische Vermessung der Proben aus dem Ligandenfischen mit dem Dichlormethanextrakt aus der Süßholzwurzel, *Liquiritiae radix*, erhalten wurden.

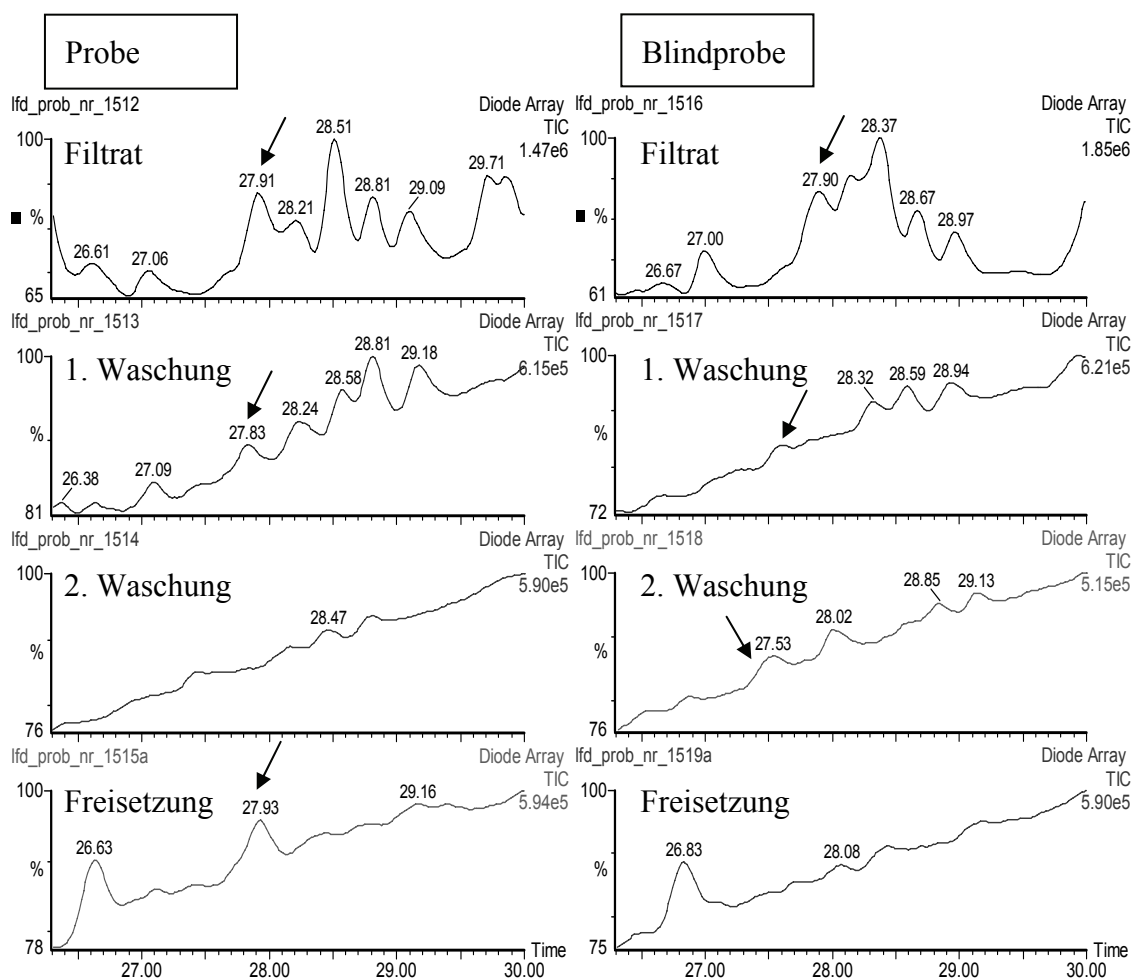


Abb. 38: Chromatogramme von Probe und Blindprobe des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus dem Dichlormethanextrakt aus *Liquiritiae radix*

Mit einem Pfeil ist jeweils der Peak der gefischten Substanz gekennzeichnet. In den Chromatogrammen der zweiten Waschung der Probe und der Freisetzung der Blindprobe war die Verbindung nicht mehr nachweisbar. Im Chromatogramm der Freisetzung der Probe kann man deutlich die aus der Proteinbindung freigesetzte Verbindung erkennen, da im Vergleich dazu der entsprechende Peak im Chromatogramm der Freisetzung der Blindprobe fehlt.

Beim Ligandenfischen wird stets der Anteil an freien, nicht an das Protein gebundenen Substanzen gemessen. Daher muss, wie auch in Abb. 39 zusehen, bei der Bindung einer Substanz an das Target die Konzentration im Filtrat der Probe entsprechend niedriger sein als in der Blindprobe. Da die Konzentration dieser Substanz in der Freisetzungslösung der Probe, nicht aber in der der Blindprobe wieder ansteigt, muss die Substanz an IGF-1-RTK gebunden haben.

Abb. 39 zeigt den Konzentrationsverlauf für die in Abb. 38 markierte Verbindung während des Ligandenfischens aus dem Dichlormethanextrakt aus *Liquiritiae radix*.

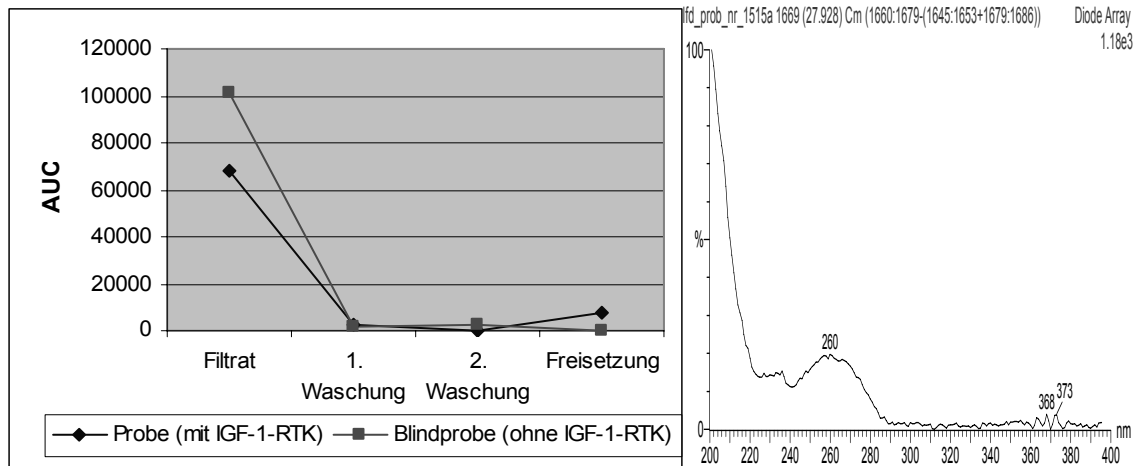


Abb. 39: Graphische Darstellung des Konzentrationsverlaufes der gefischten und in Abb. 38 gekennzeichneten Verbindung mit dazugehörigem UV-Spektrum

Während die Konzentration der Verbindung in der Blindprobe stetig abnimmt, steigt sie nach Zugabe der Freisetzungslösung in der Probe an. Deutlich wird auch der Konzentrationsunterschied zwischen Probe und Blindprobe im Filtrat.

Im Anschluss an die durchgeführten und oben beschriebenen Experimente müsste eine Extraktion von *Liquiritiae radix* mit Dichlormethan und Methanol in größerem Maßstab erfolgen, um die gefischten Verbindungen in für eine Strukturaufklärung ausreichenden Mengen zu erhalten.

5.3.2 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Lichen islandicus*

In einem ersten Ligandenfischversuch mit dem methanolischen Extrakt der Droge konnte bei mehreren Peaks in den Chromatogrammen der Freisetzung eine Zunahme der Fläche im Vergleich zur Blindprobe festgestellt werden (Abb. 40). Diese Substanzen dürften also an IGF-1-RTK gebunden haben. Bei dem mit einem kurzen Pfeil markierten Peak konnte in der Inkubationslösung kein entsprechender Peak mit gleichem UV-Spektrum bei dieser Retentionszeit gefunden werden. Auch tritt dieser mit dem kurzen Pfeil markierte Peak nur in der Freisetzung der Probe, dagegen nicht in der der Blindprobe auf. Es ist möglich, dass diese Substanz nicht aus dem Extrakt stammt. Andererseits kann diese Substanz bei der chromatographischen Vermessung der Inkubationslösung auch mit einer anderen, nicht an IGF-1-RTK bindenden Substanz koeluiert worden sein. In diesem Fall wäre das UV-Spektrum in der Inkubationslösung eine Kombination der UV-Spektren beider Substanzen. Nach Entfernung der nichtbindenden Substanz

durch die Waschungen während des Ligandenfischens, wäre in der Freisetzung nur noch die an IGF-1-RTK bindende Substanz im Chromatogramm zu sehen. Diese zeigt dann folglich ein von der Kombination verschiedenes UV-Spektrum.

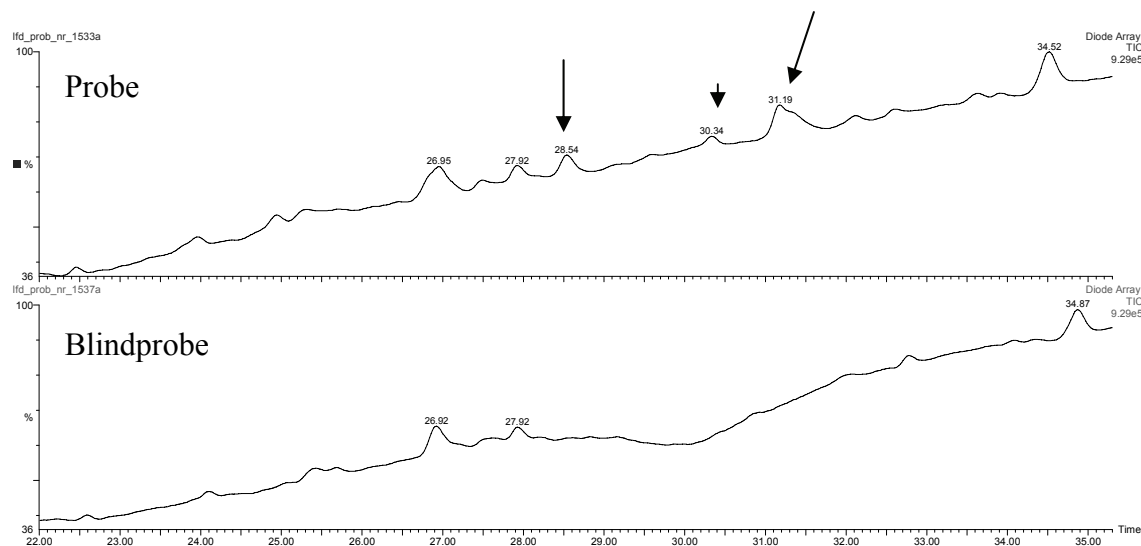


Abb. 40: Abbildung der Chromatogramme der Freisetzungen von Probe und Blindprobe des Ligandenfischens aus dem methanolischen Extrakt aus Lichen islandicus mit IGF-1-RTK

Mit Pfeilen sind die Peaks markiert, die in der Freisetzung der Probe vorhanden sind, in der Freisetzung der Blindprobe dagegen nicht.

Während dieses erste Ligandenfischen mit dem methanolischen Extrakt erfolgreich verlaufen ist, ergaben sich aus dem Ligandenfischen mit dem Dichlormethanextrakt keine exakt auswertbaren Daten. Für beide Extrakte sollten gegebenenfalls Wiederholungsmessungen durchgeführt werden, um die Ergebnisse der ersten Messungen zu bestätigen bzw. um eine erste Aussage hinsichtlich an IGF-1-RTK bindender Substanzen machen zu können.

5.3.3 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Passiflorae herba*

Mit dem methanolischen Extrakt der Droge wurde ein erstes Ligandenfischen durchgeführt. Nach kapillarchromatographischer Vermessung der Proben konnte bei mehreren Peaks im Chromatogramm der Freisetzung eine Flächenzunahme im Vergleich zur Blindprobe festgestellt werden. Auch hier werden noch Wiederholungsversuche von Nöten sein, um dieses Ergebnis zu bestätigen.

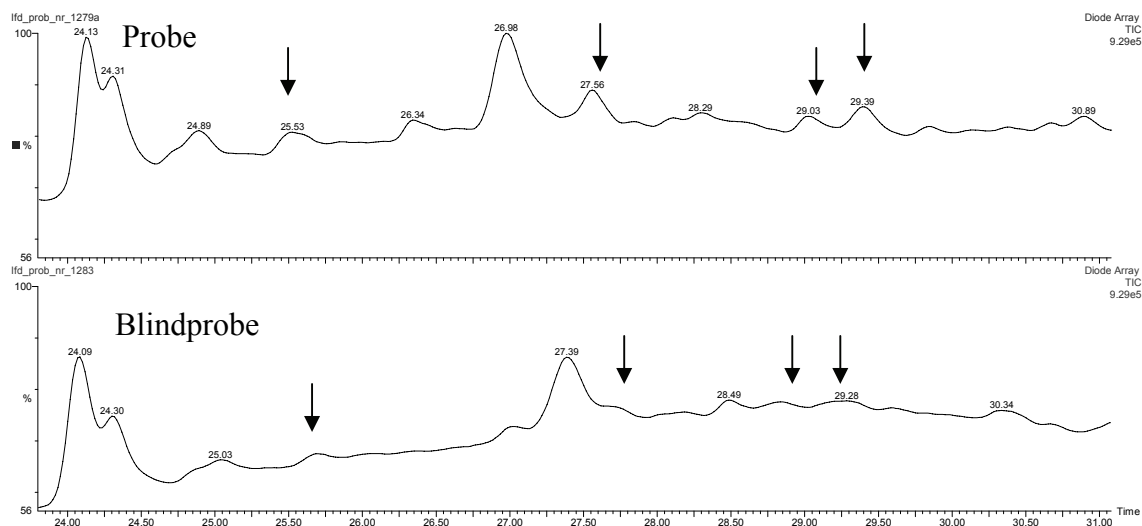


Abb. 41: Abbildung der Chromatogramme der Freisetzungen der Probe und der Blindprobe des Ligandenfischens aus einem methanolischen Extrakt aus *Passiflorae herba* mit IGF-1-RTK

Mit Pfeilen markiert sind jeweils die Peaks, deren Fläche in der Probe im Vergleich zur Blindprobe deutlich größer sind.

5.3.4 Ligandenfischen aus selektiven Extrakten aus *Quebracho cortex*

Im Allgemeinen zeichnen sich die Inhaltsstoffe von pflanzlichen Drogen durch ein hohes Maß an Biodiversität aus, die sich in einer enormen Vielfalt an unterschiedlichsten Verbindungen äußert.

Für ein Screening der in der Rindendroge *Quebracho cortex* enthaltenen Substanzen mittels der Methode des Ligandenfischens wurde zunächst eine Vorfraktionierung hinsichtlich der Polarität der Inhaltsstoffe in analytischem Maßstab vorgenommen. Dies war vorteilhaft, da so die Anzahl der im Chromatogramm erscheinenden Peaks bei der sich an das Ligandenfischen anschließenden, HPLC-analytischen Vermessung auf ein überschaubares Maß reduziert werden konnte. Zur Herstellung der Extrakte wurden Lösungsmittel steigender Polarität (n-Hexan, Dichlormethan, Methanol, ein Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 sowie reines Wasser) eingesetzt. Genaue Angaben zur Extraktion sind dem experimentellen Teil, Abschnitt 9.2.2.1 zu entnehmen. In Abb. 42 sind die Extraktausbeuten in Bezug auf das jeweils verwendete Lösungsmittel, die dazu benötigte Lösungsmittelmenge sowie die Ausbeute der Extraktion in Bezug auf die Gesamtmenge an eingesetzter Droge dargestellt. Bei dieser Extraktion konnten mit Methanol und dem 1:1-Gemisch aus Methanol und Wasser die größten Extraktmengen

erzielt werden. Die so erhaltenen fünf verschiedenen Extrakte der Rindendroge wurden dem Screening mittels Ligandenfischen zugeführt.

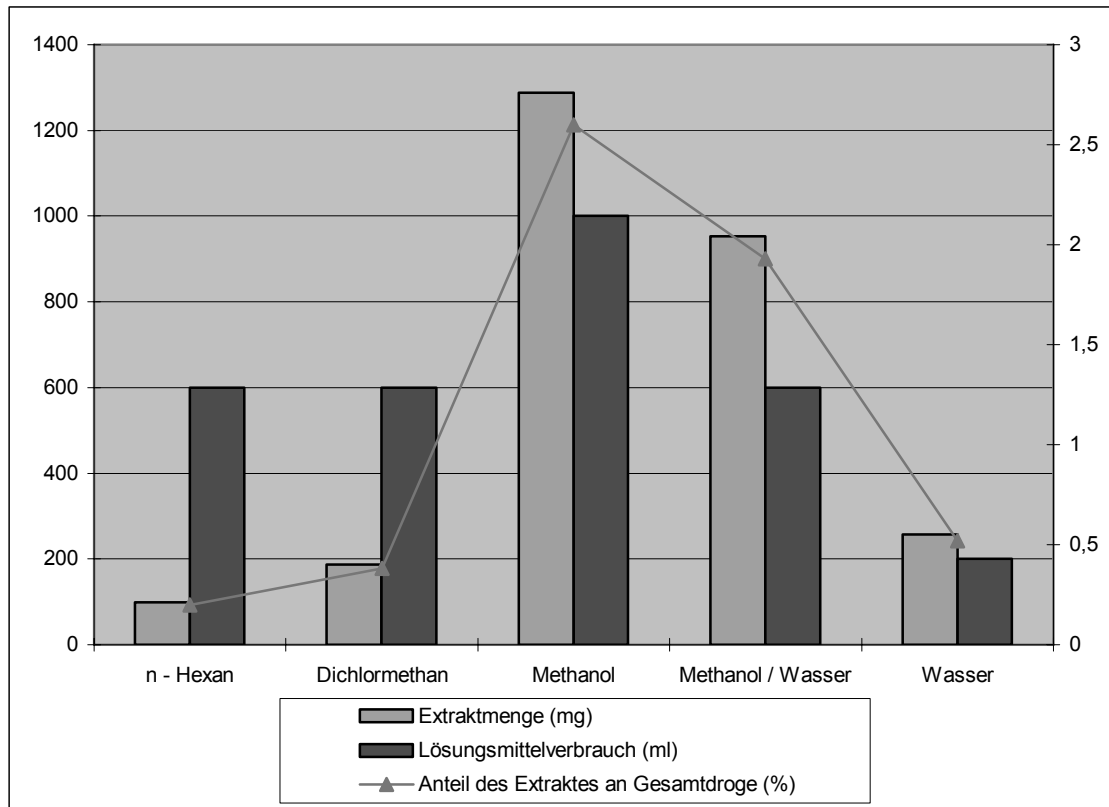


Abb. 42: Selektive Extraktion von Quebracho cortex im analytischen Maßstab

Die in Prozent angegebenen Werte beziehen sich auf den jeweiligen Massenanteil in Bezug auf die eingesetzte Masse an Quebrachorinde.

Aus dem wässrigen Extrakt sowie aus dem Dichlormethanextrakt konnte keine Substanz identifiziert werden, die an IGF-1-RTK bindet. Aus dem methanolischen sowie aus dem methanolisch-wässrigen Extrakt konnte jeweils eine Substanz gefischt werden (Abb. 43 und Abb. 44). Da die jeweils gefischte Verbindung in den Chromatogrammen der Proben aus den Ligandenfischversuchen mit den beiden Extrakten dieselbe Retentionszeit sowie dasselbe UV-Spektrum aufweist, handelt es sich sehr wahrscheinlich um dieselbe Substanz.

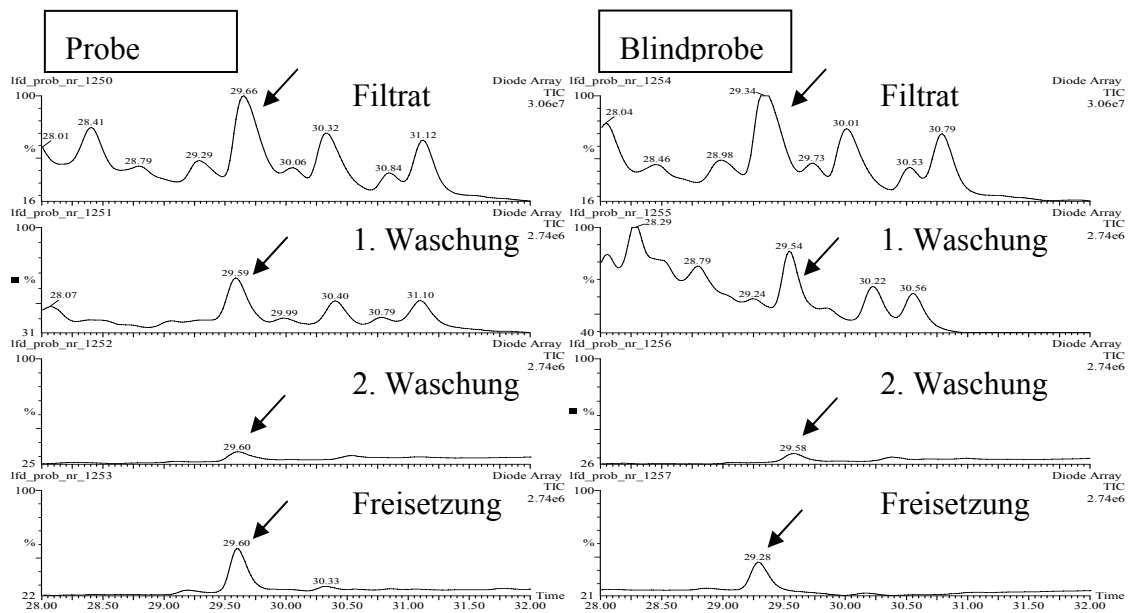


Abb. 43: Chromatogramme des Ligandenfisches aus dem selektiven Methanol-extrakt (analytischer Maßstab) aus Quebracho cortex mit IGF-1-RTK

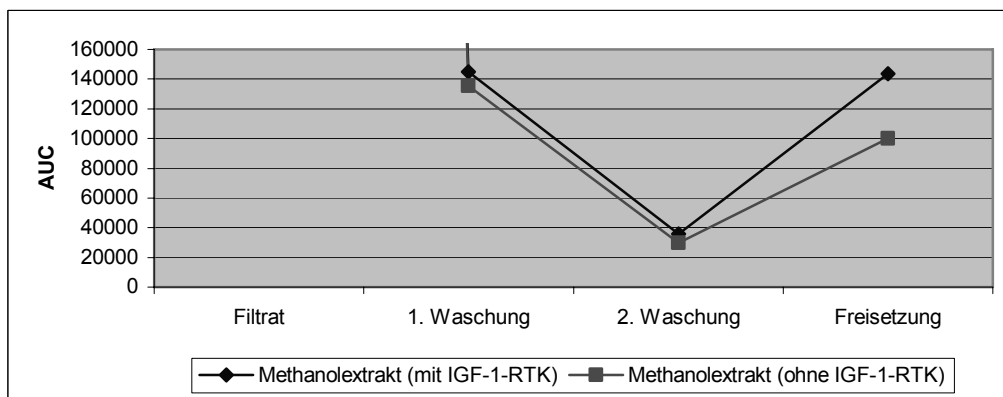


Abb. 44: Konzentrationsverlauf für die in Abb. 43 mit Pfeilen gekennzeichnete Substanz während des Ligandenfisches aus dem selektiven Methanol-extrakt (analytischer Maßstab) aus Quebracho cortex mit IGF-1-RTK

Dieses Ergebnis konnte durch mehrfache Wiederholungen der Versuche bestätigt werden. Um diese Resultate weiter zu untermauern, wurden insgesamt etwa 50 mg des Methanol-Extraktes analytisch chromatographiert und dabei in acht Fraktionen getrennt. Die Auswaagen der getrockneten Fraktionen betragen zwischen 0,02 und 0,17 mg. Für die nun folgenden Ligandenfischversuche wurde jeweils die gesamte Menge der Fraktion eingesetzt.

Abb. 45 zeigt die Chromatogramme der Inkubationslösungen der Fraktionen 4 – 7.

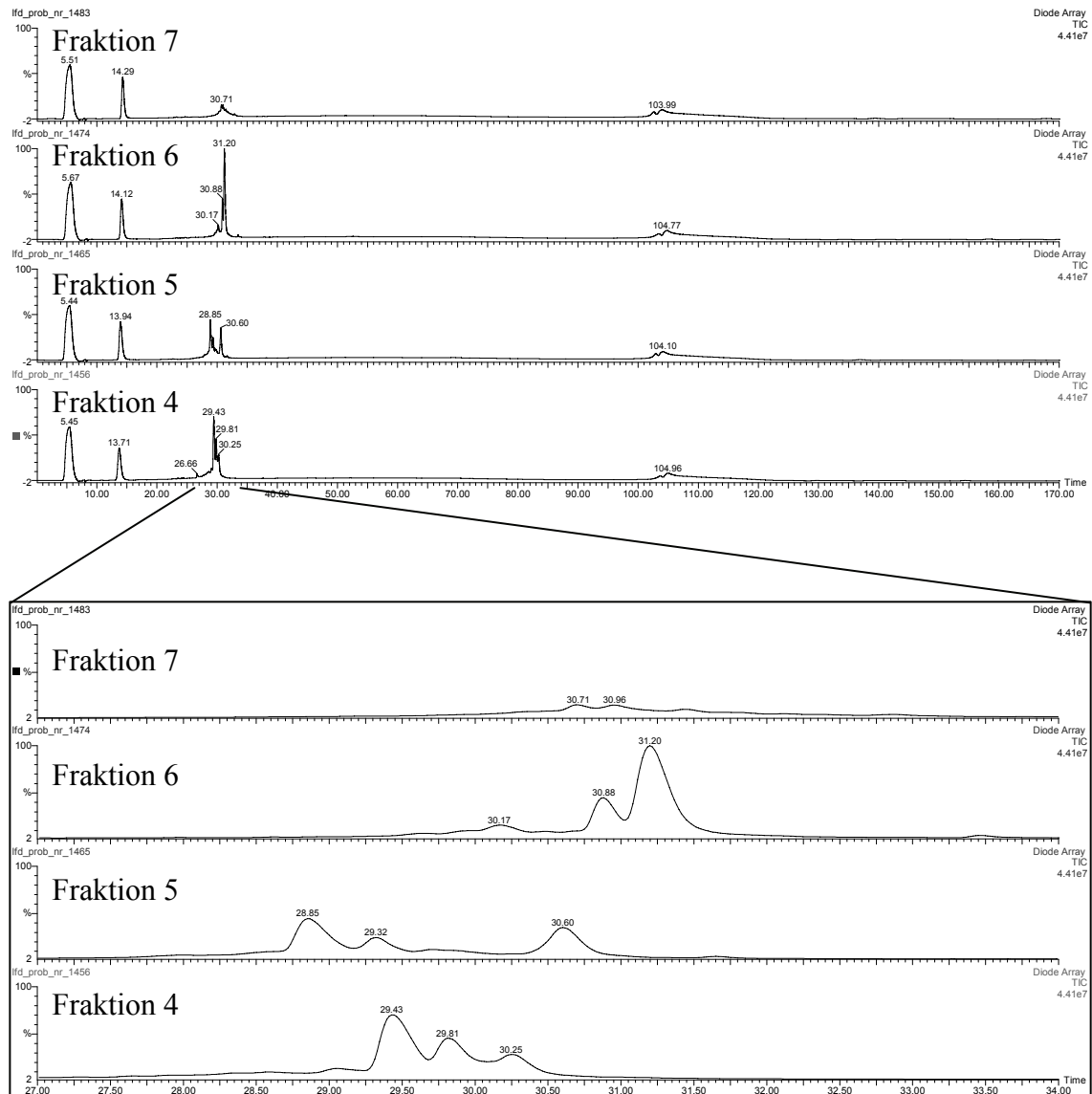


Abb. 45: Chromatogramme der Inkubationslösungen des Ligandenfischens aus den Fraktionen 4 – 7 des selektiven Methanolextraktes (analytischer Maßstab) aus Quebracho cortex mit IGF-1-RTK

Obere Abbildung: Gesamtdarstellung der Chromatogramme. Die beiden ersten Peaks kommen aufgrund der verwendeten Pufferlösung PL 03, die zum Lösen der Fraktionen verwendet wurde, zustande.

Untere Abbildung: Vergrößerung eines Ausschnitts aus den Chromatogrammen.

5.3.4.1 Ligandenfischen aus Fraktionen des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex

Besonders interessant erschienen die Fraktionen 4 – 7, da die enthaltenen Substanzen in einem Polaritätsbereich der mobilen Phase liegen, in dem auch die aus dem Methanol- oder methanolisch-wässrigen Extrakt gefischte Verbindung eluiert wurde (Abb. 45).

Aus den Fraktionen 4 und 5 konnte jeweils ein Peak bei ähnlicher Retentionszeit und identischem UV-Spektrum, im Vergleich mit der aus dem Methanolextrakt an IGF-1-RTK bindenden Substanz, gefischt werden (Abb. 46 und Abb. 47).

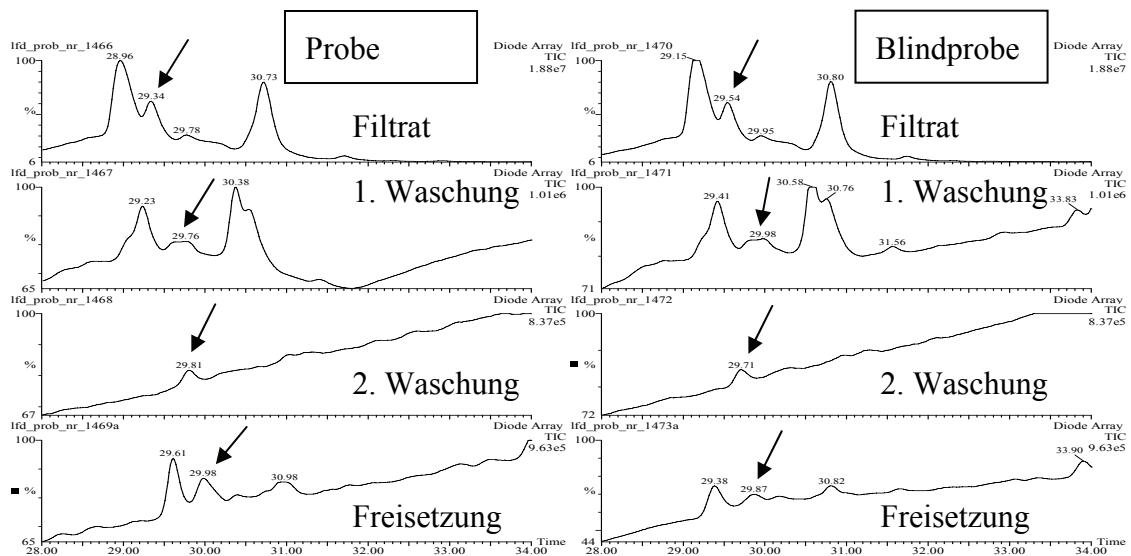


Abb. 46: Chromatogramme von Probe und Blindprobe des Ligandenfischens aus Fraktion 5 mit IGF-1-RTK

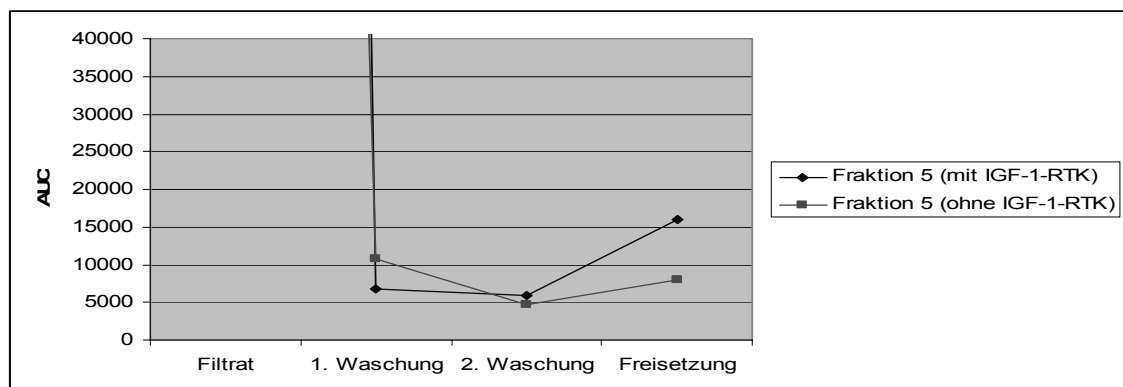


Abb. 47: Konzentrationsverlauf des in Abb. 46 gekennzeichneten Peaks während des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus Fraktion 5

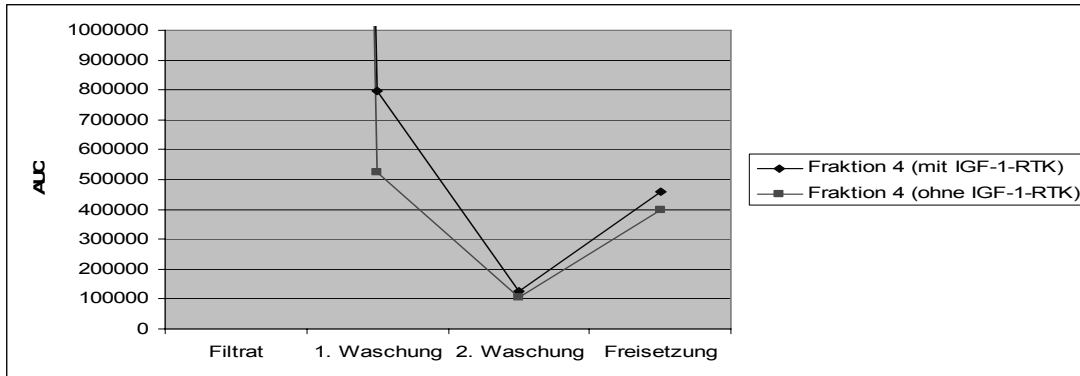


Abb. 48: Konzentrationsverlauf während des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus Fraktion 4

Ein Vergleich der Abbildungen Abb. 47 und Abb. 48 zeigt, dass die Ergebnisse des Fischversuchs aus Fraktion 5 aussagekräftiger sind.

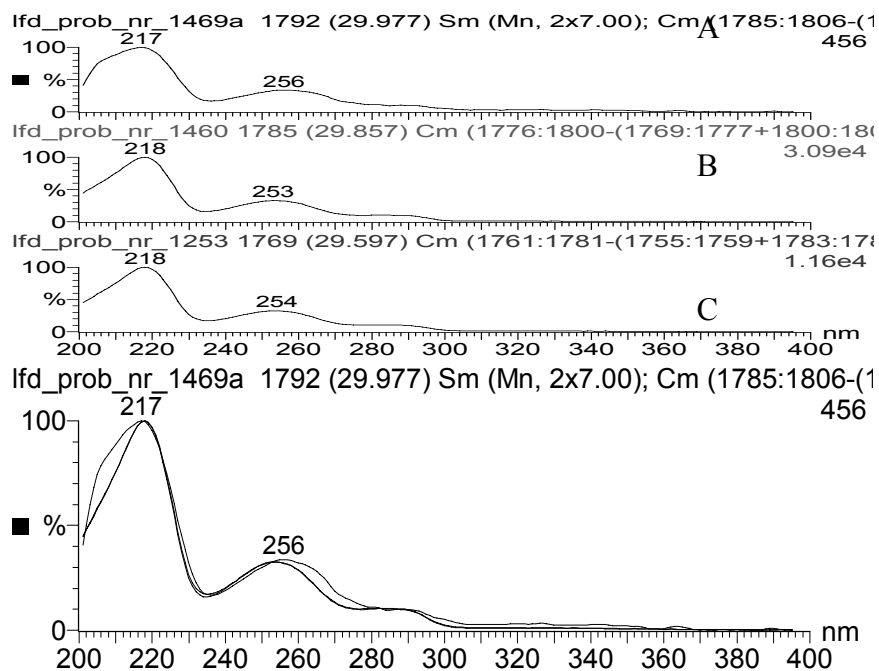


Abb. 49: UV-Spektren der aus dem Methanolextrakt aus Quebracho cortex gefischten Substanzen

Alle drei Peaks, aus denen die Spektren generiert wurden, besitzen ähnliche Retentionszeiten.

Obere Abbildung: A: UV-Spektrum der aus Fraktion 5 gefischten Substanz. B: UV-Spektrum der aus Fraktion 4 gefischten Substanz. C: UV-Spektrum der aus dem selektiven Methanolextrakt gefischten Substanz.

Untere Abbildung: durch Übereinanderlegen der drei Spektren aus der oberen Abbildung erhaltene Grafik.

Die UV-Spektren der aus Fraktion 4 und 5 gefischten Verbindung sind identisch mit der aus dem selektiven Methanol- und dem selektiven methanolisch-wässrigen Extrakt (analytischer Maßstab) gefischten Substanz bei gleicher Retentionszeit (Abb. 49).

Beim Ligandenfischen aus der Fraktion 6 konnte eine weitere an IGF-1-RTK bindende Substanz identifiziert werden. In Abb. 50 ist in der Freisetzungslösung der Probe eine deutliche Flächenzunahme eines Peaks verglichen mit dem entsprechenden Peak der Blindprobe zu sehen. Dieses wird in Abb. 51 nochmals durch den Anstieg der Probengeraden von der zweiten Waschung hin zur Freisetzung unterstrichen. Im Gegensatz dazu ist im gleichen Abschnitt des Versuchs in der Blindprobe (ohne IGF-1-RTK) sogar ein leichtes Abfallen des Graphen zu beobachten. Abb. 52 zeigt das zu der betrachteten Verbindung gehörige UV-Spektrum.

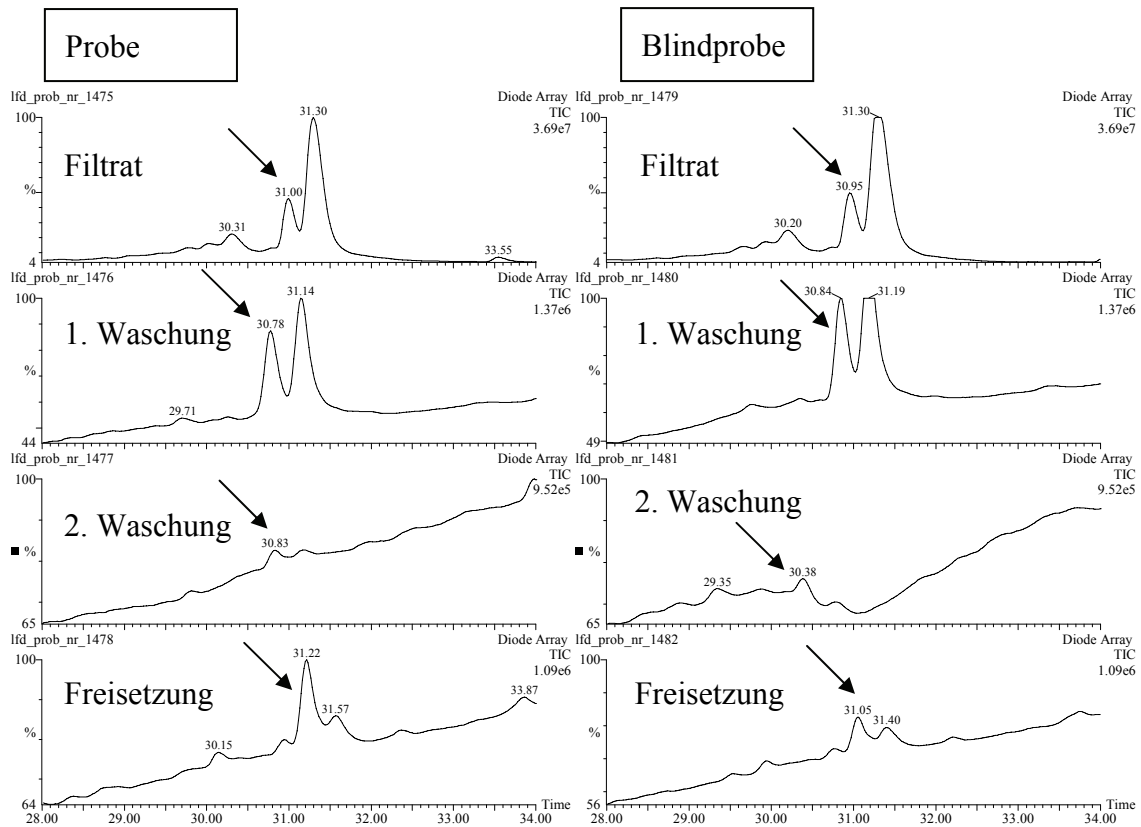


Abb. 50: Chromatogramme des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus Fraktion 6

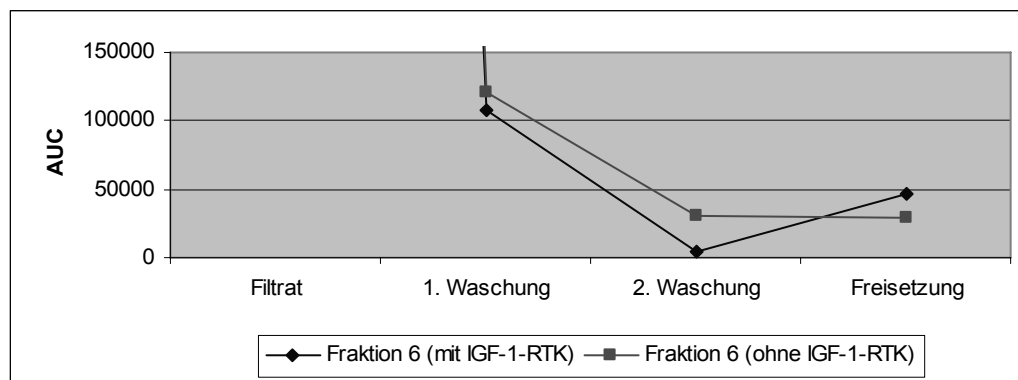


Abb. 51: Konzentrationsverlauf der in Abb. 50 gekennzeichneten Substanz während des Ligandenfischens mit IGF-1-RTK aus Fraktion 6

Der Anstieg der Probengeraden ist für die betrachtete Substanz im letzten Geradenabschnitt größer als der der Blindprobengeraden im entsprechenden Abschnitt.

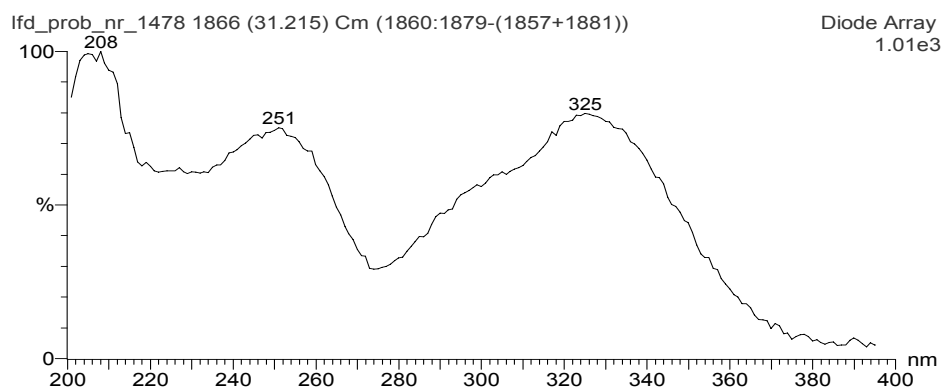


Abb. 52: UV-Spektrum der mit IGF-1-RTK gefischten Verbindung aus Fraktion 6 des Methanolextraktes der Quebrachorinde

Der Grund, dass das Fischen dieser Substanz aus der Fraktion, nicht aber aus einem der selektiven Extrakte gelang, liegt sicherlich in der durch die Fraktionierung hervorgerufenen Anreicherung. Damit findet gegenüber dem Protein im Vergleich zum Fischen aus einem der Extrakte eine Konzentrationserhöhung statt. Da die Bindung eines Liganden dem Massenwirkungsgesetz folgt, können bei Konzentrationserhöhung auch weniger stark bindende Liganden gefischt werden. Nähere Erläuterungen dazu wurden bereits im Abschnitt 5.1.1 dargelegt.

An diesem Beispiel wird deutlich gezeigt, dass auch ein Ligandenfischen aus bereits fraktionierten Extrakten sinnvoll sein und zu neuen Ergebnissen führen kann.

Aus Fraktion 7 konnte keine Substanz gefischt werden.

5.3.5 Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK aus verschiedenen Pflanzenextrakten ohne Feststellung einer Proteinbindung

Für die in Tab. 7 aufgeführten Extrakte konnte unter den im Abschnitt 9.1.1.8 angegebenen Bedingungen keine Bindung einer Substanz aus dem jeweiligen Extrakt an die IGF-1-RTK festgestellt werden. Bei den in eckigen Klammern aufgeführten Extrakten kann erst nach Wiederholung des Versuches eine Aussage getroffen werden.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Pflanzenextrakte

Stammpflanze	Verwendete Droge	Verwendeter Extrakt
Centella asiatica (L.) URBAN	Centellae asiaticae herba	Dichlormethanextrakt [Methanolextrakt]
Papaver somniferum L. ssp. somniferum	Getrockneter Milchsaft der angeschnittenen, unreifen Früchte	Opiumtinktur
Prunus africana (HOOK. F.) KALKM.	Cortex	Selektiver Dichlormethanextrakt
Aspidosperma quebracho-blanco SCHLECHT.	Quebracho cortex	Selektiver Dichlormethanextrakt Selektiver wässriger Extrakt (jeweils analytischer Maßstab (siehe Abschnitt 5.3.4))
Solanum dulcamara L.	Dulcamarae stipites	Trockenextrakt (Auszugsmittel: 45 %iger Methanol)

6 Isolierung und Identifizierung der gefischten Substanzen

In Kapitel 5 wurden unter anderem die positiv verlaufenen Ligandenfischversuche aus *Passiflorae herba* mit TGT und *Quebracho cortex* mit IGF-1-RTK vorgestellt. Ziel der weiteren Vorgehensweise war es, die in den Ligandenfischversuchen aus dem methanolischen *Passiflorae herba*-Extrakt gefundene, an die TGT bindende Substanz zu isolieren und zu identifizieren. Ebenso sollten die an IGF-1-RTK bindenden Substanzen aus dem methanolischen *Quebracho cortex*-Extrakt bzw. dessen Fraktionen isoliert und identifiziert werden.

Die Isolierung und Identifizierung dieser und weiterer Substanzen aus den genannten Extrakten wird in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels beschrieben.

6.1 Bearbeitung des methanolisch-wässrigen Extraktes aus *Passiflorae herba*

Um die aus dem Trockenextrakt gefischte Substanz in für eine Strukturaufklärung ausreichender Menge und Reinheit zu erhalten, wurde der Extrakt in mehreren Stufen mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Dazu musste zunächst eine Optimierung der Trennparameter in analytischem Maßstab erfolgen, um den Lösungsmittelverbrauch gering zu halten. Die Trennung sollte auf einer RP-Phase bei niedrigem pH-Wert durchgeführt werden, da die Hauptinhaltsstoffe aus *Passiflorae herba*, Flavonoide und deren Glykoside, phenolische OH-Gruppen und damit saure Eigenschaften besitzen. Der Säurezusatz bewirkt eine Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes von Substanzen mit sauren Eigenschaften zur undissoziierten Form der Verbindung. Zunächst wurde eine Trennung auf Nucleodur-Material ausgearbeitet (Abb. 53).

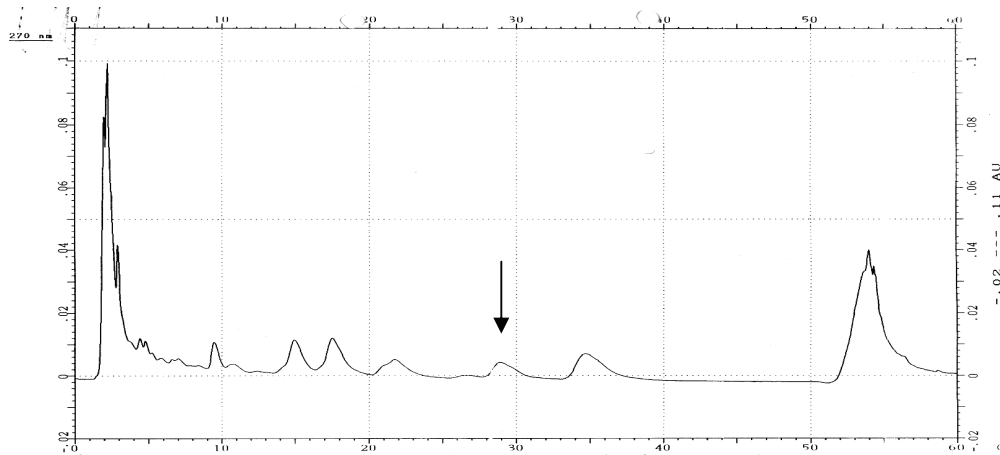


Abb. 53: Chromatogramm der analytischen Trennung des methanolischen Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* auf Nucleodur-Material

Der Pfeil markiert die Fraktion, die isoliert werden soll.

Nach erfolgreichem Upscaling auf eine größere Säulendimension musste jedoch festgestellt werden, dass die verwendete präparative Trennsäule nur mit verhältnismäßig kleinen Probenmengen beladen werden konnte. Nach ersten Trennungen und anschließender weiterer Aufreinigung von zwei der erhaltenen 15 Fraktionen wurde klar, dass die erhaltenen Substanzmengen für eine Strukturaufklärung nicht ausreichen. Aus diesem Grund wurde das Trennsystem auf Lichrospher 60 RP select B als stationäre Phase umgestellt (Abb. 54).

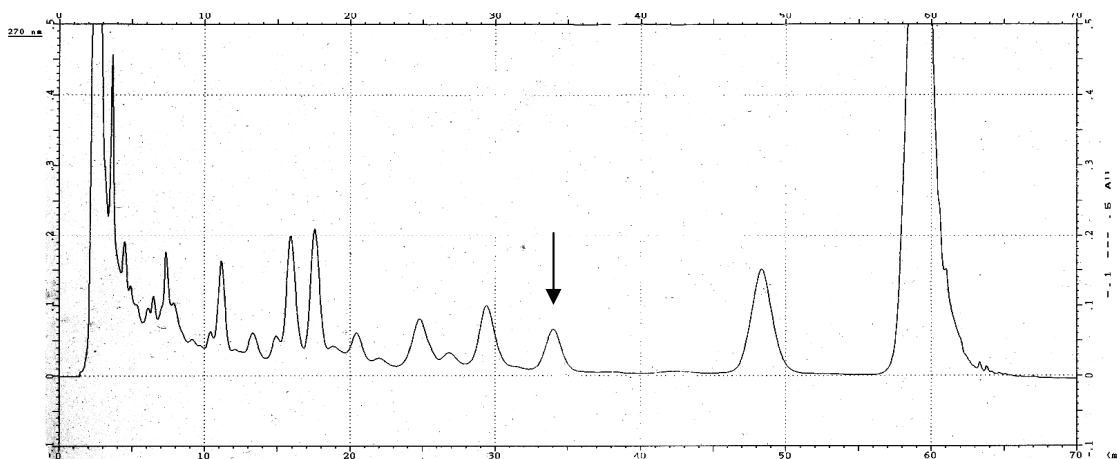


Abb. 54: Chromatogramm der analytischen Trennung des methanolischen Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* auf Lichrospher-Material

Der Pfeil markiert die Fraktion, die isoliert werden soll.

Das Lichrospher-Material unterscheidet sich von dem zuvor verwendeten Nucleodur-Material in Porengröße, Korngröße und Anteil an nicht derivatisierten Silanolgruppen. Es ist im Vergleich zum Nucleodur-Material etwas polarer und grobkörniger, aber engporiger.

Auf Grund der dadurch erreichten Verbesserung der Auflösung der Trennung konnte der Extrakt präparativ nun in 15 statt vormals 12 Fraktionen getrennt werden (Abb. 55). Die aus 60 identisch verlaufenen Trennungen erhaltenen Fraktionen wurden kapillarchromatographisch durch Vergleich mit den Chromatogrammen aus dem Ligandenfischen auf Anwesenheit der aus dem Gesamtextrakt gefischten Substanz überprüft. Dabei konnte Fraktion 12 als die relevante Fraktion identifiziert werden.

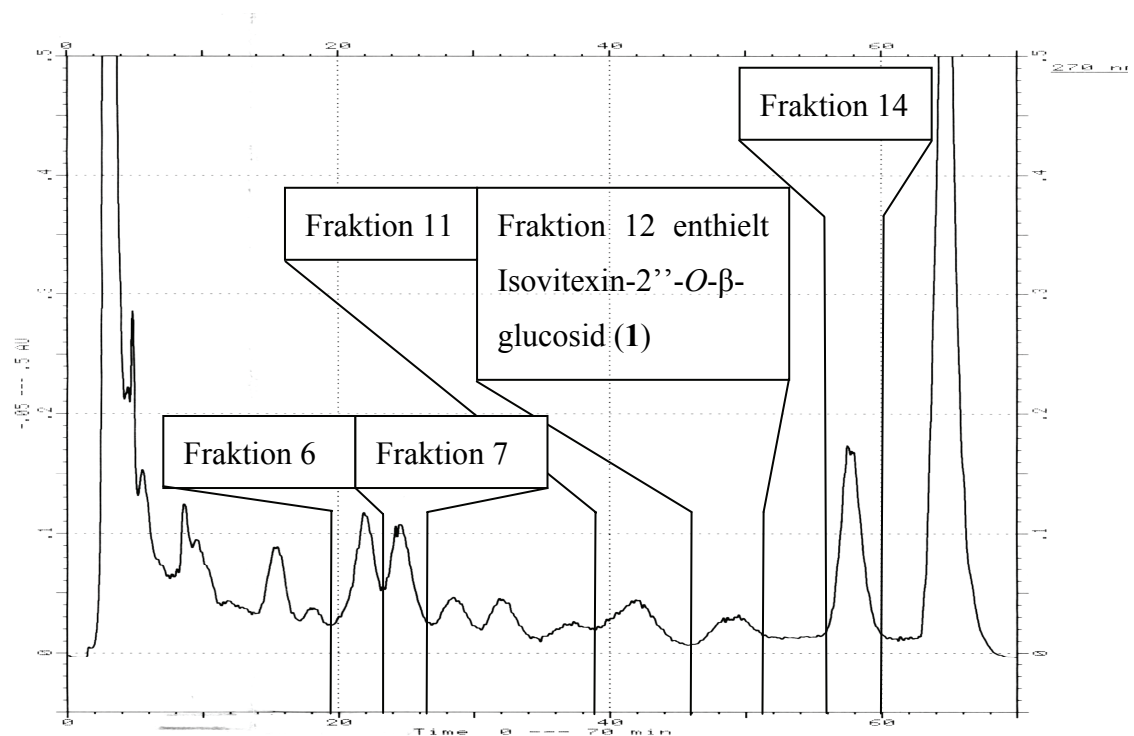


Abb. 55: Chromatogramm der präparativen Trennung des methanolischen Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* auf Lichrospher-Material

Die Säule wurde dabei pro Trennung mit 250 mg Extrakt beladen.

Abb. 56 zeigt die Massenverteilung auf die 15 Fraktionen, die bei der präparativen Trennung des Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* auf Lichrospher-Material gewonnen wurden.

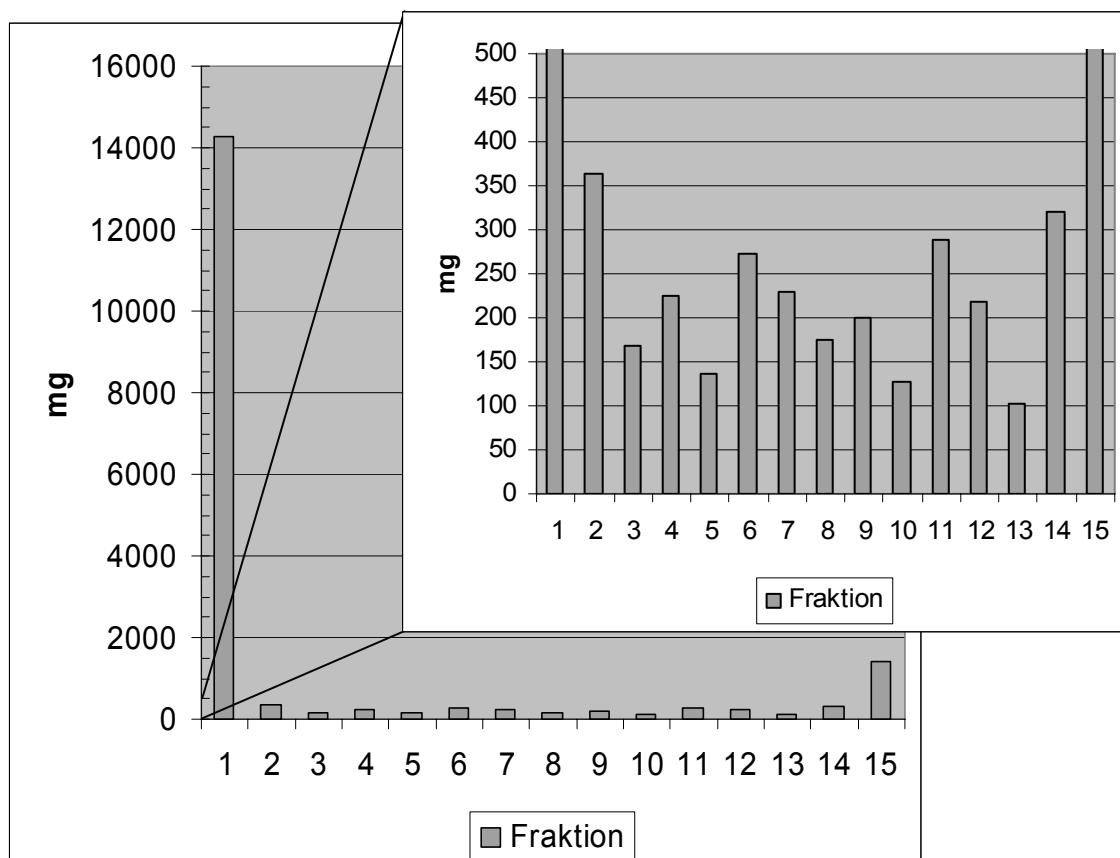


Abb. 56: Massenverteilung auf die Fraktionen der präparativen Trennung des Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* auf Lichrospher-Material

Mengenmäßig stellt Fraktion 1 die Größte der Fraktionen dar. Um die unterschiedliche Verteilung auf die anderen Fraktionen besser erkennen zu können, wurde die Vergrößerung eines Ausschnitts der Darstellung mit abgebildet.

6.1.1 Isolierung der wirksamen Substanz aus Fraktion 12

Die zu isolierende Substanz stellte zwar die Haupts substanz der Fraktion 12 dar, jedoch waren noch weitere Substanzen vorhanden, die mittels präparativer RP-HPLC abgetrennt werden sollten. Nach Optimierung der dafür notwendigen Parameter im analytischen Maßstab konnte die Substanz, die später als Isovite xin-2''-O- β -glucosid (**1**) identifiziert wurde, in ausreichender Menge mit relativ hoher Reinheit isoliert werden. Anschließend wurde nochmals eine RP-HPLC durchgeführt, um eine für die Strukturaufklärung hochreine Verbindung zu erhalten. Dabei diente eine Mischung aus Acetonitril und Wasser als mobile Phase. Der Wechsel der mobilen Phase bei gleich bleibender stationärer Phase führte zu einer Selektivitätserhöhung. Die Auswaage an Isovite xin-2''-O- β -glucosid (**1**) betrug nach Abziehen des Lösungsmittels 19,9 mg.

6.1.2 Isolierung weiterer Substanzen aus den Fraktionen 6, 7, 11 und 14

Neben der Isolierung der aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Passiflorae herba* mit TGT gefischten Substanz sollten aus den durch präparative RP-HPLC gewonnenen Fraktionen des Trockenextraktes weitere Substanzen isoliert werden.

Nachdem für Fraktion 6 ein geeignetes chromatographisches Trennsystem im analytischen Maßstab ermittelt worden war, wurde mit diesen Parametern eine präparative Trennung mittels HPLC durchgeführt (Abb. 57).

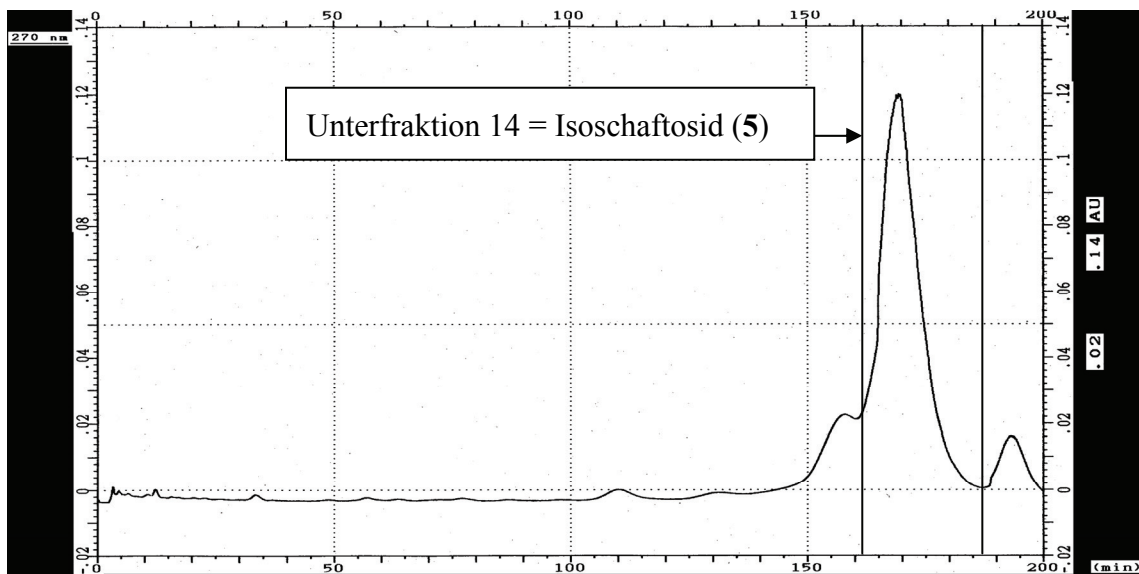


Abb. 57: Chromatogramm der präparativen Trennung von Fraktion 6 des methanolischen Extraktes aus *Passiflorae herba*

Nach Umkristallisation der aus dieser präparativen Trennung gewonnenen Unterfraktion 14 der Fraktion 6 aus einem Methanol/Wasser-Gemisch konnten 18,56 mg einer Substanz erhalten werden, die später als Isoschaftosid (5) identifiziert wurde.

Auch Fraktion 7 wurde nach analytischer Optimierung aller Parameter einer HPLC-Trennung in präparativem Maßstab unterzogen (Abb. 58).

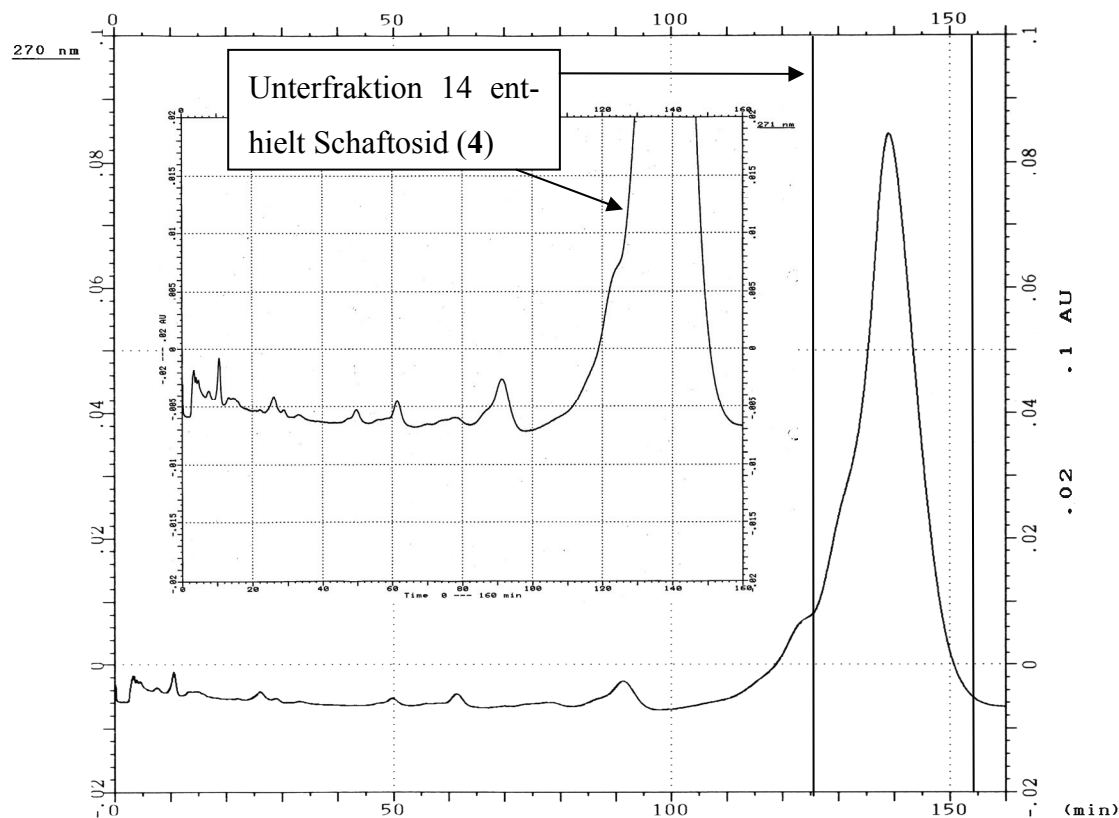


Abb. 58: Chromatogramm der präparativen Trennung der Fraktion 7 des methanolischen Extraktes aus *Passiflorae herba*

Im Chromatogramm ist zusätzlich eine vergrößerte Abbildung der Trennung angegeben.

Die erhaltene Unterfraktion 14 wurde, um die Substanz in möglichst hoher Reinheit zu gewinnen, nach einer Umkristallisation nochmals einer präparativen Trennung unterzogen. Die dabei als Unterfraktion 12 der Unterfraktion 14 erhaltene Substanz konnte mit den gängigen Methoden zur Strukturaufklärung (NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie) und Vergleich mit Literaturdaten als Schaftosid (**4**) identifiziert werden.

Die präparative Trennung von Fraktion 11 zur Isolierung der darin enthaltenen Hauptsubstanz war leider nicht ausreichend, wie eine HPLC-analytische Vermessung der Hauptfraktion dieser Trennung zeigte (Abb. 59). Das Chromatogramm weist einen großen Peak bei 12 min und einen etwas kleineren bei 24 min auf. Beide Substanzen unterscheiden sich somit deutlich in ihren Retentionszeiten. Daher sollten auch die Löslichkeiten dieser beiden Verbindungen unterschiedlich sein. Dieses konnte zur Trennung der beiden Substanzen mittels fraktionierender Kristallisation aus Metha-

no/Wasser ausgenutzt werden. Somit konnte Vitexin (3) als eine der beiden Substanzen isoliert werden. Die Substanz wurde durch Vergleich der aus NMR-Messungen und mittels Massenspektrometrie gewonnenen Daten mit Werten aus der Literatur identifiziert.

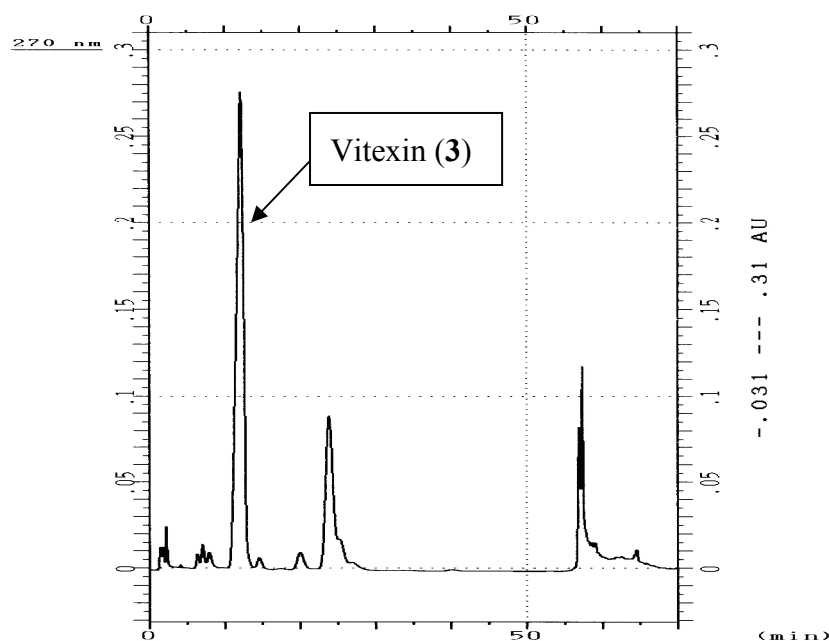


Abb. 59: Chromatogramm der analytischen Überprüfung der Hauptfraktion aus der präparativen Trennung von Fraktion 11

Nach Optimierung der Trennparameter im analytischen Maßstab konnte durch präparative HPLC in der Unterfraktion 4 Isovitexin (2) als die Hauptsubstanz von Fraktion 14 der präparativen Trennung des Trockenextraktes aus *Passiflorae herba* isoliert und identifiziert werden (Abb. 60).

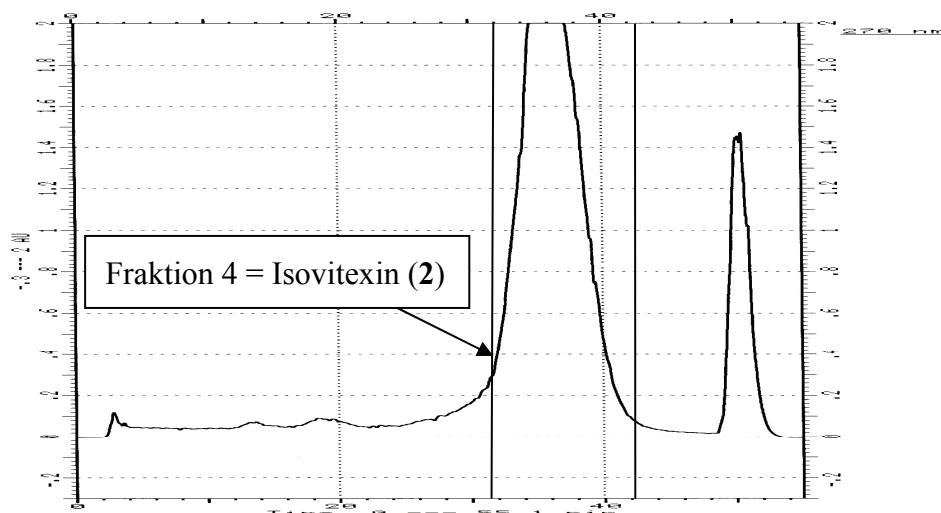


Abb. 60: Chromatogramm der präparativen Trennung der Fraktion 14 des methanolischen Trockenextraktes aus *Passiflorae herba*

6.1.3 Strukturaufklärung der aus *Passiflorae herba* isolierten Substanzen

Alle aus *Passiflorae herba* isolierten Substanzen stellen Flavonoide des Apigenin-Typs dar. Die in der Literatur aufgeführten $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Flavonoide sind lückenhaft. Insbesondere ist die Interpretation der Spektren im Bereich der Zuckersignale schwierig. Bisher wurde eine Identifizierung der Flavonoide durch NMR-Techniken über die Vermessung der Trimethylsilyletherderivate vorgenommen [117]. Durch die Entwicklung höherfeldiger NMR-Spektrometer können nun auch im Zucker-Bereich ohne vorherige Derivatisierung besser aufgelöste ^1H -Spektren erhalten werden. Die zusätzliche Entwicklung zweidimensionaler NMR-Methoden macht es heute möglich, eine direkte Identifizierung von Flavonoiden vorzunehmen. Dies hat den Vorteil, dass die isolierten Substanzen ohne Derivatisierung weiteren Messungen zur Verfügung stehen. Für vier der fünf im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus *Passiflorae herba* isolierten Flavonoide konnten die in der Literatur vorhandenen Daten hinsichtlich der Interpretation der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erweitert werden.

6.1.3.1 Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (1)

Von Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid sind keine Zuordnungen der einzelnen Protonen zu den im ^1H -Spektrum erhaltenen Signalen in der Literatur zu finden. Die Zuordnung der Signale erfolgte in dieser Arbeit über das ^1H -Spektrum und zweidimensionale NMR-

Techniken (H-H-COSY, HMQC, HMBC). Abb. 61 zeigt die Strukturformel dieses Flavonoids.

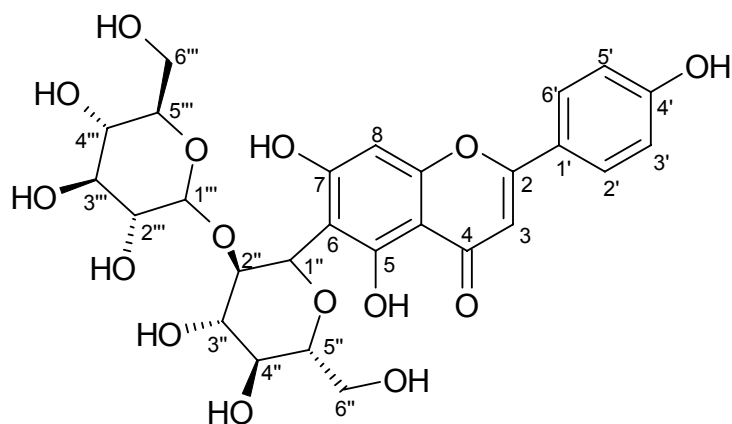


Abb. 61: Isovitexin-2''-O- β -glucosid (1)

Das gesamte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung ist in Abb. 62 zu sehen. Die Verwendung von D_2O -freiem DMSO-D_6 führte zur Sichtbarkeit von OH-Gruppen-Signalen.

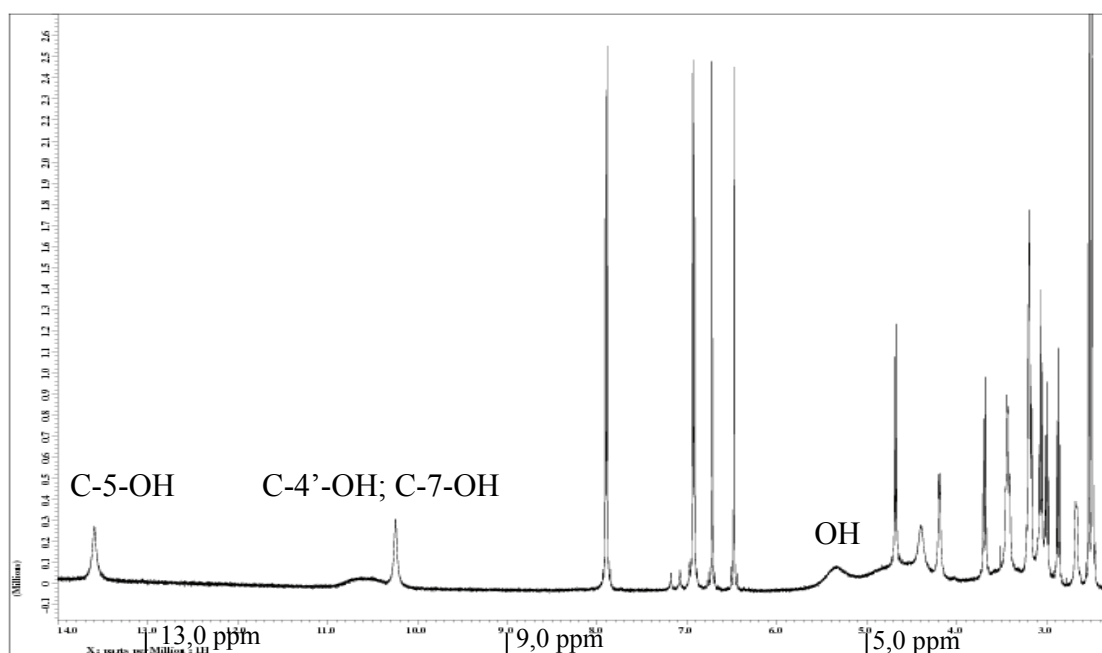


Abb. 62: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Isovitexin-2''-O- β -glucosid (1) als Übersicht

Nach Variation der Temperatur konnte bei 50 °C dieses gut aufgelöste Spektrum erhalten werden. Bei weiterer Temperaturerhöhung wurde mit 80 °C eine Temperatur nahe der Koaleszenztemperatur erreicht, wodurch es zu einer Verbreiterung der Signale bei gleichzeitig schlechterer Auflösung kam (Spektrum nicht abgebildet).

Das sehr tieffeldig liegende Signal bei 13,60 ppm wurde dem Proton der OH-Gruppe an C-5 zugeordnet, da es aufgrund einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe an C-4 sehr stark entschirmt ist. Die Signale bei 10,60 ppm und 10,24 ppm sind den Protonen der phenolischen OH-Gruppen an C-7 und C-4' zuzuordnen.

Die beiden Dubletts bei 7,9 ppm und bei 6,93 ppm mit Kopplungskonstanten von 8,7 bzw. 8,9 Hz gehören einem AA'BB'-System an. Dieses entsteht durch den an C-2 gebundenen, parasubstituierten Phenylring. Das Integral jedes dieser beiden Dubletts entspricht zwei Protonen. Aufgrund der aus dem HMQC abgelesenen Kopplungen kann das Signal bei 7,9 ppm den Protonen an C-2' und C-6', das bei 6,93 ppm denen an C-3' und C-5' zugeordnet werden (Abb. 63).

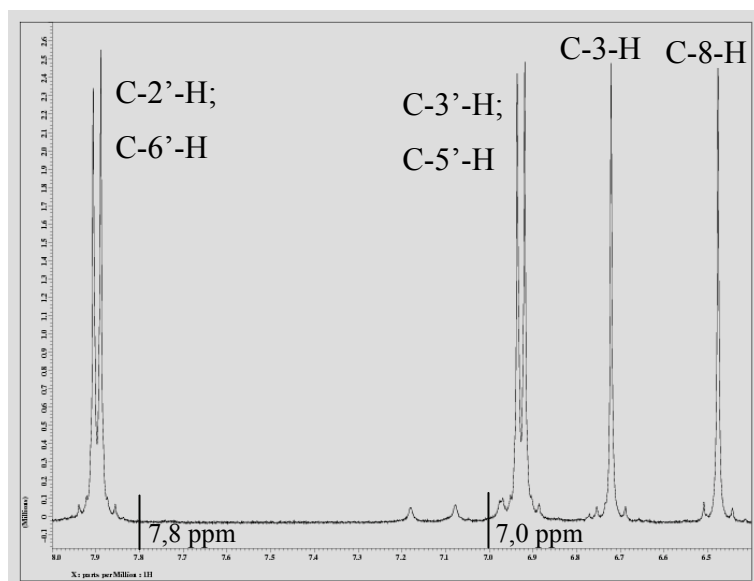


Abb. 63: Ausschnitt aus dem in Abb. 62 gezeigten ^1H -NMR-Spektrum

Da für die Protonen an C-3 und C-8 keine koppelnden Protonen an benachbarten Kohlenstoffatomen existieren, müssen sie als Singulett erscheinen. Durch die Kopplungen im HMQC- und im HMBC-Spektrum konnte das Singulett bei 6,72 ppm dem Proton an C-3, das bei 6,48 ppm dem an C-8 zugeordnet werden (Abb. 63).

Das sehr breite Signal bei 5,34 ppm ist zwei nicht näher bestimmbareren OH-Gruppen des Zuckerrestes zuzuordnen (Abb. 62).

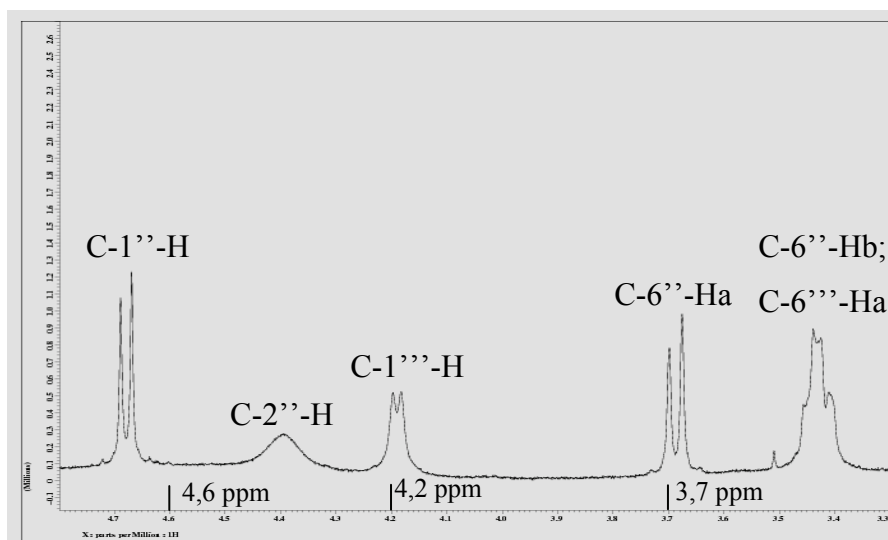


Abb. 64: Ausschnitt aus dem in Abb. 62 gezeigten ^1H -NMR-Spektrum

Mit einer Kopplungskonstante von 9,85 Hz spaltet das Proton an C-2'' das Signal des Protons am anomeren Kohlenstoffatom (C-1'') bei 4,68 ppm in ein Dublett auf. Da die Kopplungskonstante vom Diederwinkel abhängig ist, müssen die Protonen an C-1'' und C-2'' axial-axial zueinander stehen.

Das nicht aufgesplattene Signal bei 4,41 ppm konnte aus den Kopplungen in den zwei-dimensionalen NMR-Spektren dem Proton an C-2'' zugeordnet werden.

Ein weiteres, jedoch nicht vollständig aufgesplattenes Dublett erscheint bei 4,19 ppm und entspricht dem Proton am anomeren Kohlenstoffatom des zweiten Zuckers (C-1'''). Die Kopplungskonstante kann hier mit 7,55 Hz angegeben werden. Während alle anderen Signale im ^1H -Spektrum von Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) bei 50 °C eine bessere Aufspaltung zeigen, konnte für dieses Signal bei 35 °C eine deutlichere Aufspaltung erzielt werden. Die Kopplungskonstante wurde dort mit 9,85 Hz bestimmt.

Das Dublett bei 3,69 ppm ist einem der beiden Protonen am Kohlenstoffatom der glukosidischen CH_2OH -Gruppe (C-6''-Ha) zuzuordnen. Die Aufspaltung entsteht durch die Kopplung mit dem Proton an C-5''.

Das Integral für das Multiplett bei 3,43 ppm entspricht zwei Protonen. Über hetero- und homonukleare Kopplungen konnte dieses Signal je einem der beiden Protonen an C-6'' und C-6''' zugeordnet werden (Abb. 64).

Abb. 65 zeigt den Ausschnitt zwischen 3,3 und 2,6 ppm des in Abb. 62 dargestellten ^1H -Spektrums von Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**).

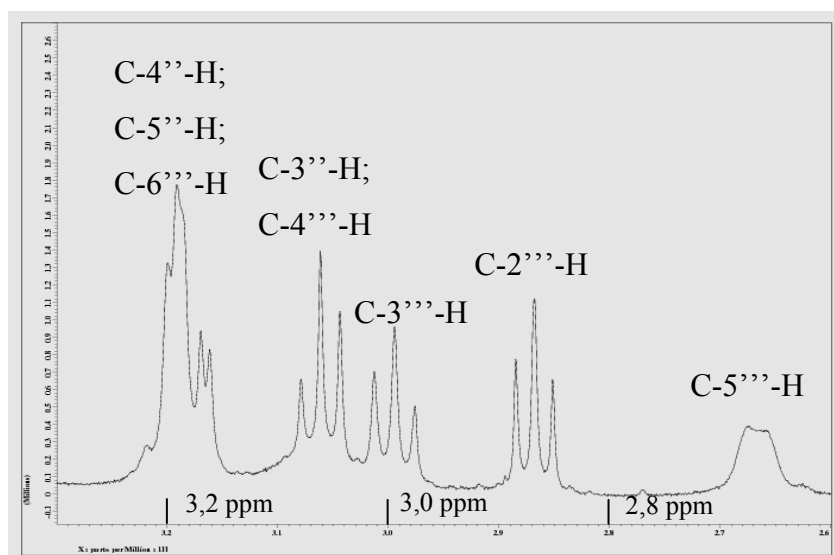


Abb. 65: Ausschnitt aus dem in Abb. 62 gezeigten ^1H -NMR-Spektrum

Ein Multiplett zeigt sich bei 3,19 ppm mit einem Integral, das drei Protonen entspricht. Aufgrund der Kopplungen in HMQC-, HMBC- und H-H-COSY-Experimenten konnten diesem Signal das Proton an C-4'', das Proton an C-5'' und eines der Protonen an C-6''' zugeordnet werden.

Das Integral für das Signal bei 3,06 ppm entspricht zwei Protonen. Diesem Signal können die Protonen an C-3'' und C-4''' zugeordnet werden. Es erscheint als Triplet mit Kopplungskonstanten von 8,70 Hz und 8,95 Hz.

Das Proton an C-3''' wird durch das Triplet bei 2,99 ppm repräsentiert. Die Aufspaltung mit Kopplungskonstanten von 9,15 Hz und 9,4 Hz resultiert aus der Kopplung mit den Nachbarprotonen an C-2''' und C-4'''.

Das Triplet bei 2,87 ppm konnte dem Proton an C-2''' zugeordnet werden. Die Aufspaltung entsteht durch die Nachbarprotonen an C-1''' und C-3'''.

Das breite Signal bei 2,66 ppm entspricht dem Proton an C-5'''. Die Aufspaltung durch das Proton an C-4''' kann nur in Ansätzen erkannt werden. Berechnet man dennoch eine Kopplungskonstante, so hat sie eine Größe von 9,6 Hz (Abb. 65).

Alle Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen sind größer als 7 Hz. Daraus folgend müssen alle Protonen jeweils axial-axial zueinander stehen. Deshalb kann der an C-6 des ApigeninGrundgerüsts gebundene Zucker als β -D-Glukose und der an C-2'' der Glukose gebundene Zucker ebenfalls als β -D-Glukose charakterisiert werden. Das aus zwei 1,2-*O*-verknüpften β -D-Glukosemolekülen bestehende Disaccharid wird auch als Sophorose bezeichnet.

Durch Zugabe eines Tropfens D₂O konnte die Zuordnung hinsichtlich der OH-Gruppen bestätigt werden. Diese erscheinen dann, infolge des Austausches von H gegen D, nicht mehr im ¹H-Spektrum.

Die Angaben in der Literatur [118] [119] [120] bezüglich der Zuordnung der Kohlenstoffatome im ¹³C-NMR-Spektrum für Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) sind unterschiedlich. Durch A. Proliac und J. Raynaud [120] ist im Gegensatz zu den anderen beiden Quellen ein vollständig aufgelöstes ¹³C-Spektrum für Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) beschrieben worden. Jedoch weichen Zuordnung und Verschiebung stark von den durch H. Geiger und K. R. Markham [118] sowie durch B. Zerihun et al. [119] gemachten Angaben und den hier erhaltenen Daten ab.

Durch die Vermessung der Substanz in DMSO-D₆ bei 80 °C und die Verwendung eines 500 MHz-NMR-Spektrometers konnte ein vollständig aufgelöstes ¹³C-NMR-Spektrum erhalten werden (Abb. 66). Die Zuordnung der Kohlenstoffatome erfolgte über die Angaben in der Literatur sowie über HMQC- und HMBC-Spektren. Entgegen der Zuordnung durch H. Geiger und K. R. Markham [118] muss das Signal für C-7 aufgrund einer stärkeren Entschirmung durch die direkte Bindung einer phenolischen OH-Gruppe tieffeldiger als das für C-2 liegen. Die an C-5 gebundene OH-Gruppe bildet mit der an C-4 gebundenen Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke. Deshalb ist C-5 stärker entschirmt. Das Signal dieses Kohlenstoffatoms muss daher tieffeldiger liegen, als das von C-4'. Aus den zweidimensionalen Spektren können die Kohlenstoffatome an C-5'' und C-2'' entgegen der Literatur in umgekehrter Reihenfolge zugeordnet werden.

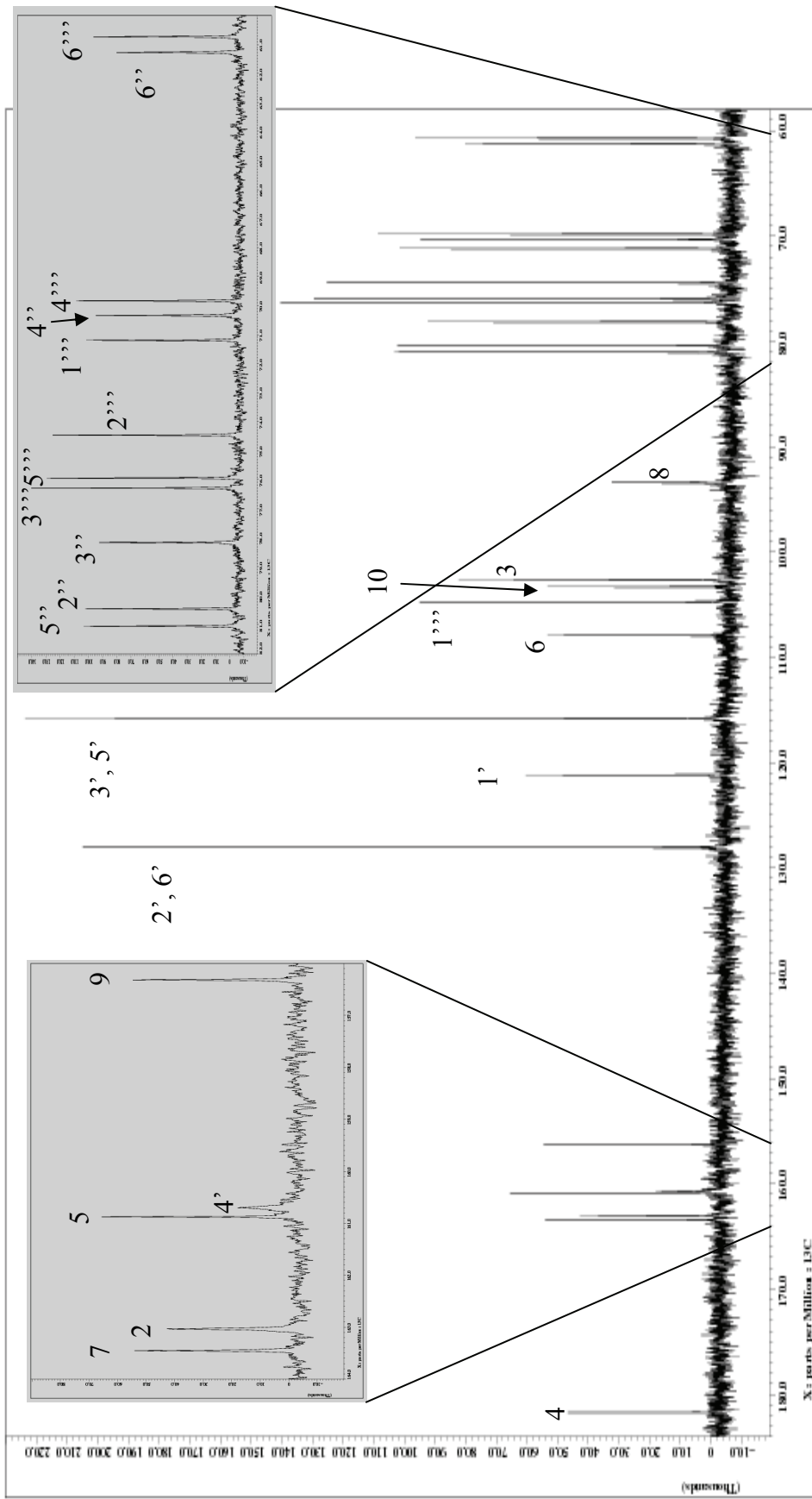


Abb. 66: ^{13}C -NMR-Spektrum von Isovitexin-2''-O- β -glucosid (1) gemessen in DMSO-D₆ bei 80 °C

6.1.3.2 Isovitexin (2)

Die von M. Krauze-Baranowska und W. Cisowski [121] gemachten Angaben bezüglich der Verschiebungen der Kohlenstoffatomsignale von Isovitexin (2) (Abb. 67) im ^{13}C -NMR-Spektrum stimmen sehr gut mit den hier gemessenen Verschiebungen überein.

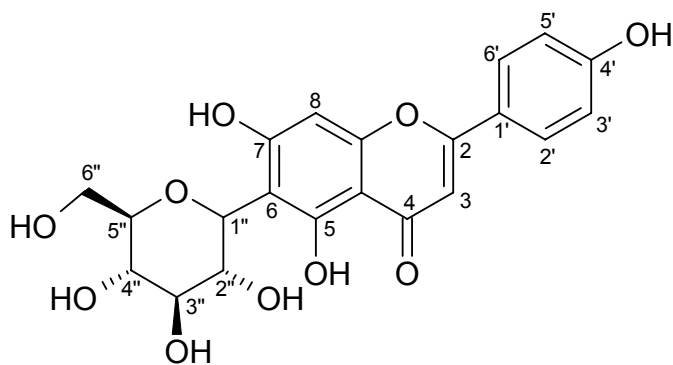


Abb. 67: Isovitexin (2)

Für die Zuordnung der Signale des ^1H -Spektrums konnten in den Quellen [121] [122] nur die Verschiebungen und Kopplungen für die Protonen des Aglykons und des Protons am anomeren Kohlenstoffatom gefunden werden.

Die Protonen an C-3 und an C-8 müssen aufgrund nicht vorhandener Nachbarprotonen als Singulett erscheinen. Die Verschiebungen aus dem ^1H -Spektrum sowie die Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum für diese beiden Protonen wurden mit denen aus den Quellen [121] [122] verglichen. Aufgrund der Kopplungen im HMQC-Spektrum kann eine eindeutige Zuordnung der Protonen erfolgen. Demnach entspricht das Singulett bei 6,76 ppm dem Proton an C-3 und das bei 6,50 ppm dem an C-8. Folglich müssen die Angaben dieser beiden Veröffentlichungen korrigiert werden. Demgegenüber nehmen K. R. Markham und H. Geiger in einer früheren Veröffentlichung [117] die Zuordnung dieser Signale richtig vor. Jedoch kann die Ansicht dieser beiden Autoren über die Zuordnung der Zuckerprotonen nicht vollständig geteilt werden. Zudem sind für die Protonen an C-6'' keine Kopplungskonstanten angegeben. Für diese Protonen kann aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Spektren eine Kopplungskonstante angegeben werden. Beide Protonen spalten mit einer Kopplungskonstante von 11,45 Hz auf. Das höherfeldige dieser Protonen zeigt aufgrund der geminalen Kopplung zusätz-

lich eine Aufspaltung von 5,3 Hz. In Abb. 68 ist das Protonenspektrum von Isovitexin (2) dargestellt.

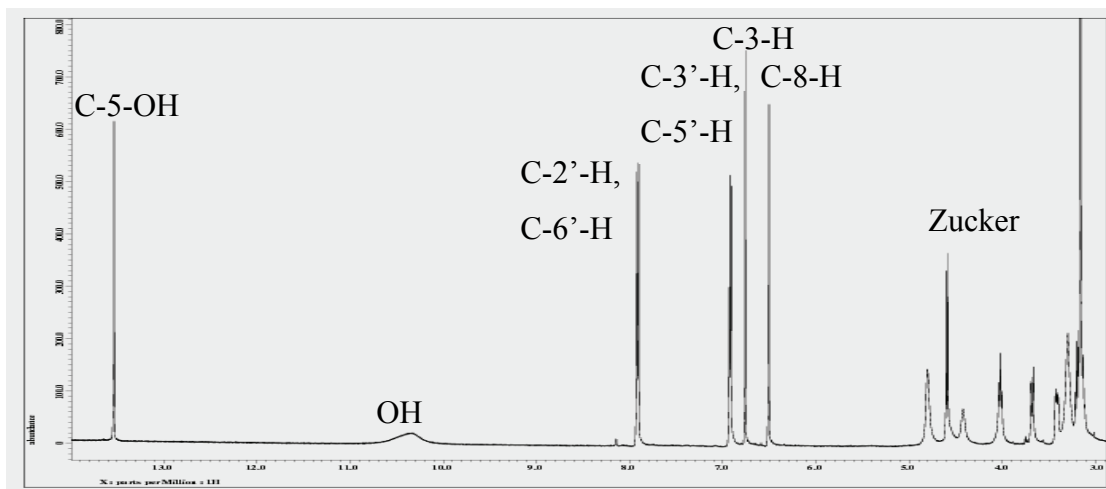


Abb. 68: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Isovitexin (2)

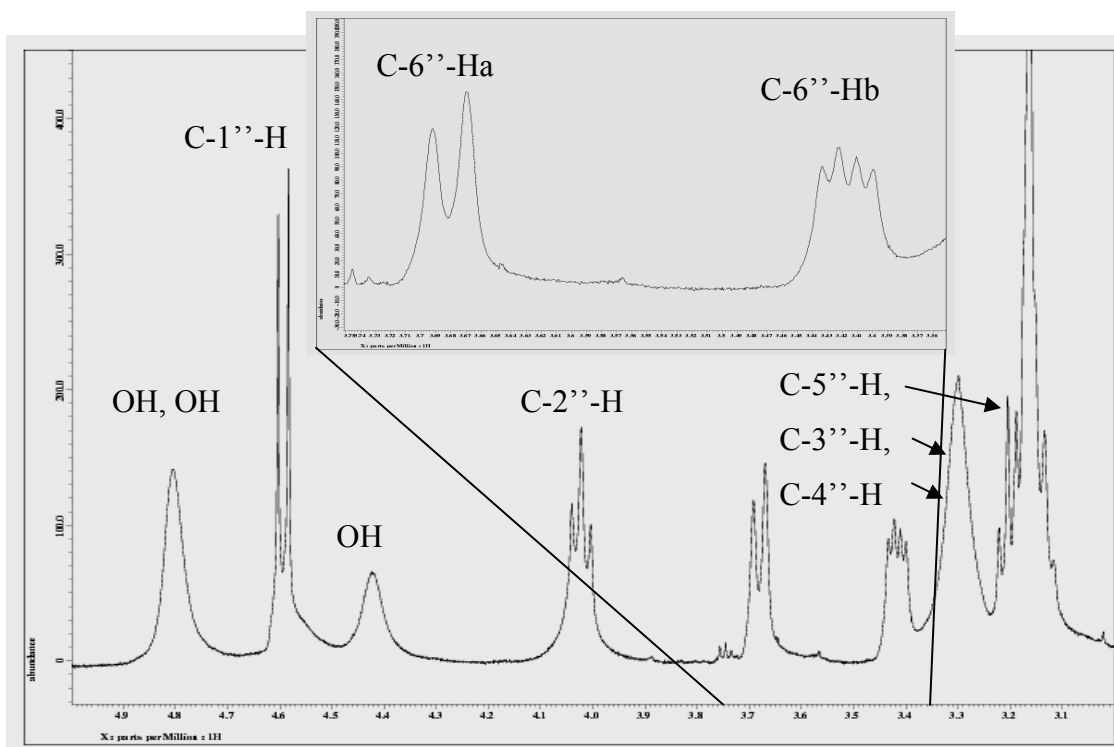


Abb. 69: Bereich der Zuckersignale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Isovitexin (2)

Die Vergrößerung zeigt die Protonen an C-6''.

Abb. 69 zeigt in einem Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums die Zuckersignale von Isovitexin (2).

Die Zugabe eines Tropfens D_2O provozierte den Austausch von Protonen gegen Deuterium und bestätigte die Zuordnung der OH-Protonen.

Ein Vergleich mit dem auf Seite 477 in „The Flavonoids – Advances in Research since 1986“ [117] abgebildeten 1H -NMR-Spektrum zeigt für das hier gemessene 1H -Spektrum eine wesentlich bessere Auflösung der genannten Signale.

6.1.3.3 Vitexin (3)

Das Vorhandensein von Vitexin (3) (Abb. 70) in *Passiflorae herba* ist ebenso wie das der anderen im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit isolierten Flavonoide bekannt.

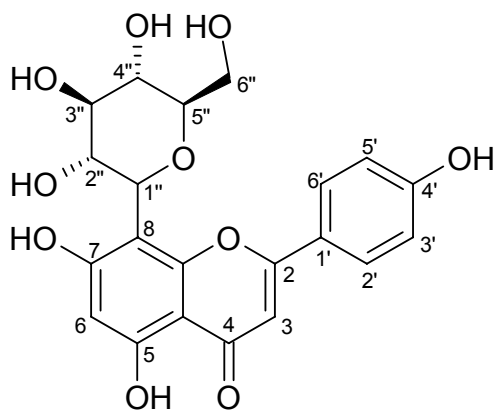


Abb. 70: Vitexin (3)

Ein Vergleich der Messwerte aus 1H -, ^{13}C -NMR und Massenspektrometrie mit den Daten aus Literatur [123] erbrachte eine sehr genaue Übereinstimmung.

Als Ergänzung zu den dort gemachten Angaben konnte das Signal bei 4,57 ppm im 1H -Spektrum aufgrund der Aufspaltung zu einem Triplett der OH-Gruppe an C-6'' zugeordnet werden (Abb. 71 A).

Die Aufspaltung kommt durch die ebenfalls an C-6'' gebundenen Protonen zustande. Dass es sich bei diesem Signal tatsächlich um eine OH-Gruppe handelt, konnte durch erneute Messung der Probe unter Zusatz eines Tropfens D_2O bestätigt werden. Durch diesen Zusatz erfolgt ein Austausch der Protonen gegen Deuterium, so dass im Protonenspektrum das entsprechende Signal verschwindet. Der Austausch findet bevorzugt und schnell an den OH-Gruppen statt, da hier das Proton aufgrund der hohen Elektronegativität des Sauerstoffs weniger fest gebunden ist.

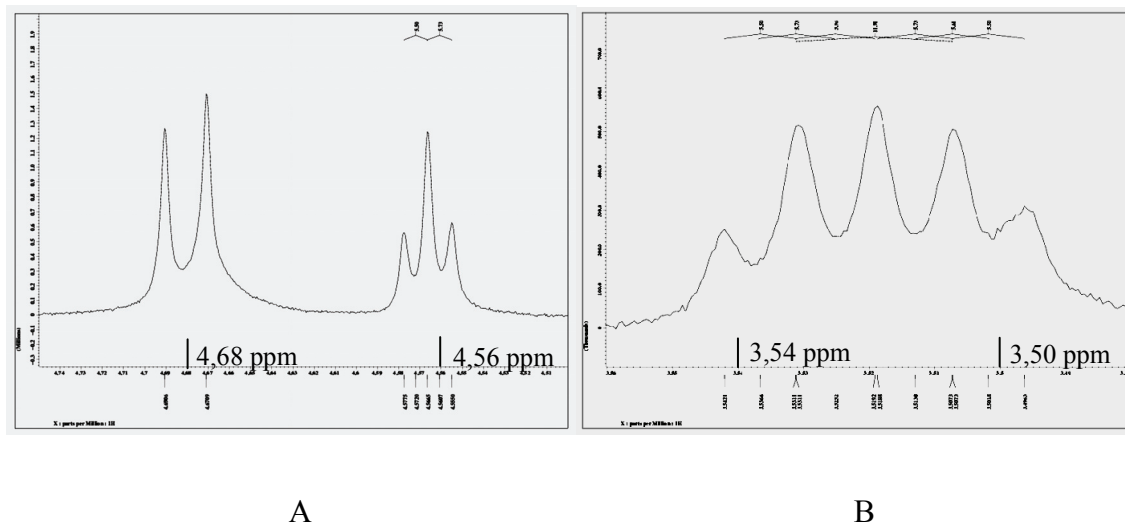


Abb. 71: ^1H -NMR-Signale aus dem Protonenspektrum von Vitexin (3)

Abbildung A: Signal des Protons an C-1'' (sowie einer OH-Gruppe) und das der OH-Gruppe an C-6''.

Abbildung B: Signal eines der beiden Protonen an C-6''.

Weiterhin konnte das Signal eines der beiden Protonen an C-6'' bei 3,52 ppm in seiner Aufspaltung näher charakterisiert werden. Das Kopplungsmuster entsteht durch Aufspaltung dieses Protonensignals durch das an Position C-5'' gebundene Proton zu einem Dublett. Dieses Dublett wird dann durch das magnetisch nicht äquivalente geminale Proton an C-6'' in ein Dublett eines Dubletts aufgespalten. Jede der entstandenen vier Linien wird dann durch die ebenfalls an C-6'' gebundene OH-Gruppe in wiederum zwei Linien aufgespalten. Aufgrund der Überlagerung einiger Linien entsteht dann das in Abb. 71 B gezeigte Kopplungsmuster.

Auch für das an Position C-4'' befindliche Proton konnte ein gut aufgespaltenes Signal bei 3,36 ppm erhalten werden (Abb. 72). Hier spaltet eines der beiden chemisch nicht äquivalenten Nachbarprotonen an C-5'' bzw. C-3'' das Signal zunächst in ein Duplett auf. Die Linien werden dann durch das zweite Proton an C-5'' weiter zu einem Dublett vom Dublett aufgespalten. Letztendlich wird durch das Proton der OH-Gruppe an C-4'' jede dieser vier Linien nochmals in je ein Dublett aufgespalten. Leider ist ein Teil des Kopplungsmusters durch ein Signal von Wasser überdeckt.

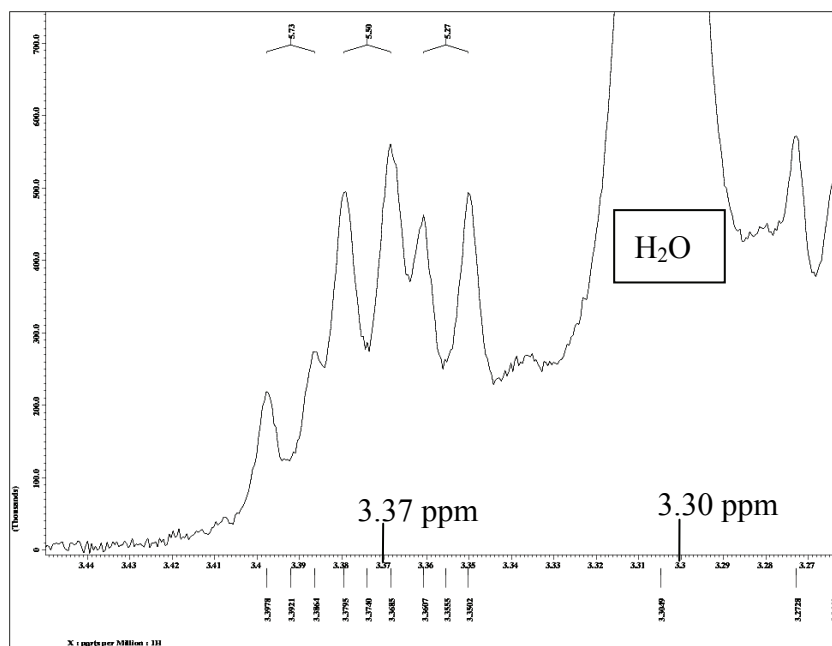


Abb. 72: Signal des Protons an C-4'' aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Vitexin (3)

6.1.3.4 Schaftosid (4)

Die Zuordnung der Signale aus dem ^1H - und dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Schaftosid (4) (Abb. 73) erfolgte durch Vergleich mit Literaturangaben. Die Angaben aus den verschiedenen Quellen zeigten Differenzen für die darin aufgeführten Verschiebungen der Kohlenstoffatome.

Die Verschiebungen der Signale im Bereich des Aglykons des erhaltenen ^{13}C -NMR-Spektrums stimmten mit denen aus Literatur [124] sehr gut überein. Eine weniger gute Übereinstimmung dieser Signale trat dagegen im Vergleich zu Literatur [125] auf. Im Bereich der Zuckersignale waren die Abweichungen der erhaltenen Messwerte zu [125] geringer als zu den von Österdahl [124] erhaltenen Werten. Die in Literatur [126] gemachten Angaben betreffen vor allem die Signale der Kohlenstoffatome der beiden Zucker, die mit den gemessenen Werten nahezu übereinstimmen.

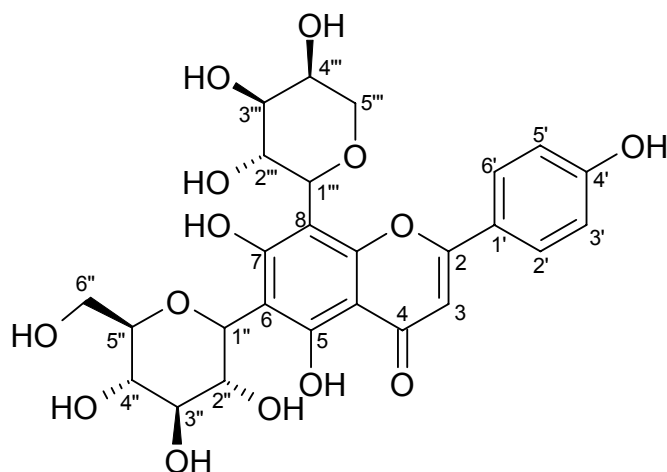


Abb. 73: Schaftosid (4)

Das ebenfalls in Deutero-Dimethylsulfoxid aufgenommene ^1H -Spektrum stimmte mit den Literaturwerten überein [126] [128].

6.1.3.5 Isoschaftosid (5)

Die neuesten NMR-Daten für Isoschaftosid (5) konnten in Literatur [126] gefunden werden. Die darin gemachten Angaben zu den Verschiebungen der Signale im ^{13}C -Spektrum stimmen mit den gemessenen Werten überein.

Jedoch sind große Abweichungen der Verschiebungen der Protonensignale aus dem ^1H -NMR-Spektrum im Vergleich zur oben genannten Quelle zu verzeichnen. Die Recherche in älterer Literatur nach vollständigen ^1H -NMR-Daten für diese Verbindung blieb erfolglos. Darin sind lediglich Angaben zu Verschiebungen der Protonensignale des Apigeningrundkörpers sowie des Protons an den anomeren Kohlenstoffatomen der Zucker enthalten [126] [127] [128].

Aufgrund eigener NMR-Messungen war das komplette ^1H -Spektrum von Vitexin (3) bekannt. Vitexin (3) (Abb. 70) ist strukturell dem Isoschaftosid (5) (Abb. 74) sehr ähnlich.

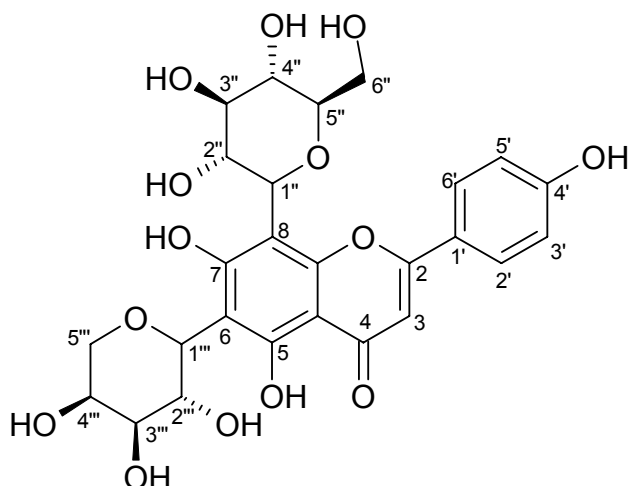


Abb. 74: Isoschaftosid (5)

Die Verbindungen unterscheiden sich nur an der C-6-Position, an der im Vitexin statt des Zuckers lediglich ein Proton gebunden ist. Damit unterliegt die in beiden Substanzen an C-8 gebundene Glukose in beiden Fällen derselben chemischen Umgebung. Somit sollten auch in den unter gleichen Bedingungen gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden Verbindungen die Verschiebungen der Protonensignale gleich sein und das gleiche Kopplungsmuster aufweisen.

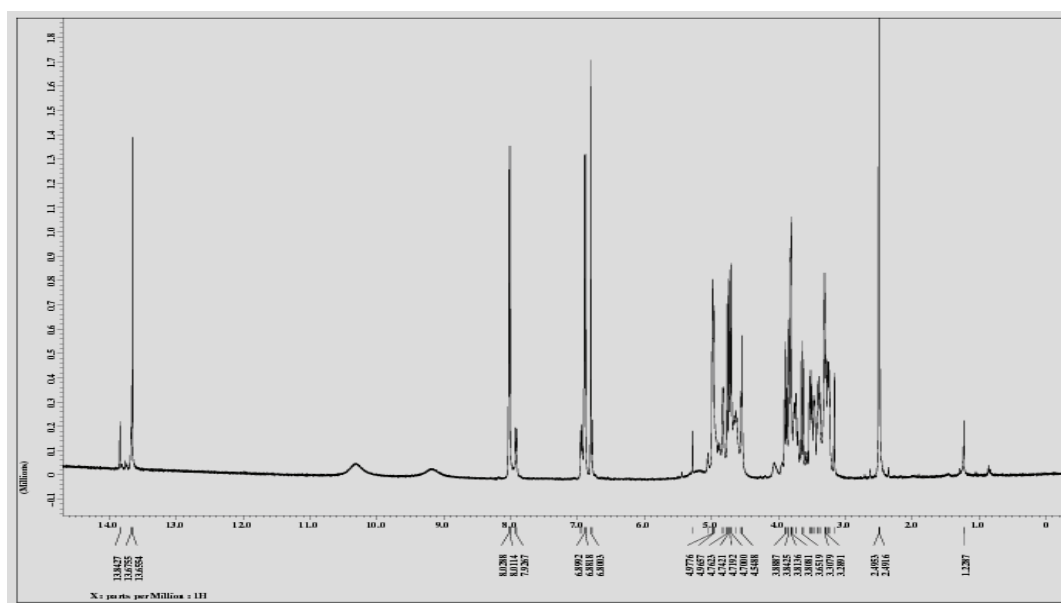


Abb. 75: Darstellung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Isoschaftosid (5)

Über einen Vergleich der beiden Spektren konnte diese These bestätigt werden (Abb. 75 und Abb. 76 zeigen das Protonenspektrum von Isoschaftosid (**5**); Abb. 77 das von Vitexin (**3**)).

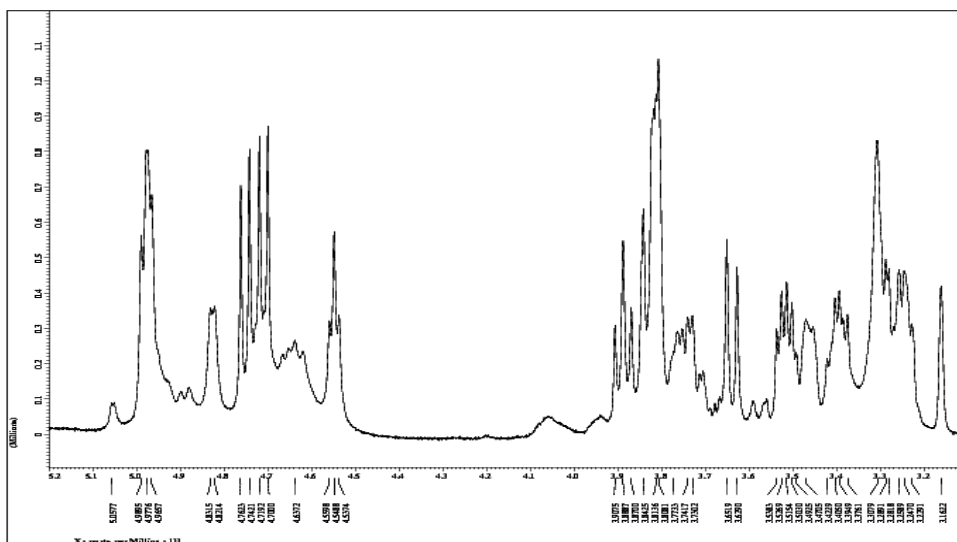


Abb. 76: Ausschnitt des Bereichs der Zuckersignale aus dem in Abb. 75 gezeigten ^1H -NMR-Spektrum

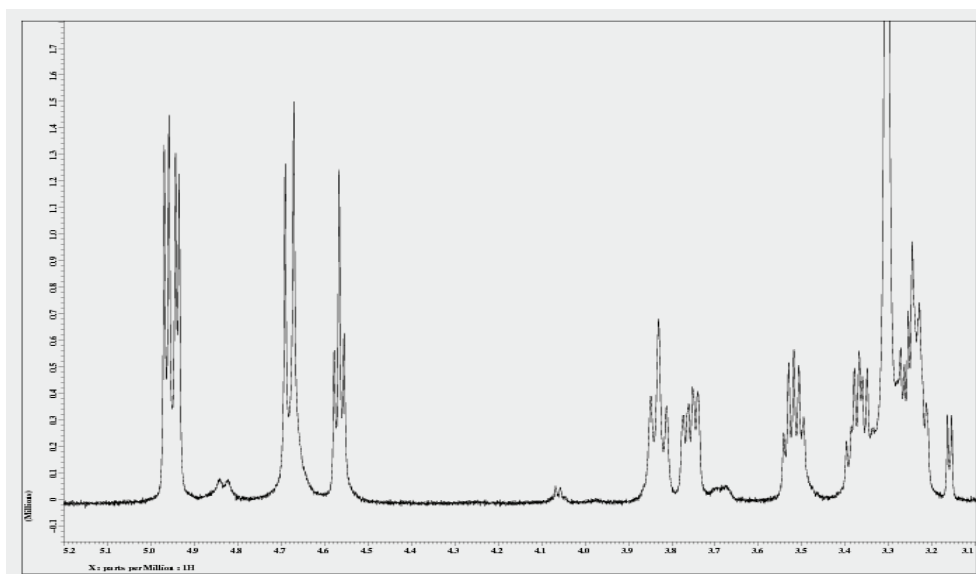


Abb. 77: Ausschnitt des Zuckersignalsbereichs aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Vitexin (**3**)

Die verbliebenen Signale im ^1H -Spektrum von Isoschaftosid sind somit der α -L-Arabinose zuzuordnen. Die Zuordnung der Signale konnte durch Aufnahme eines

HMQC-Spektrums bestätigt werden. Die eindeutige Identifizierung der Zucker erfolgte über die Kopplungskonstanten, wobei eine Kopplungskonstante von ${}^3J = 7 - 12$ Hz für eine axial-axiale Anordnung der Protonen zueinander und eine Kopplungskonstante von ${}^3J = 2 - 5$ Hz für eine axial-equatoriale oder equatoriale-equatoriale Anordnung steht. Die bisher bekannten Verschiebungen der Protonen im ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum müssen demnach korrigiert werden. Zusätzlich konnten durch die erhaltenen Spektren die Daten um die Angabe von Kopplungskonstanten erweitert werden (siehe Substanzverzeichnis, Abschnitt 9.5.5).

6.2 Bearbeitung des Trockenextraktes aus *Solanum dulcamara* L.

Unter Rühren wurden im Ultraschallbad 20 g des Trockenextraktes (siehe Abschnitt 9.3) mehrfach mit Wasser ausgezogen. Die nach Zentrifugation vereinigten, klaren, hellbraunen Überstände wurden wiederholt mit einem 1:1-Gemisch aus Hexan und Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase färbte sich dabei grün. Nachdem die organische Phase abgetrennt war, wurde der pH-Wert der verbliebenen wässrigen Phase mit Kaliumcarbonat auf 9,5 eingestellt. Die nun basische Wasserphase wurde erneut einer mehrfachen Ausschüttelung unterzogen. Als organische Komponente diente hierbei eine 2:1-Mischung aus Chloroform und Ethanol. Bei Kontakt der wässrigen mit der organischen Phase entstand eine Trübung, die jedoch mit steigender Anzahl vollzogener Ausschüttelungsvorgänge geringer wurde. Die organische Phase färbte sich gelb. Die Ausschüttelung wurde so oft vorgenommen, bis die organische Phase nur noch eine leichte Gelbfärbung annahm.

Da die Pflanze zu den alkaloidhaltigen Drogen zählt [100], wurden sowohl die nach dieser Ausschüttelung verbliebene wässrige, als auch die chloroformhaltige Phase mit Dragendorff-Reagenz auf die Anwesenheit von Alkaloiden überprüft. Beide Phasen erbrachten ein positives Ergebnis. Deshalb sollte die wässrige Phase weiter in einen Dragendorff-positiven und einen Dragendorff-negativen Anteil fraktioniert werden. Dazu wurde die wässrige Phase mehrfach mit Methanol versetzt. Es entstand ein Niederschlag, der abfiltriert und anschließend wieder in Wasser gelöst wurde. Die verbliebene wässrige Phase zeigte im Gegensatz zum Niederschlag keine positive Dragendorff-Reaktion mehr.

Der anfangs in Wasser unlösliche Anteil des Trockenextraktes wurde wiederholt mit Methanol ausgezogen. Nach Abzentrifugieren der folglich in Methanol und Wasser unlöslichen Bestandteile des Extraktes wurde der braungrüne Überstand dekantiert. Dieser Überstand wird im Folgenden als Methanol-löslicher Anteil bezeichnet. Abb. 78 gibt einen Überblick über die oben beschriebene Fraktionierung.

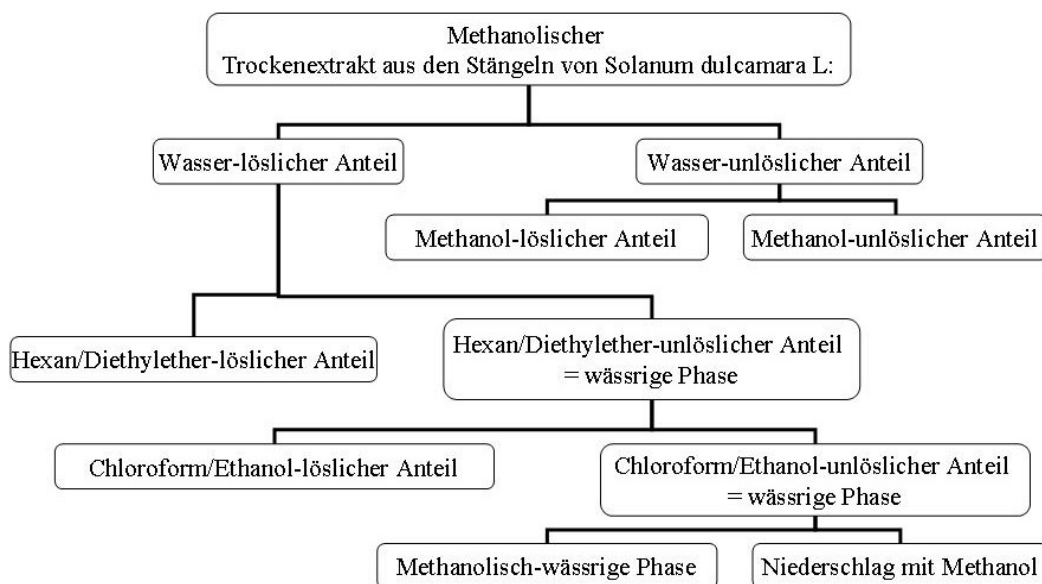


Abb. 78: Fraktionierung des Trockenextraktes aus Solanum dulcamara L.

Die Hexan-Diethylether-Phase, die Chloroform-Ethanol-Phase, der Methanol-lösliche Anteil, der sowohl in Wasser als auch in Methanol unlösliche Anteil des Extraktes, der mit Methanol erhaltene und in Wasser lösliche Niederschlag sowie die verbliebene methanolisch-wässrige Phase wurden bis zur vollständigen Trockne eingengt und gewogen (Abb. 79).

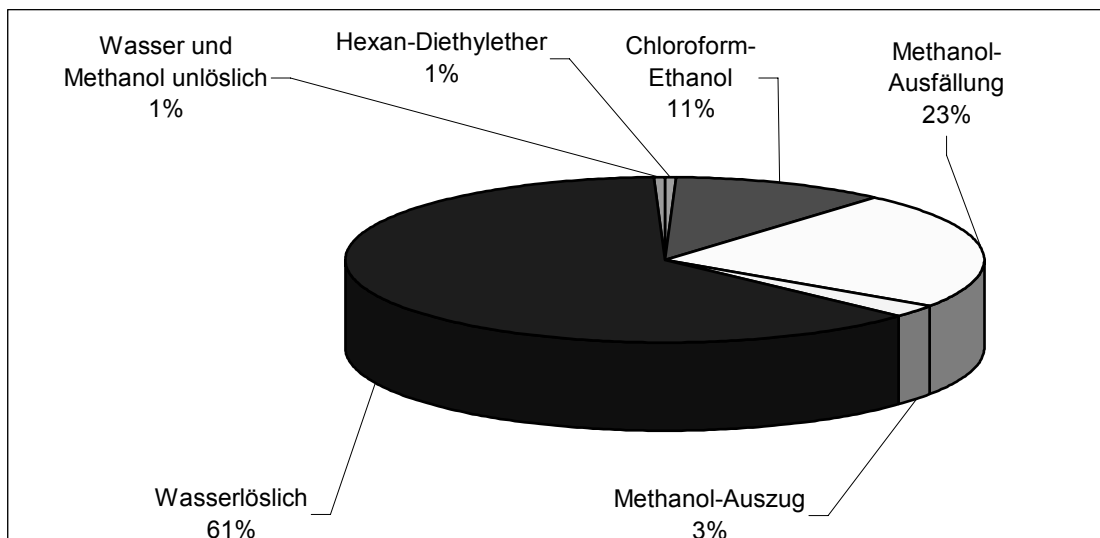


Abb. 79: Prozentuale Anteile der aus dem *Solanum dulcamara* L.-Trockenextrakt gewonnenen Fraktionen

Die so gewonnenen Fraktionen des Trockenextraktes aus *Solanum dulcamara* L. wurden in TGT-Assay-Puffer (siehe Abschnitt 9.1.1.2, PL 02), teilweise wegen schlechter Löslichkeit unter Anwendung von DMSO, gelöst und dem Ligandenfischen unterworfen (5.2.2.3, Bedingungen siehe Abschnitt 9.1.1.7.4, Methode 2). Insbesondere die Hexan/Diethyletherfraktion sowie die Chloroform/Ethanolfraktion erschienen viel versprechend, da hier durch die Fraktionierung Anreicherungen von Substanzen im Bereich der Retentionszeit der bereits aus dem Gesamtextrakt gefischten Substanz vorlagen. Diese Substanzen wiesen das gleiche UV-Spektrum auf, das auch die gesuchte Substanz aus dem Gesamtextrakt vorwies, wie vergleichende Betrachtungen der kapillar-HPLC-analytischen Chromatogramme zeigten (Abb. 80 und Abb. 81).

Eine weitere Auftrennung der gewonnenen Fraktionen wurde nicht vorgenommen.

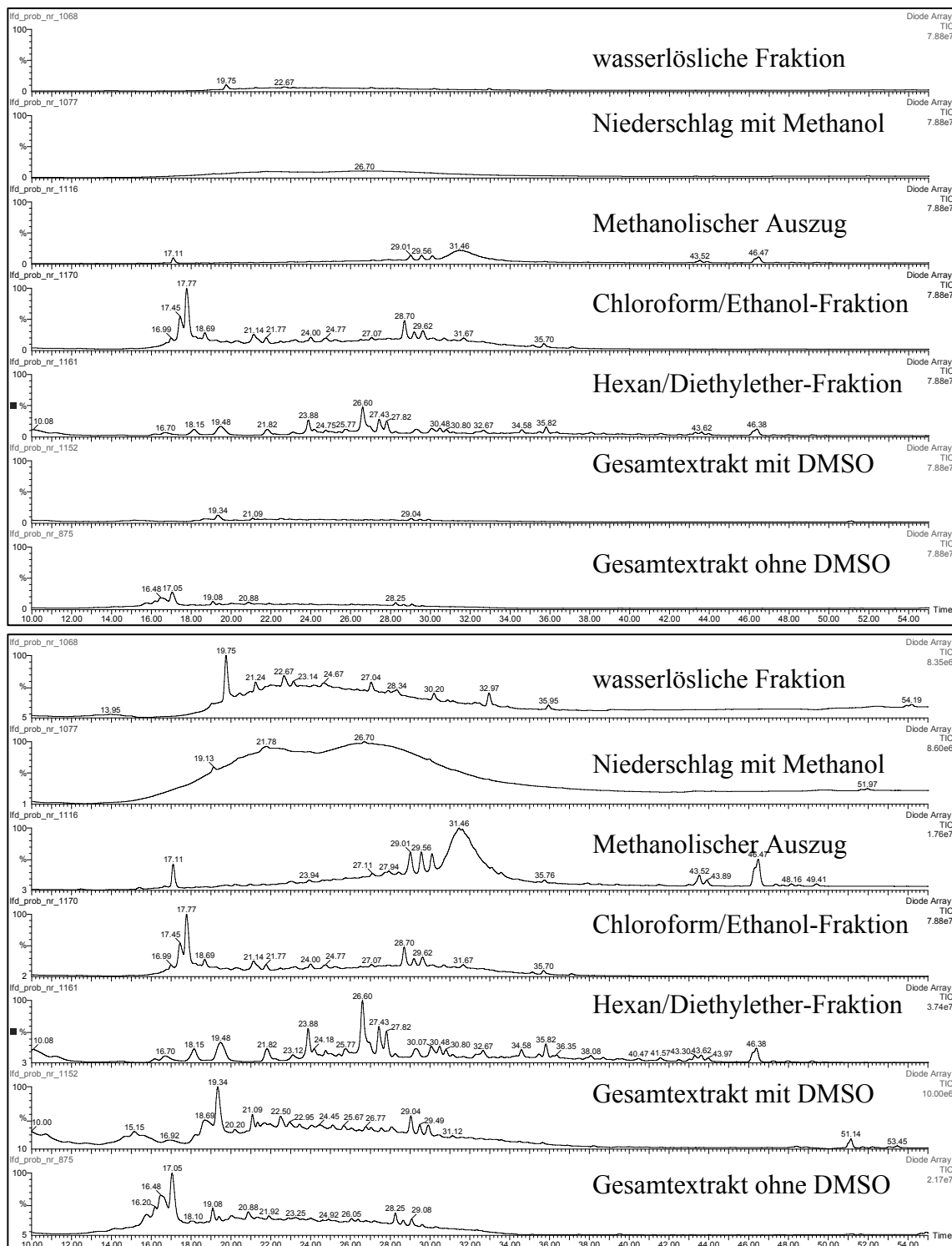


Abb. 80: Vergleich der Fraktionen aus dem Dulcamara-Trockenextrakt

Abgebildet sind die Inkubationslösungen aus den Ligandenfischversuchen.

Obere Abbildung: Darstellung der Chromatogramme in gleicher Vergrößerung.

Untere Abbildung: Darstellung der Chromatogramme in jeweils größtmöglicher Darstellung.

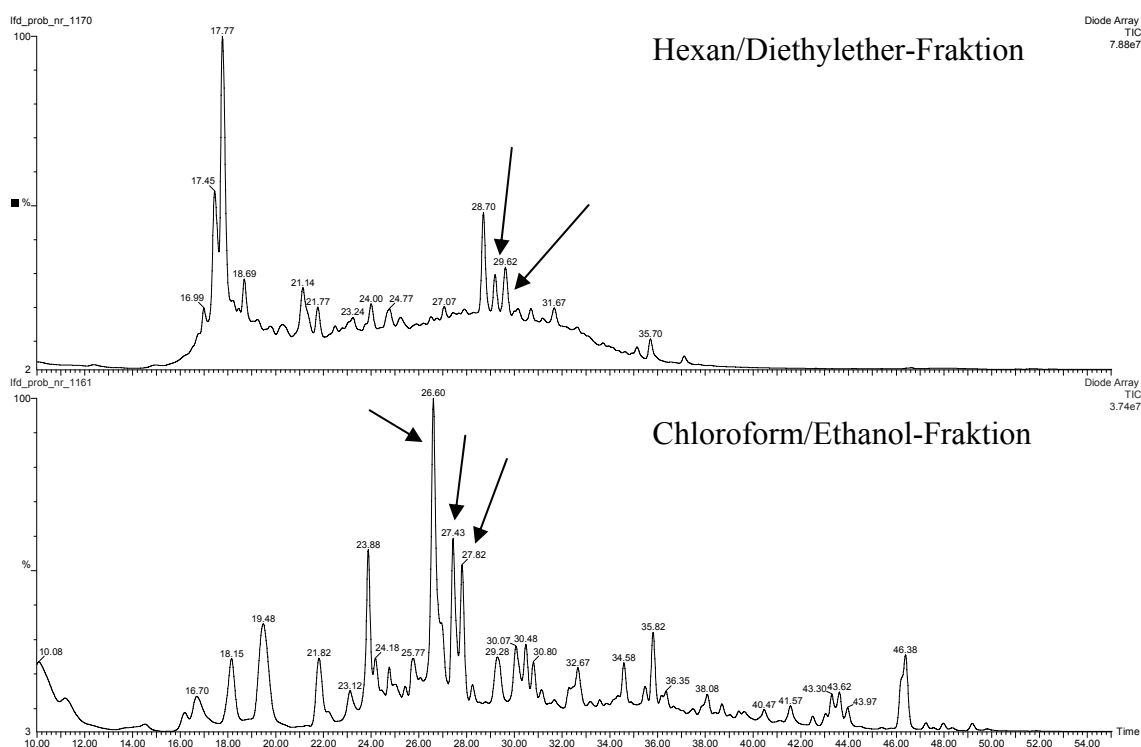


Abb. 81: Chromatogramme von zwei Dulcamarafraktionen

Abgebildet sind die Chromatogramme der Inkubationslösungen des Ligandenfischens (5.2.2.3). Die mit Pfeilen markierten Peaks entsprechen Substanzen mit dem gleichen UV-Spektrum, wie die bereits aus dem Gesamtextrakt gefischte Substanz im relevanten Retentionszeitenbereich.

6.3 Herstellung selektiver Extrakte aus *Quebracho cortex* im präparativen Maßstab

Mit dem Ligandenfischen konnte eine Bindung von Substanzen aus dem in analytischem Maßstab hergestellten methanolischen und dem methanolisch-wässrigen Extrakt an das Target IGF-1-RTK festgestellt werden (siehe Abschnitt 5.3.4). Deshalb sollte das im Abschnitt 5.3.4 beschriebene Verfahren der selektiven Extraktion in einem für den präparativen Maßstab modifizierten Aufbau angewendet werden, um die wirksamen Substanzen in für eine Strukturaufklärung ausreichenden Mengen isolieren zu können.

Dazu wurde die geschnittene Rinde mit Hilfe einer handelsüblichen Kaffeemühle auf feinsten Stufe gemahlen und anschließend in Portionen von je ca. 500 Gramm in je ca. 1,5 Litern n-Hexan unter Eiskühlung mit einem Ultra-Turrax weiter zerkleinert. Der Zerkleinerungsgrad wurde mikroskopisch überprüft. Die erhaltene Suspension wurde dann in ein beidseitig mit Stahlfritten verschlossenes Stahlchromatographierrohr gefüllt.

Die anschließend durchgeführte Durchflussextraktion erfolgte unter Zuhilfenahme einer HPLC-Pumpe mit Lösungsmitteln steigender Polarität. Mit n-Hexan, Dichlormethan, Methanol, einem 1:1 Methanol-Wasser-Gemisch und schließlich Wasser wurde in dieser Reihenfolge jeweils erschöpfend extrahiert und die so gewonnenen Extrakte bis zur Trockne eingeengt (genaue Angaben zur Extraktion befinden sich im experimentellen Teil in Abschnitt 9.2.2.2).

Dieses preisgünstige und schnelle Verfahren zur Gewinnung von größeren Extraktmengen wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch entwickelt und mehrfach erfolgreich angewendet [101] [102] [103]. Die Kosten der Extraktion mit diesem Verfahren werden vor allem durch den niedrigen Lösungsmittelverbrauch gering gehalten, da bei dieser Durchflussextraktion das bereits abgezogene Lösungsmittel wiederverwendet werden kann. Durch Anwendung dieses äußerst schonenden Extraktionsverfahrens konnte eine Belastung der Inhaltsstoffe durch Temperaturerhöhung sowie durch direkte Licht- und Sauerstoffeinwirkung weitestgehend vermieden werden. Die somit in größerem Maßstab gewonnenen und durch die selektive Extraktion nach Polarität vorsortierten Inhaltsstoffe erlaubten nun eine schnelle chromatographische Isolierung der im Bindungsassay (Ligandenfischen) wirksamen Substanzen.

Abb. 82 zeigt die in Bezug auf die jeweils eingesetzte Lösungsmittelmenge erhaltenen Extraktmengen, die mit der selektiven Extraktion der Quebrachorinde im präparativen Maßstab erhalten wurden.

Ein Vergleich der Abb. 42 (Abschnitt 5.3.4, Seite 82) und Abb. 82 zeigt, dass die im analytischen Maßstab durchgeführte Extraktion nicht erschöpfend war. Dies führte zu der in den Grafiken erkennbaren Verschiebung der Ausbeuten mit den Extraktionsmitteln Dichlormethan und Methanol. Für die selektive Extraktion im präparativen Maßstab musste die dazu benötigte Menge an Rindendroge neu beschafft werden. Der damit in dieser frischeren Droge höhere Wassergehalt kann zur Verschiebung des Inhaltstoffspektrums der selektiven Extrakte beigetragen haben.

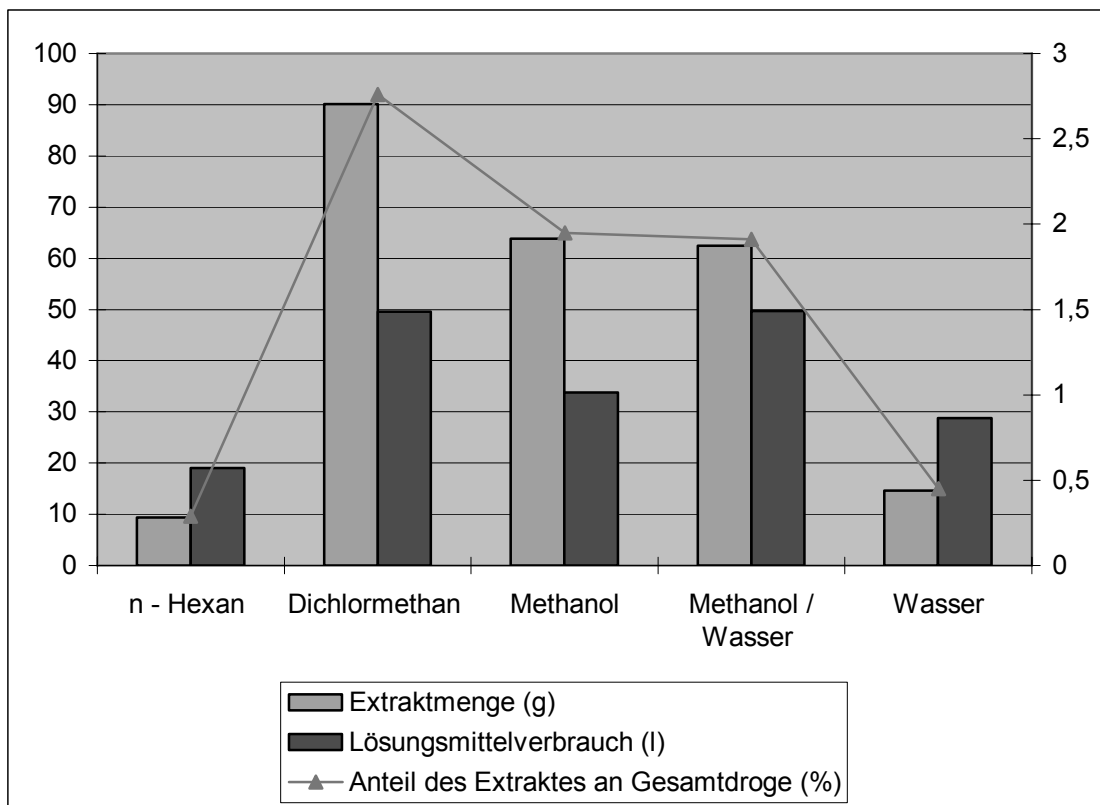


Abb. 82: Selektive Extraktion aus Quebracho cortex im präparativen Maßstab

Die in Prozent angegebenen Werte beziehen sich auf den jeweiligen Massenanteil in Bezug auf die eingesetzte Masse an Quebrachorinde.

6.4 Bearbeitung der selektiven Extrakte aus Quebracho cortex

Wie schon im vorangegangenen Abschnitt festgestellt, trat bei der Herstellung der selektiven Extrakte im präparativen Maßstab im Vergleich zu den in analytischem Maßstab hergestellten Extrakten aus der Quebrachorinde eine Verschiebung der Ausbeuten auf. Mit dem präparativen Verfahren konnte eine größere Menge an selektivem Dichlormethanextrakt erhalten werden. Mit dieser Verschiebung der Ausbeuten ging auch eine Verschiebung des Inhaltstoffspektrums einher, wie Abb. 83 zeigt. Dies zeigte sich bei Vermessung jeweils gleicher Mengen an Extrakt. Dadurch konnte direkt auf die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen in dem jeweiligen selektiven Extrakt rückgeschlossen werden.

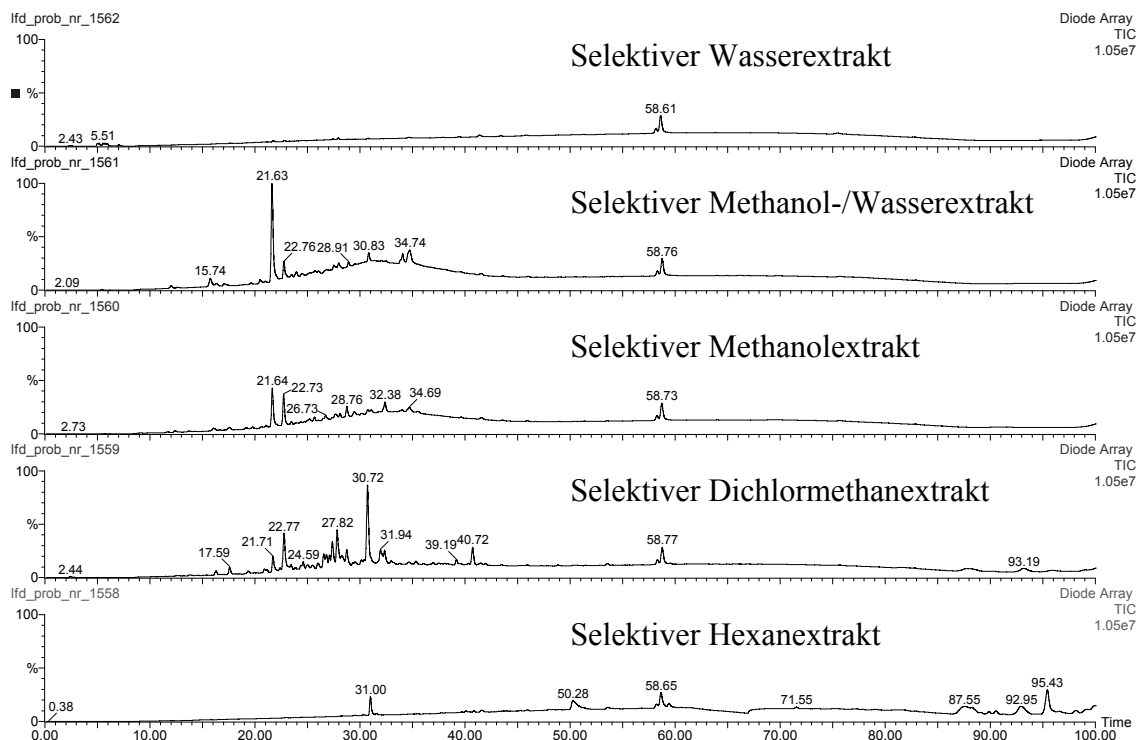


Abb. 83: Chromatogramme der selektiven Extrakte aus Quebracho cortex

Zur Vermessung diente jeweils 1 mg des Extraktes. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte unter den Bedingungen, die auch bei der Vermessung der Proben aus dem Ligandenfischen angewendet wurden. Eine besonders starke Anreicherung von Substanzen im Bereich der Retentionszeiten der aus dem Methanolextrakt des analytischen Ansatzes mit IGF-1-RTK gefischten Verbindungen ist hier im Gegensatz zur in analytischem Maßstab durchgeführten Extraktgewinnung beim Dichlormethanextrakt zu erkennen.

Durch die kapillarchromatographische Vermessung der Extrakte aus dem präparativen Maßstab zeigte sich, dass die gefischten und zu isolierenden Substanzen im selektiven Dichlormethanextrakt zu finden waren (Abb. 84). Die Gründe dafür wurden im vorangegangenen Abschnitt erläutert. Die Identifizierung der relevanten Substanzen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der Peaks sowie der UV-Spektren der Substanzen (Abb. 85) mit denen, die aus den Ligandenfischversuchen erhalten worden waren (Abschnitt 5.3.4).

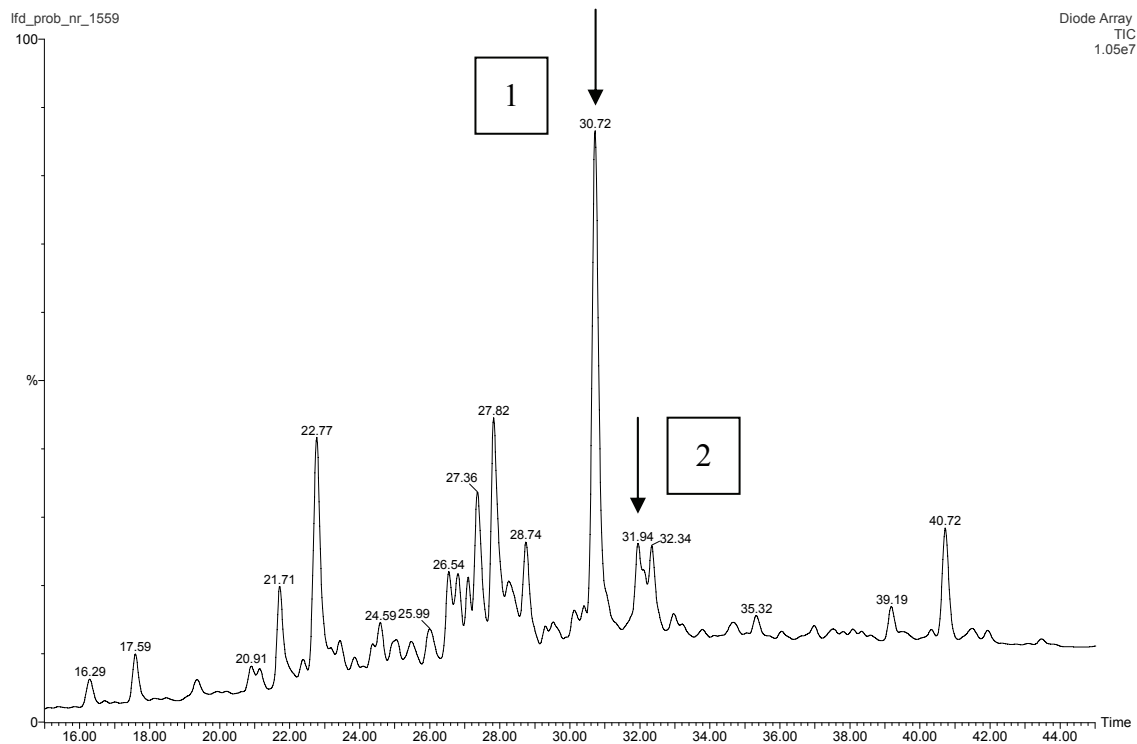


Abb. 84: Vergrößerter Ausschnitt aus dem in Abb. 83 dargestellten Chromatogramm des selektiven Dichlormethanextraktes

Mit Pfeilen sind die Peaks gekennzeichnet, die in Retentionszeit und UV-Spektrum den aus dem selektiven Methanolextrakt des analytischen Ansatzes mit IGF-1-RTK gefischten Substanzen entsprechen.

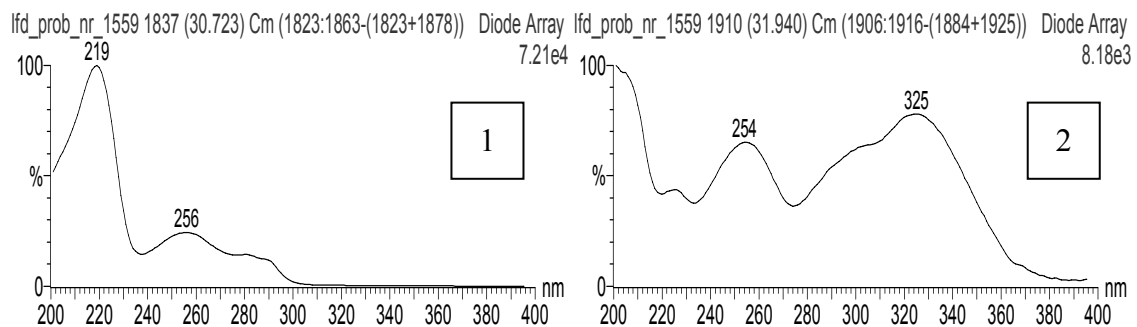


Abb. 85: UV-Spektren der in Abb. 84 gekennzeichneten Peaks

Die UV-Spektren dieser beiden Peaks sind identisch mit denen der aus dem selektiven Methanolextrakt (analytischer Maßstab) mit IGF-1-RTK gefischten Verbindungen (siehe Abb. 49 und Abb. 52).

Aufgrund dieser Messergebnisse mussten nun aus dem selektiven Dichlormethanextrakt die im Ligandenfischen an IGF-1-RTK wirksamen Substanzen isoliert werden. Dabei sollten verschiedene Trennverfahren angewendet werden, da eine Kombination unter-

schiedlicher Trennmethode, wie selektive Extraktion, Normal- und Umkehrphasenchromatographie, Niederschlagsbildungen und Ausschüttelungen, die Anzahl an Fraktionierungsschritten und damit den zeitlichen Aufwand reduziert.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der gezielten Fraktionierung des selektiven Dichlormethanextraktes aus Quebrachorinde hinsichtlich der Isolierung der gefischten Substanzen.

6.4.1 Extrographische Fraktionierung des selektiven Dichlormethanextraktes

Das Verfahren der Extrographie wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch in Anlehnung an ein von I. Halász entwickeltes Verfahren zur Fraktionierung von Erdöldestillationsrückständen [129] [130] für die Naturstoffanalytik weiterentwickelt und schon viele Jahre erfolgreich angewendet. Es dient auch hier der präparativen Gruppentrennung komplexer Stoffgemische mit breiter Polaritätsskala. Der Vorteil der Methode gegenüber vergleichbaren Verfahren besteht in der Möglichkeit, in kurzer Zeit große Probenmengen bei gleichzeitig wesentlich geringerem Lösungsmittelverbrauch trennen zu können.

6.4.1.1 Analytische Entwicklung einer Normalphasen-Gradientenextrographie

Aufgrund der recht hohen Lipophilie des zu trennenden selektiven Dichlormethanextraktes sollte zunächst eine Chromatographie auf Normalphase durchgeführt werden. Eine Trennung auf Reversed-Phase-Material erfordert eine gewisse Wasserlöslichkeit der Probe und kam daher nicht in Frage (vgl. präparative Trennung des methanolischen Extraktes aus *Passiflorae herba*, 6.1). Die Normalphasenchromatographie erlaubt außerdem den Einsatz von leicht verdampfenden organischen Lösungsmitteln, was im präparativen Maßstab einen bedeutenden Vorteil darstellt. Für die chromatographische Trennung des selektiven Dichlormethanextraktes aus *Quebracho cortex* auf Normalphase wurde das Verfahren der Extrographie angewendet.

Bei der Extrographie handelt es sich um ein Säulenchromatographieverfahren, bei dem die zu trennenden Substanzen erst nach und nach das chromatographische Trennbett erreichen. Dies wird dadurch realisiert, dass die Probe – in diesem Fall der selektive Dichlormethanextrakt – nicht wie bei der klassischen Säulenchromatographie in gelöster Form auf das chromatographische Trennbett aufgebracht wird. Der Extrakt wird viel-

mehr zunächst auf ein geeignetes Sorbens aufgezogen und dann in trockener Form der eigentlichen Chromatographie zugeführt.

Zur Beladung des Sorbens mit dem Extrakt wird dieser zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Zu der klaren Extraktlösung wird dann die fünffache Menge (des eingesetzten Extraktrockengewichtes) an Sorbens gegeben und dieser Ansatz einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Als Sorbens dient hierbei ein grobkörniges Kieselgel. Anschließend wird, bei guter Durchmischung, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer langsam entfernt, bis ein trockenes, rieselfähiges Material zurückbleibt.

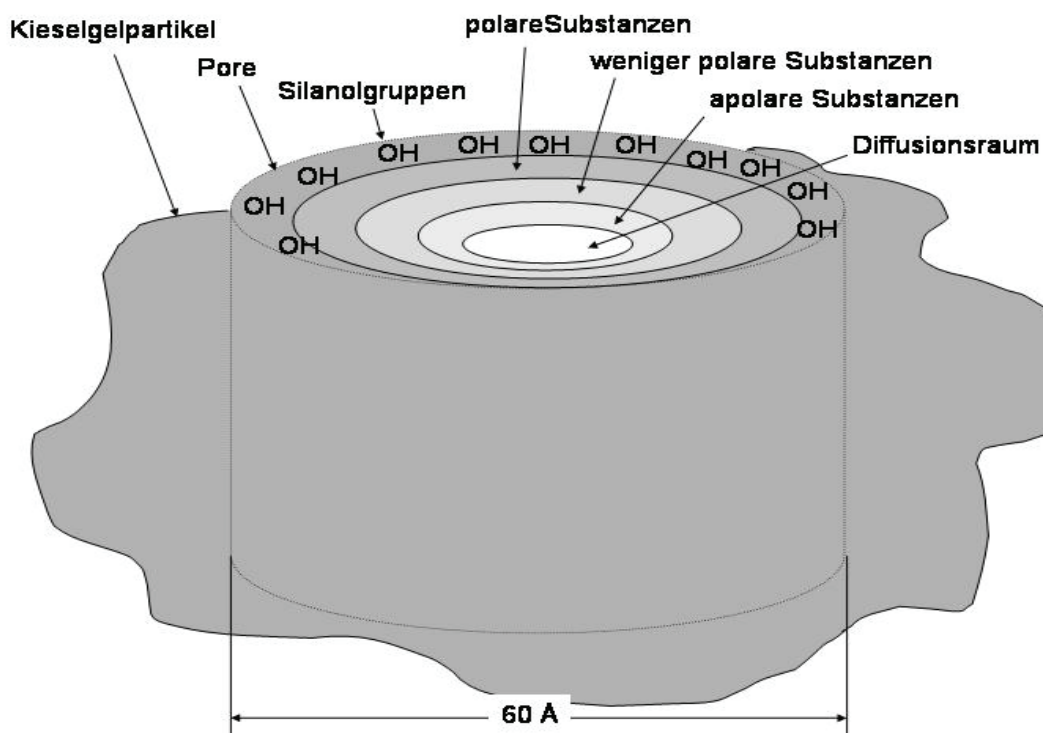


Abb. 86: Schematische Darstellung der Vorsortierung von Substanzen abhängig von ihrer Polarität beim Aufziehen eines Extraktes auf Kieselgel

Die OH-Gruppen stellen die Kieselgeloberfläche in der Pore dar, an die sich die polarsten Verbindungen aus dem Extrakt adsorptiv anlagern. Zur Porenmittle hin werden die angelagerten Substanzschichten immer apolarer. Ein verbleibender Porenhohlraum ist entscheidend für das Eindringen der Elutionsmittel.

Dabei kommt es an der Innenwandung der Kieselgelporen zu einer Vorsortierung der Probenmoleküle. Das aufgrund der Silanolgruppen an der Oberfläche polare Sorbens adsorbiert zunächst die polarsten Moleküle aus der Probe. An dieser neu entstandenen Oberfläche etwas geringerer Polarität werden nun die weniger polaren Probenmoleküle

adsorbiert, die ihrerseits wiederum noch weniger polare Substanzen aus der Probe adsorbieren. Der verbleibende Diffusionsraum einer Kieselgelpore grenzt somit an die unpolarsten Bestandteile des Extraktes (Abb. 86). Das Kieselgel mit dem aufgezogenen Extrakt wird nun in die Trennsäule vor das chromatographische Trennbett gepackt, welches aus feinem Kieselgel besteht. Durch die Vorsortierung der Probenmoleküle beginnt man nun die chromatographische Gradiententrennung sinnvollerweise mit einem lipophilen Eluenten. Dabei werden zunächst nur die lipophilen Substanzen von der Oberfläche gelöst und in dem sich anschließenden chromatographischen Trennbett aufgetrennt. Im Verlauf des Gradienten werden durch allmähliche Steigerung der Polarität des Eluenten nach und nach auch stärker polarere Probenmoleküle von der Kieselgeloberfläche abgelöst und der Chromatographie zur Verfügung gestellt. Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, große Probenmengen in einem Extraktionsdurchgang trennen zu können, ohne die stationäre Phase zu überladen, da die Probenmoleküle nicht auf einmal, sondern aufeinander folgend in Gruppen steigender Polarität ins Trennbett gelangen.

Der selektive Dichlormethanextrakt wurde zum Aufziehen auf Kieselgel in Dichlormethan gelöst. Das ausgewählte Kieselgel hatte einen mittleren Porendurchmesser von 60 Å (Merck Si 60, 63 – 200 µm). Das für die Extraktion als stationäre Phase verwendete Kieselgel besaß einen wesentlich kleineren Partikeldurchmesser bei gleichem Porendurchmesser (Macherey & Nagel Kieselgel 60, 15 – 25 µm). Die Säule wurde trocken gepackt. Durch zusätzliches Anpressen des Materials konnte ein dichtes und homogenes Trennbett erhalten werden.

Für eine selektive Abtrennung der Substanzen voneinander ist ein geeigneter Lösungsmittelgradient essentielle Voraussetzung. Das Verfahren wurde dahingehend für den selektiven Dichlormethanextrakt aus *Quebracho cortex* mit Extraktmengen von bis zu 600 mg im analytischen Maßstab optimiert. Der Lösungsmittel-, Sorbentien- und Extraktverbrauch kann dabei gering gehalten werden. Aufgrund der Lipophilie des Extraktes war für den Beginn des Gradienten ein unpolares Lösungsmittel erforderlich. Hierbei fand n-Hexan Verwendung. Als nächst polarere Komponente wurde langsam Diethylether zugemischt. Da es sich bei *Quebracho cortex* um eine Alkaloiddroge handelt, wurde jedem Eluenten ein Anteil von 0,1 % Diethylamin (DEA) zugesetzt, um eine Protonierung dieser basischen Komponenten des Extraktes während der Trennung zu

verhindern. Daraus resultierte eine Erhöhung der Peakschärfe und damit auch der Auflösung. Diethylether sollte wegen der ähnlichen Polaritätsindizes anstelle von Dichlormethan und aufgrund seines basischen Charakters die Bedingungen hinsichtlich eines optimalen pH-Wertes für die Trennung unterstützen. Außerdem würde Dichlormethan aufgrund seines ausgeprägten Dipolcharakters mit dem freien Elektronenpaar des Diethylamins in Wechselwirkung treten und somit die benötigte Basizität des Amins herabsetzen. Dies ist dagegen beim Diethylether nicht der Fall, jedoch sind bei dessen Verwendung im präparativen Maßstab besondere Maßnahmen bezüglich der Sicherheit zu treffen. Langsames Zumischen des polaren Methanols provozierte die Elution der im Extrakt enthaltenen gefischten Verbindungen. Der Gradient wurde gerade in diesem Abschnitt der Trennung (zwischen 250 und 700 Minuten) durch mehrere Versuche optimiert (Abb. 87).

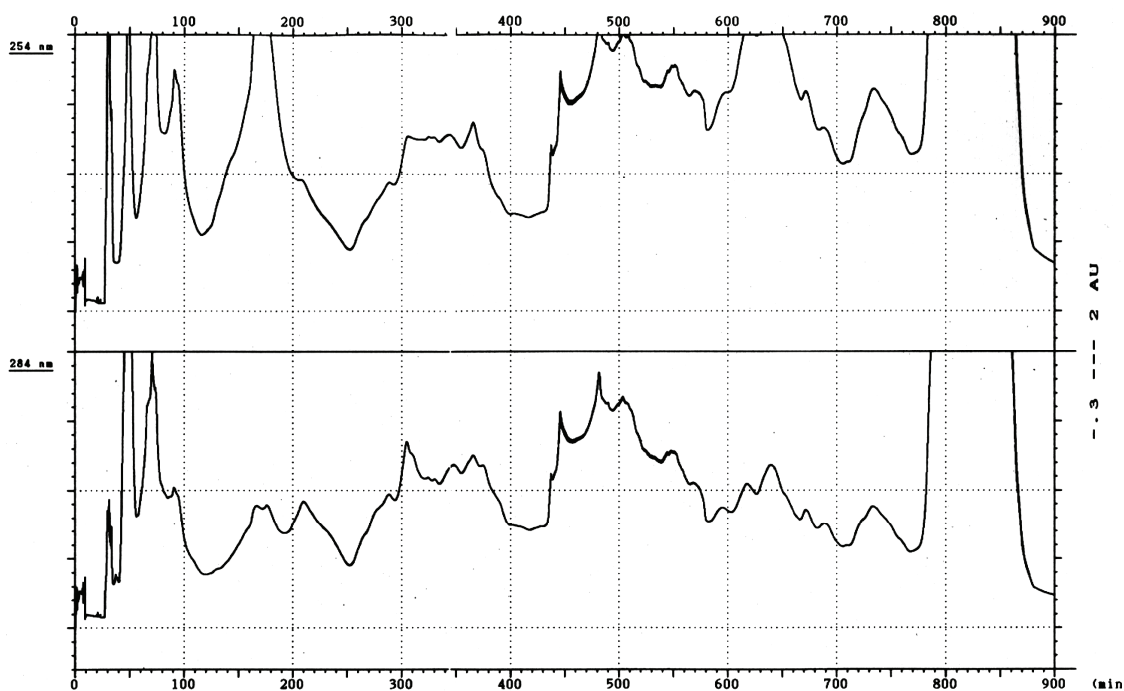


Abb. 87: Chromatogramm der optimierten Extrographie in analytischem Maßstab

Abgebildet ist dieselbe Trennung bei zwei verschiedenen Wellenlängen.

Obere Abbildung: $\lambda = 254$ nm.

Untere Abbildung: $\lambda = 284$ nm.

Zur Überprüfung der Trennung wurden während der analytischen Extrographieversuche Fraktionen im 10-Minuten-Rhythmus gesammelt, das Lösungsmittel abgezogen, die

Fraktionen in mobiler Phase wieder gelöst und kapillarchromatographisch auf Vorhandensein der relevanten Peaks überprüft. Durch den im Verlauf der Trennung auf 100 % steigenden Methanolanteil im Eluenten und schließlich mit der Verwendung von Wasser zum Ende der Trennung konnten auch sehr stark an das Kieselgel adsorbierte Verbindungen eluiert werden.

Während in der Reversed-Phase-Chromatographie meist Gradienten mit linearer Veränderung der Eluentenzusammensetzung angewandt werden, hat sich bei der Normalphasenchromatographie ein konkaver, nicht-linearer Gradient bewährt. Dabei wird der stärkere Eluent am Anfang nur langsam zugemischt, so dass die im Anfangsbereich der Säule unter relativ unpolaren Bedingungen eben gerade getrennten Substanzen nicht vor Verlassen des Trennbettes durch eine nachfolgend zu polare mobile Phase wieder zu einer Fraktion zusammengeschoben werden.

6.4.1.2 Präparative Durchführung der Gradientenextrographie

Das Upscaling der analytischen Extrographie in den präparativen Maßstab erforderte eine Anpassung der Säulendimension und der Flussrate des Eluenten bei ansonsten gleichen, im analytischen Maßstab optimierten Parametern.

Als Säule diente eine mit Kieselgel und aufgezogenem Extrakt befüllte Edelstahlkartusche (Merck Prepar 40 x 10 cm). Die Füllung wurde mit Hilfe eines Presswerkzeuges, einer Ansaugvorrichtung und eines variablen Säulenkopfes verdichtet. Da sich die Probenzone am unteren Ende der Säule befand, wurden die Eluenten von unten nach oben durch das Trennbett gepumpt, wodurch gleichzeitig Lufteinschlüsse vermieden werden. Die Flussrate wurde entsprechend der Säulendimension auf 100 ml/min angepasst. Die Fraktionen der präparativen Extrographie wurden bis zur Trockne eingengt und gewogen (Abb. 88).

Aufgrund der Verwendung von solch großen Mengen an Diethylether, wie sie hier benötigt wurden, war wegen der auftretenden Reibung und dem niedrigen Flammpunkt des Ethers aus Sicherheitsgründen eine Erdung aller verwendeten Gerätschaften aus Metall (wie Vorratsbehältnisse, Pumpenköpfe, Kapillaren und Chromatographiesäule) zwingend notwendig.

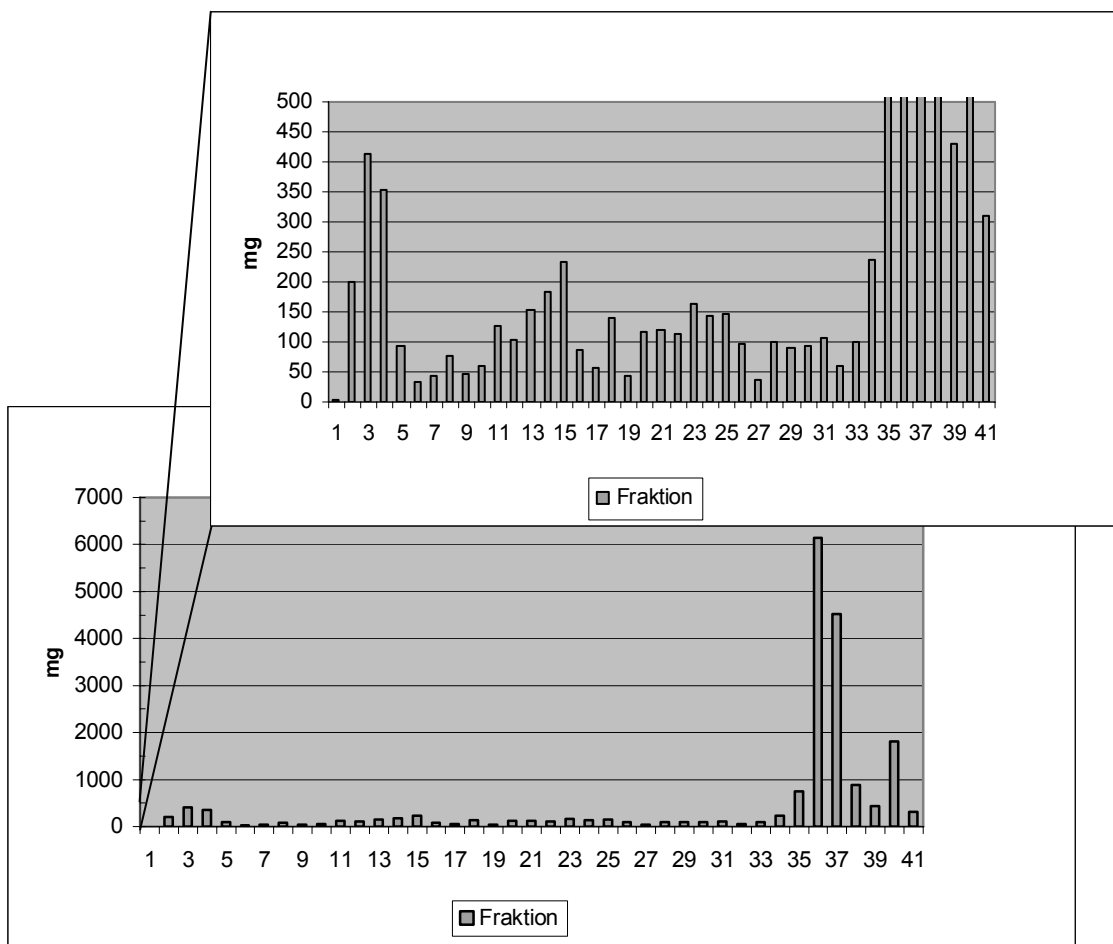


Abb. 88: Darstellung der Massenverteilung des selektiven Dichlormethanextraktes auf die einzelnen Fraktionen nach der präparativen Extrographie

Die obere Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der unteren Abbildung, um die Unterschiede in der Massenverteilung zwischen den Fraktionen 1 – 34 deutlich zu machen.

Die Grafiken zeigen, dass sich die Hauptmasse des Extraktes immer noch auf wenige Fraktionen konzentriert (vor allem auf die Fraktionen 36 und 37). Jedoch konnte durch die Extrographie mit nur einem Trennschritt eine sehr genaue Auftrennung des die gefischten Verbindungen enthaltenen Anteils des Extraktes erzielt werden. Die relevanten Fraktionen wurden dabei in einer für eine Nachtrennung und Strukturaufklärung der gefischten Substanz ausreichenden Menge erhalten. Zudem wiesen diese Fraktionen bezüglich der zu isolierenden Verbindung bereits eine hohe Reinheit auf.

6.4.2 Analytik der erhaltenen Extrographiefraktionen

Die Fraktionen 12 – 18 und 33 – 35 konnten durch Vergleich ihrer Kapillarchromatogramme mit den Chromatogrammen aus den Fischversuchen als diejenigen identifi-

ziert werden, die die an IGF-1-RTK bindenden Substanzen enthielten (Abb. 89 und Abb. 90). Die Fraktionen 14 – 16 sowie 34 zeichneten sich schon zu diesem Zeitpunkt durch eine hohe Reinheit bezüglich dieser Substanzen aus. In den Fraktionen 14 – 16 kristallisierte die später als Aspidospermin (6) identifizierte Substanz schon beim Abziehen des Lösungsmittels aus.

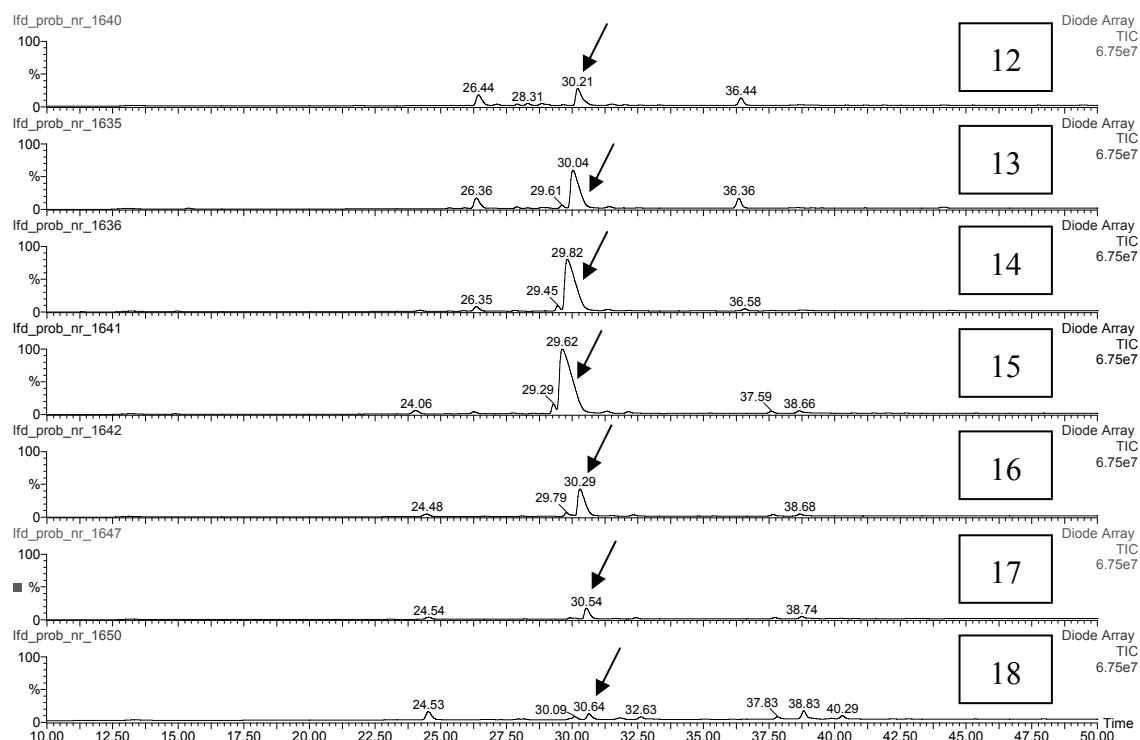


Abb. 89: Chromatogramme der Extrographiefractionen 12 – 18

Die Chromatogramme wurden unter denselben Bedingungen wie die Proben aus dem Ligan denfischen mit IGF-1-RTK vermessen. Die mit Pfeilen markierten Peaks besitzen die gleiche Retentionszeit und dasselbe UV-Spektrum wie eine der mit IGF-1-RTK gefischten Verbindungen. Die Fraktionen 14, 15 und 16 zeichnen sich bezüglich dieser Verbindung als besonders rein aus und werden deshalb zur weiteren Bearbeitung herangezogen.

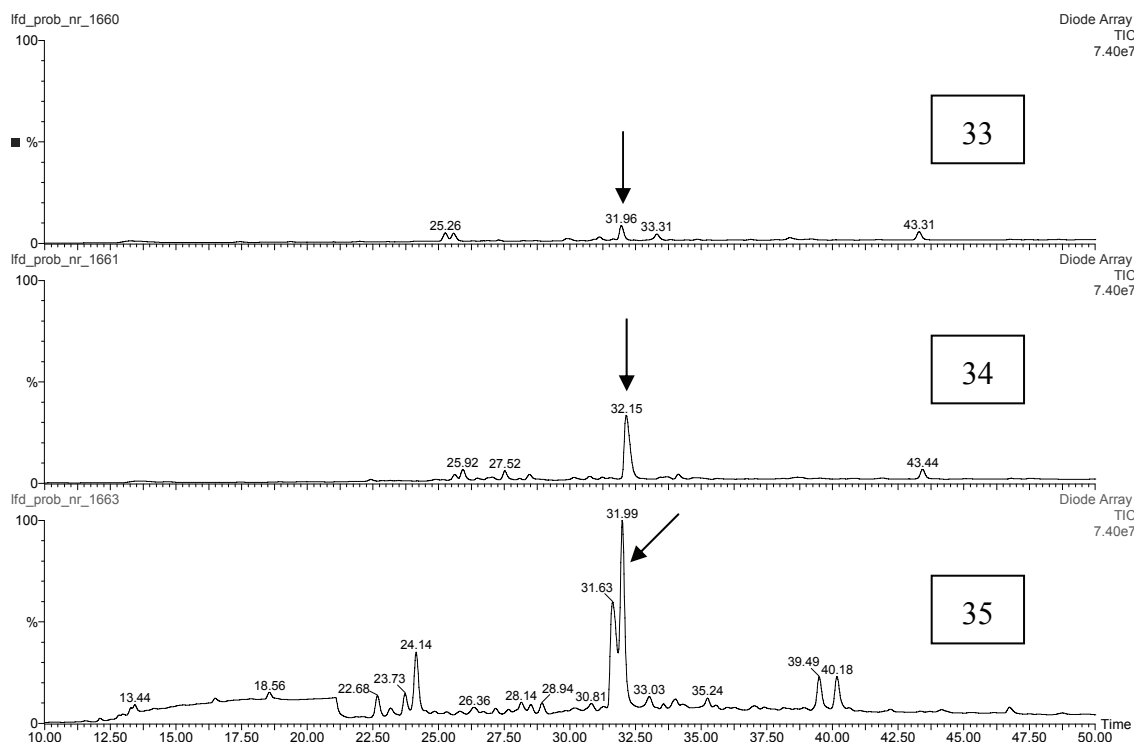


Abb. 90: Chromatogramme der Extrographiefractionen 33 – 35

Die Chromatogramme wurden unter denselben Bedingungen wie die Proben aus dem Ligandenfischen mit IGF-1-RTK erstellt. Die mit Pfeilen markierten Peaks besitzen die gleiche Retentionszeit und dasselbe UV-Spektrum wie eine der mit IGF-1-RTK gefischten Verbindungen. Die Fraktion 34 zeichnet sich bezüglich dieser Verbindung als besonders rein aus und wurde deshalb zur weiteren Bearbeitung herangezogen.

Bei Betrachtung der Kapillarchromatogramme aller weiteren Fraktionen der extrographischen Trennung zeigte sich, dass auch bei anderen Fraktionen eine starke Anreicherung einer Substanz erzielt werden konnte. Durch nur einen Trennschritt konnten demnach mehrere Fraktionen mit besonderer Reinheit im Bezug auf die jeweilige Hauptkomponente gewonnen werden.

6.4.3 Isolierung der durch Ligandenfischen gefundenen Substanzen aus den Extrographiefractionen

Da die Fraktionen 14 – 16 bezüglich der aus dem selektiven Methanolextrakt (analytischer Maßstab) gefischten Substanz eine hohe Reinheit aufwiesen, wurden sie vereinigt und zusammen einer weitergehenden Aufreinigung unterzogen.

Von den drei Fraktionen 33, 34 und 35 weist Fraktion 34 die höchste Reinheit bezüglich der zu isolierenden Verbindung auf. Daher wurde nur diese Fraktion in weiteren Schritten bearbeitet.

6.4.3.1 Bearbeitung der Fraktionen 14 – 16

Bei Lösungsversuchen der vereinigten Fraktionen konnte eine vollständige Löslichkeit der Probe in Dichlormethan, aber nur eine unvollständige in Acetonitril beobachtet werden. Deshalb wurde die gesamte Probe der Fraktionen 14 – 16 in einer geringen Menge Acetonitril gelöst. Dabei bildete sich ein dunkelbrauner Überstand über in Acetonitril nicht löslichen Bestandteilen. Der nach Filtration erhaltene Rückstand war von beiger Farbe. Dieser wurde mit Dichlormethan von der Filteroberfläche gespült und das Lösungsmittel anschließend am Rotavapor entfernt. Dabei bildeten sich Kristalle der gleichen Form, wie sie schon nach der Extrographie in den Fraktionen 14 – 16 beobachtet werden konnten. Dem Filtrat wurde ebenfalls das Lösungsmittel entzogen. Rückstand und Filtrat wurden in mobiler Phase gelöst und kapillarchromatographisch vermessen. Dabei zeigte sich, dass der Rückstand fast keine Verunreinigungen mehr enthielt. Der Peak, der der Hauptschubstanz entsprach, konnte im Filtrat ebenfalls identifiziert werden. Jedoch ist hier vor allem eine Anreicherung der in den Fraktionen 14 – 16 in geringen Mengen enthaltenen Substanzen zu erkennen (Abb. 91).

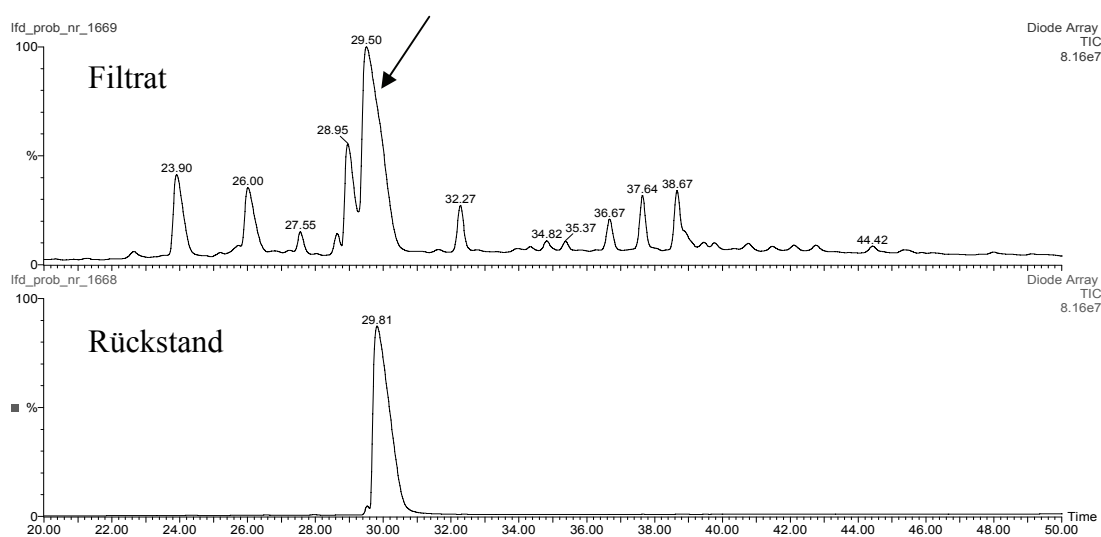


Abb. 91: Chromatogramme des Filtrats und des Rückstandes der Fraktionen 14 – 16 der präparativen Extrographie

Die Proben wurden kapillarchromatographisch auf ihre Reinheit überprüft. Das Chromatogramm des Filtrates zeigt, dass die interessierende Substanz nicht vollständig abgetrennt werden konnte (mit Pfeil gekennzeichnete Peak).

Die erste Trennung, die die unterschiedlichen Löslichkeiten von Haupt- und Nebensubstanzen ausgenutzt hatte, war also unvollständig. Ein gewisser Anteil der Hauptschub-

stanz, die später als Aspidospermin (6) (Abb. 92) identifiziert wurde, ist folglich auch in Acetonitril löslich. Um eine hohe Ausbeute des in diesen Fraktionen enthaltenen Aspidospermins (6) zu erhalten, wurde das vom Lösungsmittel befreite Filtrat erneut mit Acetonitril versetzt und der entstandene Rückstand abfiltriert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt, bis auch nach Stehenlassen über zehn Stunden keine nennenswerten in Acetonitril unlöslichen Bestandteile mehr zu sehen waren. Die Rückstände wurden vereinigt und gewogen.

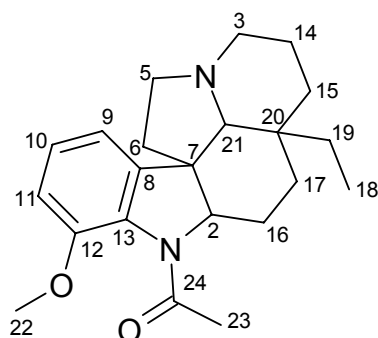


Abb. 92: Aspidospermin (6)

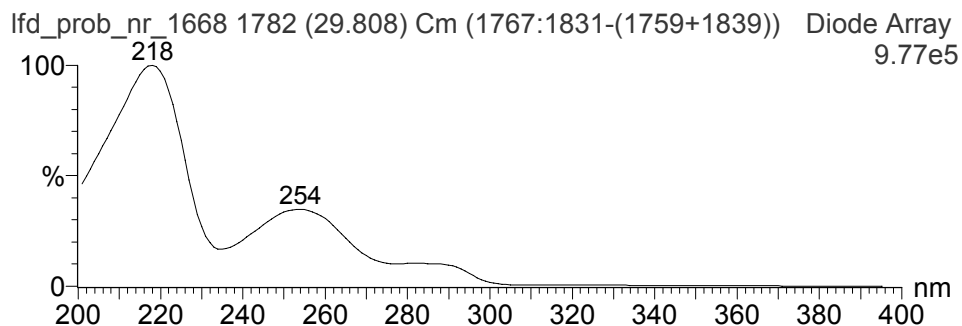


Abb. 93: UV-Spektrum von Aspidospermin (6) aus dem in Acetonitril unlöslichen Rückstand der Fraktionen 14 - 16

Das UV-Spektrum der Substanz wurde im Rahmen der kapillarchromatographischen Vermessung von Filtrat und Rückstand (siehe Abb. 91) bei einer Fließmittelzusammensetzung von Acetonitril-Wasser-TFA = 39,5:60,5:0,05 erhalten.

Das Aussehen der erhaltenen Aspidosperminprobe ließ noch eine geringfügige Menge an Verunreinigungen vermuten, die eventuell später bei der Strukturaufklärung stören könnten. Deshalb wurde die Probe einer fraktionierenden Kristallisation aus Acetonitril und Dichlormethan über zehn Tage unterzogen. Das gegenüber dem Acetonitril auf-

grund seines geringeren Dampfdruckes und Siedepunktes sehr leicht flüchtige Dichlormethan verdampfte in dieser Zeit sehr langsam. Das in Acetonitril nur schwer lösliche Aspidospermin (**6**) fiel langsam in dem Maß in hellbeigen Nadeln aus, in dem der Anteil an Dichlormethan in der Lösung abnahm. Die Nadeln wurden durch Filtration abgetrennt, getrocknet und gewogen. Anhand dieser Kristalle konnte die Identität der Substanz durch $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HMQC, HMBC, MS, einschließlich hochauflösender MS und Schmelzpunktbestimmung im Vergleich mit Literaturwerten als Aspidospermin (**6**) bestimmt werden [131]. Die Ausbeute an hochreinem Aspidospermin (**6**) betrug 64 mg. Dies entspricht, bezogen auf die Menge an für die Extrographie eingesetzten selektiven Dichlormethanextrakt, 0,4 %.

6.4.3.2 Bearbeitung der Fraktion 34

Mit den Erfahrungen aus der Aufreinigung der Fraktionen 14 – 16 über unterschiedliche Löslichkeiten wurde auch hier versucht, ein ähnliches Vorgehen anzuwenden. Auch bei Fraktion 34 konnte mit Dichlormethan eine vollständige Lösung aller Bestandteile der Fraktion erreicht werden. Mit Acetonitril jedoch ging nur ein Teil der Fraktion als dunkelbrauner Überstand in Lösung. Der verbliebene beige Rückstand wurde abfiltriert und in Dichlormethan wieder aufgenommen. Sowohl Filtrat als auch Rückstand wurden vom jeweiligen Lösungsmittel befreit. Das Filtrat wurde erneut mit Acetonitril versetzt und der Rückstand wiederum abfiltriert. Die Rückstände wurden vereinigt und ebenso wie das Filtrat gewogen und anschließend chromatographiert. Durch Abtrennung von etwa 90 mg Rückstand aus der Fraktion konnte der Anteil an Begleitsubstanzen wesentlich verringert werden. Die zu isolierende Hauptsubstanz konnte im Rückstand kapillarchromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden. Im Chromatogramm des Filtrates waren jedoch neben der Hauptsubstanz noch mehrere Peaks zu erkennen. Da das Filtrat aber, im Gegensatz zu der Gesamtfraktion, eine gewisse Wasserlöslichkeit aufwies, kam als nachfolgender Trennschritt eine präparative RP-HPLC zum Einsatz.

Dieses System zeigt für alle Substanzen eine vollkommen andere Selektivität als in der Normalphasenchromatographie. Substanzen, die bei der Gradientenextrographie auf Normalphase innerhalb einer Fraktion eluieren, besitzen in der RP-HPLC häufig stark voneinander abweichende Retentionseigenschaften.

Im Gegensatz zur Gradientenextrographie wurde bei der präparativen RP-HPLC statt des Diethylamins Trifluoressigsäure (TFA) zu der mobilen Phase gegeben. Dadurch werden die Alkaloidbasen protoniert, was ebenfalls, bei ausreichendem Zusatz, zu einer Verbesserung der Peakschärfe führt. Die Möglichkeit, RP-Phasen im Säuren zu betreiben, ist durch die Stabilität von Kieselgel gegenüber Säuren möglich. Die Unbeständigkeit des Kieselgels gegenüber stark alkalischen pH-Werten spielte für die extrographische Trennung keine Rolle, da die stationäre Phase nach Beendigung der Extrographie im Gegensatz zu den nun folgenden Trennungen mit industriell gepackten Säulen verworfen wird.

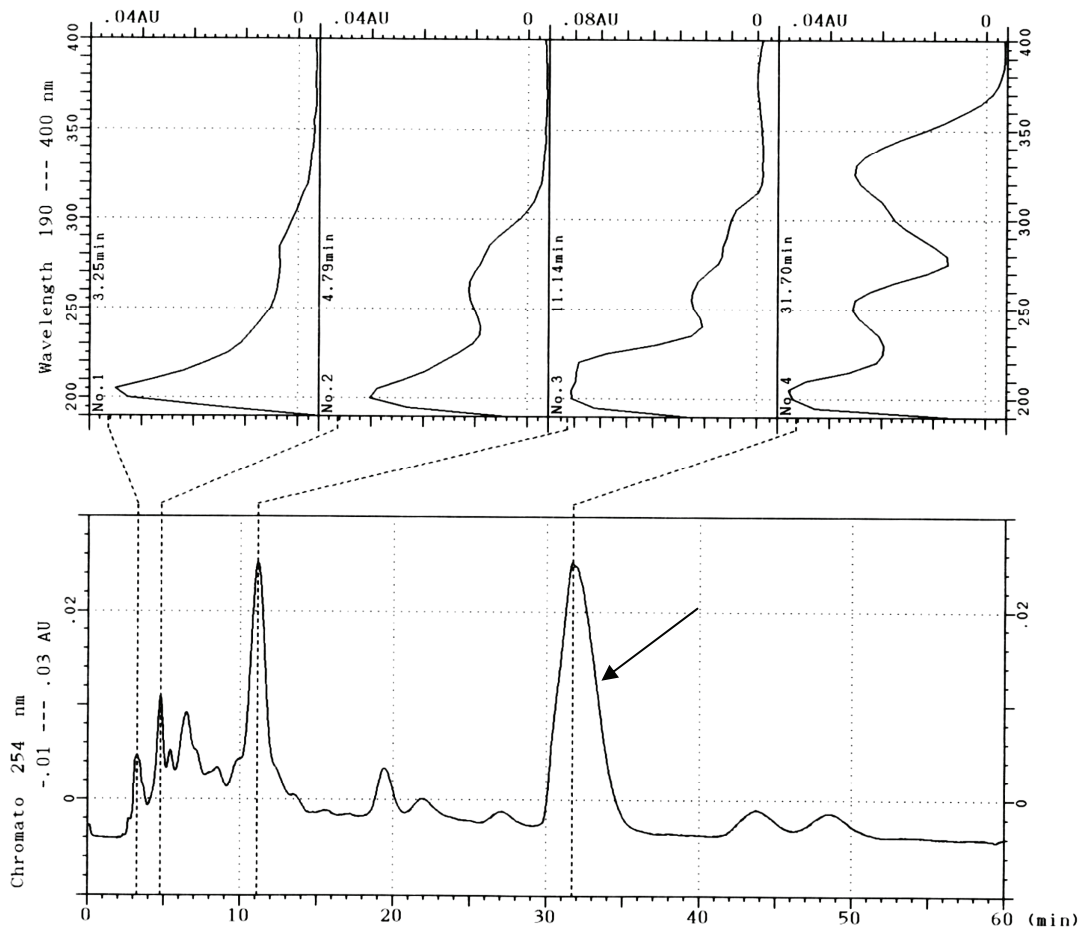


Abb. 94: Chromatogramm der präparativen Trennung der Extrographiefraction 34 mit zugeordneten UV-Spektren

Der Pfeil markiert die dabei abgetrennte Fraktion, die die gesuchte Substanz beinhaltet.

Nach vorheriger Optimierung der Trennung des Filtrats der Fraktion 34 im analytischen Maßstab konnte durch Anpassung der Säulendimension und der Flussrate die Haupt-

substanz nach mehreren identisch verlaufenen präparativen Trennungen (Abb. 94) in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden. Die erhaltenen 71 mg eines noch zu identifizierenden Alkaloids entsprechen 0,45 % der Menge des eingesetzten selektiven Dichlormethanextraktes.

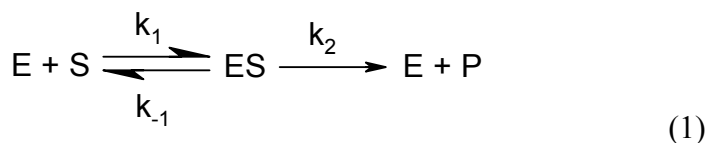
7 Verifizierung der Wirksamkeit der aus *Passiflora incarnata* L. isolierten Substanzen

Wie schon in Kapitel 5 erläutert, können mit der Methode des Ligandenfischens zunächst nur biochemische Aussagen einer Ligandenbindung getroffen werden. Für die Beurteilung des pharmakologischen Effektes sind weitere Bindungsexperimente notwendig.

Die folgenden Untersuchungen wurden durch B. Stengl im Arbeitskreis Prof. Dr. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

7.1 Enzymassay mit der *Z. mobilis* TGT

Ausgehend von der Reaktionsgleichung, nach der einfache enzymatische Reaktionen verlaufen (1), ergibt sich die Michaelis-Menten-Gleichung (2):



$$v_0 = v_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Inhibitoren I eines Enzyms E lassen jedoch keine Produktbildung im Sinne von Gleichung (1) zu. Nach Dixon [132] kann die Bestimmung der Inhibitionskonstante (K_i -Wert) eines kompetitiven Inhibitors mit Gleichung (3) erfolgen, wonach die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion v_i [$\mu\text{M}/\text{min}$] bei gegebener Inhibitorkonzentration $[I]$ [μM] beschrieben werden kann als:

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3)$$

K_M , die Michaelis-Konstante, gibt die Substrat- bzw. Inhibitorkonzentration $[A]$ an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Dabei gilt (4):

$$K_M = \frac{[E] * [A]}{[EA]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (4)$$

Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} der Reaktion der TGT schwer reproduzierbar ist, wurde sie für jede Messreihe neu bestimmt. Die Ermittlung der Inhibitionskonstante K_i erfolgte aus dem Verhältnis v_0/v_i . Um dieses Verhältnis berechnen zu können, wurden die Gleichungen 2 und 3 zu Gleichung 5 zusammengefasst:

$$\frac{v_0 * \frac{K_M + [S]}{K_M}}{v_i} = \frac{1}{K_i} [I] + \left(\frac{[S]}{K_M} + 1 \right) \quad (5)$$

Darin sind:

- v_0 die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Abwesenheit des Inhibitors,
- v_i die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Anwesenheit des Inhibitors,
- K_M die Michaelis-Konstante des Tritium-markierten Guanins,
- $[S]$ die Substratkonzentration (Tritium-markiertes Guanin oder tRNA),
- K_i die Inhibitionskonstante und
- $[I]$ die Inhibitorkonzentration.

Eine Enzymhemmung ist aber genau betrachtet ein sehr komplexer Vorgang, in den mehrere Gleichgewichtskonstanten involviert sind. Im Falle der TGT wird der Vorgang zudem durch die Beteiligung von zwei Substraten, tRNA und preQ₁, komplizierter. Wird jedoch das eine Substrat im Überschuss eingesetzt, können die Gleichgewichtskonstanten für das andere, dann in seiner Konzentration variierbare Substrat vereinfacht aus den obigen Gleichungen berechnet werden.

Die Inhibitionskonstante K_i wurde aus der Auftragung von $v_0((K_M+[S])/K_M)/v_i$ gegen die Inhibitorkonzentration I [μM] nach Gleichung (5) und linearer Regression mit dem Programm GRAFIT bestimmt.

Der Enzymassay beruht auf der Eigenschaft der TGT, das Guanin an Position 34 in der Antikodon-Schleife bestimmter tRNAs gegen preQ₁ oder alternativ gegen freies Guanin aus dem Reaktionsansatz auszutauschen. Durch Verwendung von Tritium-markiertem Guanin, das anstelle von nicht verfügbarem preQ₁ Verwendung findet, wird die tRNA infolge des Einbaus der Base radioaktiv markiert. Die kinetischen Parameter können

nach Isolierung der tRNA aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers aus der Zunahme der Radioaktivität gegen die Zeit bestimmt werden.

Die Inhibitionskonstanten der Verbindungen wurden zunächst bezogen auf Tritiummarkiertes Guanin als variables Substrat der TGT nach der durch U. Grädler [110] modifizierten Methode von G. C. Hoops [133] bestimmt. Der gemessene K_i -Wert lag für Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) bei 11 μM und für Isovitexin (**2**) bei 9,4 μM . Die Messung jedes K_i -Wertes wurde ebenso wie bei den folgenden K_i -Wertbestimmungen mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt.

7.1.1 Unspezifische Inhibition (Promiskuität)

Bei der Literaturrecherche stellte sich heraus, dass die getesteten Verbindungen dem als promiskiten Inhibitor bekannten Quercetin bezogen auf das Grundgerüst strukturell sehr ähnlich sind [134] [135] [137]. Apigenin und Vitexin (**3**) wurden im Ligandenfischen als unwirksam getestet (siehe Abschnitt 5.2.4). Dies kann jedoch an einer zu schwachen Bindung an die TGT (hoher K_i -Wert) gelegen haben. Mit dem Ligandenfischen können nur Substanzen gefunden werden, die einen K_i -Wert kleiner als 20 μM besitzen (Abschnitt 5.2.5). Daher wurde eine aus dem methanolischen *Passiflorae herba*-Extrakt isolierte Verbindung ebenso wie Apigenin auf eine mögliche Promiskuität getestet.

Promiske Inhibitoren weisen verschiedene Eigenschaften auf, die bei kompetitiven Inhibitoren nicht zu finden sind. Die Ionenstärke des für den Assay verwendeten Puffersystems beispielsweise beeinflusst ebenso wie die Enzymkonzentration den Grad der Inhibition. Weiterhin zeigen promiske Inhibitoren in höheren Konzentrationen, bedingt durch ihre in Assaybedingungen schlechte Löslichkeit, eine mittels Lichtstreuung und Elektronenmikroskop messbare Aggregatbildung [134]. Bevorzugt an die Oberfläche dieser Aggregate lagert sich dann das Enzym unspezifisch an und kann somit seine Funktion nicht mehr ausüben. Daraus resultiert ein verminderter Stoffumsatz, wodurch eine Inhibition vorgetäuscht wird [135]. Durch Lösungsvermittler, wie z.B. Tween 20, die die Oberflächenaktivität von Substanzen beeinflussen und oftmals zur Steigerung der Robustheit eines Assays eingesetzt werden, wird eine Aggregatbildung weitestgehend verhindert. Infolgedessen können, bei erwiesener Stabilität des Enzyms gegenüber dem Lösungsvermittler, unter Zusatz von Tween 20 weitaus verlässlichere K_i -Werte erhalten werden [136].

Dazu wurde der Einfluss eines Zusatzes von Tween 20 in 5 % seiner kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) zum Reaktionsansatz des TGT-Assays untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der Enzymaktivität unter Detergentienzusatz festgestellt werden, was durch eine geringere Adsorption der TGT an die Oberfläche der im Assay verwendeten Eppendorfcaps zu begründen ist. Vergleichbare Beobachtungen sind auch in der Literatur beschrieben [136].

Der Einfluss des Emulgators Tween 20 wurde nach Abklärung der Verträglichkeit dieses Zusatzes mit der Enzymreaktion an Apigenin untersucht. Apigenin weist nur eine OH-Gruppe weniger als Quercetin auf. Für Apigenin konnte ohne Zusatz von Tween 20 ein K_i -Wert von 7,4 μM bestimmt werden. Unter Einfluss von Tween 20 veränderte sich der K_i -Wert von Apigenin abhängig von der eingesetzten Konzentration des Lösungsvermittlers. Der unter diesen Bedingungen ermittelte Wert lag mit 78 μM um etwa eine Zehnerpotenz höher als bei der Bestimmung ohne Tween 20. Somit kann Apigenin als promisk in Bezug auf die TGT angesehen werden. Gleichzeitig wurde der K_i -Wert für Isovitexin (**2**) unter Zusatz von Tween 20 neu ermittelt. Dabei veränderte sich der K_i -Wert unter Emulgatorzusatz nur unwesentlich (11 μM). Ein Vorliegen von Promiskuität bei Isovitexin (**2**) erscheint damit unwahrscheinlich.

Allerdings ist auch bei Untersuchungen zur Promiskuität anzumerken, dass einige als promiske Inhibitoren bekannte Substanzen unter bestimmten Bedingungen auch eine monomere Bindung mit dem Zielprotein zeigen können [137] [138].

7.1.2 Revalidierung der Inhibitionskonstanten

Bedingt durch neue Erkenntnisse über den Verlauf der durch TGT katalysierten Basenaustauschreaktion musste der bestehende Assay modifiziert werden (unveröffentlichte Ergebnisse B. Stengl, AG Prof. Dr. G. Klebe, Philipps-Universität Marburg). Die Reaktion folgt einem Ping-Pong-Mechanismus [53]. Dies bedeutet, dass zunächst das erste Substrat, die tRNA, an das Enzym bindet. Erst in einem zweiten Schritt bindet preQ1 bzw. Guanin als zweites Substrat an die TGT (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Prinzipiell kann die Bindung beider Substrate inhibiert werden. Da für die Inhibition der preQ₁-Bindung aber nur sehr kleine Verbindungen in Frage kommen, ist es für alle größeren Verbindungen nur sinnvoll, die Inhibition gegen die tRNA-Bindung zu bestimmen. Dies gilt auch für alle hier vorgestellten Verbindungen, da auf Grund ihrer Molekülgröße eine

Hemmung infolge der Besetzung der Guaninbindestelle unwahrscheinlich ist. Deswegen wurden die K_i -Werte, die entsprechend den Annahmen des ursprünglichen Assays gegen Guanin bestimmt wurden, erneut, nun gegen tRNA als variables Substrat, ermittelt.

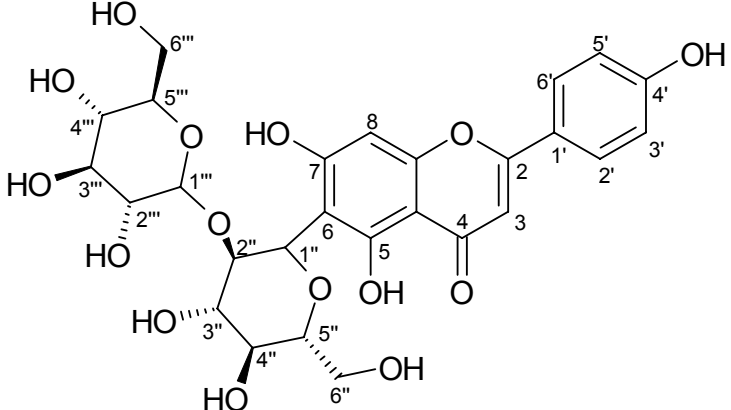
Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) wurde im Hinblick auf eine durch das Ligandenfischen ermittelte mögliche inhibitorische Wirksamkeit gegen die tRNA-Bindung an die TGT getestet. Die Inhibitionskonstante dieser Verbindung wurde mit 20 μ M bestimmt. Da sich der K_i -Wert dieser Verbindung in gleichem Maße durch die Modifizierungen veränderte wie der des Isovitexins (**2**), ist auch bei Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) ein promiskes Verhalten unwahrscheinlich.

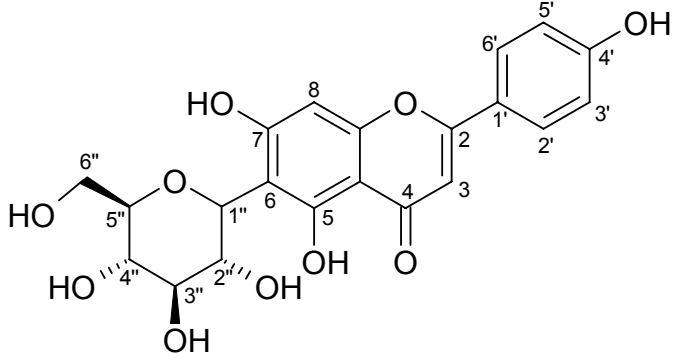
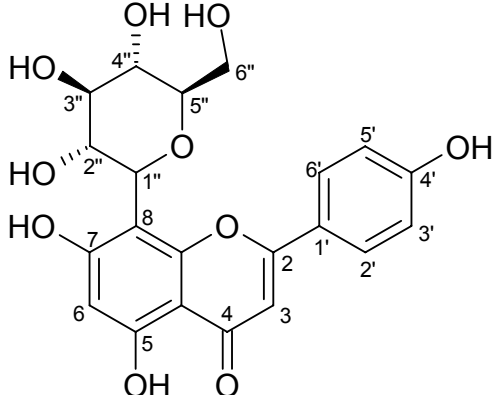
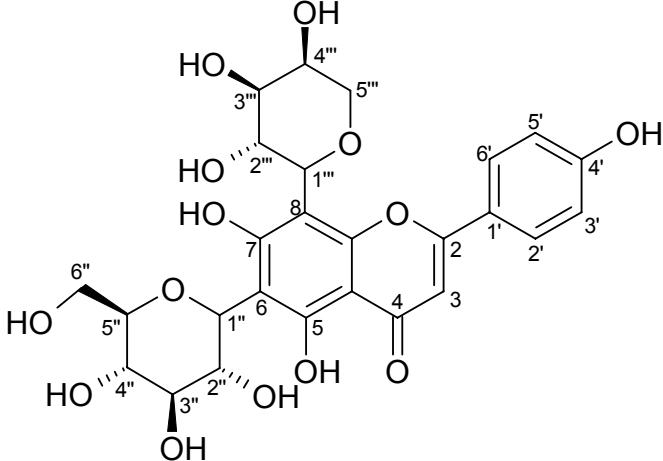
Aufgrund dieses positiven Ergebnisses sollte mittels kristallographischer Methoden ein Bindungsmodus gefunden werden, durch den diese inhibitorische Wirksamkeit strukturell zu erklären wäre (Abschnitt 7.2).

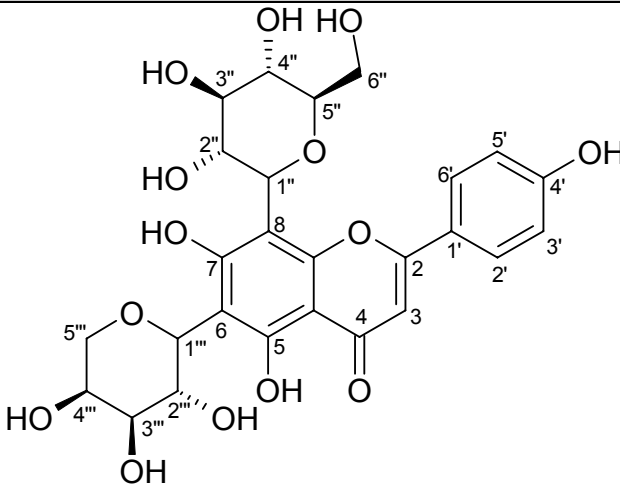
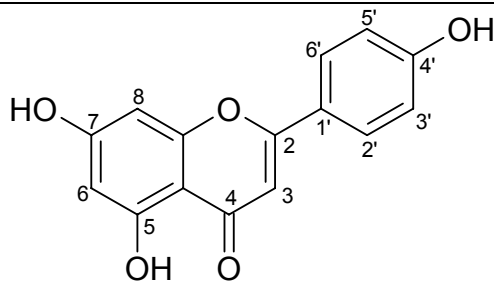
Um Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen zu können, wurden auch die anderen aus *Passiflora incarnata* L. isolierten Flavonoide auf eine mögliche Wirksamkeit an diesem Target mit diesem Assay untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Auflistung der mit dem zweifach modifizierten, radioaktiven Assay auf TGT-Inhibition getesteten Substanzen und deren damit bestimmte K_i -Werte

Substanz		K_i [μ M]
Isovitexin-2''- <i>O</i> - β -glucosid (1)		20

Substanz		K _i [μM]
Isovitexin (2)		26
Vitexin (3)		75
Schaftosid (4)		50

Substanz		K_i [μ M]
Isoschaftosid (5)		70
Apigenin		90

Wie aus der Tab. 8 zu entnehmen ist, besitzt Isovitexin (2) einen ähnlichen K_i -Wert wie Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (1). Trotzdem konnte mit dem Ligandenfischen für Isovitexin (2) keine Bindung an die TGT festgestellt werden. Dies kann sowohl an der Konzentration der jeweiligen Substanz als auch an den unterschiedlichen Löslichkeiten der Verbindungen gelegen haben. Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Liganden beim Ligandenfischen wurde bereits in Abschnitt 5.1.1 diskutiert. Wie Löslichkeitsversuche gezeigt haben, ist Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (1) in den für das Ligandenfischen angewendeten Bedingungen wesentlich besser löslich als Isovitexin (2). Dies kann möglicherweise zu einer Verschiebung des Massenverhältnisses zwischen Isovitexin (2) und Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (1) im Vergleich zu dem im methanolischen Gesamtextrakt vorliegenden Verhältnis geführt haben. Durch die nun in der Inkubationslösung vorliegende größere Menge an Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (1) können auch mehr Moleküle von dieser Substanz durch die TGT gebunden und mit Hilfe des Freisetzungsreagenzes auch wieder freigesetzt werden.

Durch die Ermittlung der K_i -Werte der mit diesem Enzymassay untersuchten Flavonoide des Apigenin-Typs können bei Betrachtung des Substitutionsmusters erste Struktur-

Wirkungsbeziehungen für diese neue Klasse von Inhibitoren der TGT aufgestellt werden. Durch Glykosylierung an C-6 konnte eine Wirkungssteigerung im Vergleich zum Aglykon festgestellt werden. Dabei ist es scheinbar unerheblich, ob an dieser Position ein Monosaccharid oder ein Disaccharid an das Aglykon gebunden ist. Dem gegenüber können durch die Bindung eines Zuckers an C-8 weniger TGT-affine Verbindungen erhalten werden. Sind an beiden Positionen, an C-6 ebenso wie an C-8, Zuckermoleküle C-glykosidisch gebunden, resultieren Substanzen, die hinsichtlich ihres K_i -Wertes eine Mittelstellung innerhalb der Reihe der in Versuchen für diese Arbeit getesteten Flavonoide einnehmen.

Die mit dem Enzymassay erhaltenen Ergebnisse bestätigen auch die in verschiedenen Ligandenfischversuchen mit Vitexin (**3**), Apigenin und dem methanolischen Gesamtextrakt aus *Passiflorae herba* erzielten Resultate (Abschnitte 5.2.4 und 5.2.2.1).

7.2 Kristallographische Versuche

Mit Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) und Isovitexin (**2**) wurden aufgrund der Ergebnisse aus dem Enzymassay sowohl Kokristallisations- als auch Soaking-Experimente durchgeführt, um einen Bindungsmodus bestimmen und darauf aufbauend die inhibierenden Eigenschaften der Verbindungen erklären zu können.

Leider konnte für keine der beiden Substanzen eine Kristallstruktur aus den bei pH 5,5 und pH 8,5 durchgeführten Soaking-Experimenten erhalten werden. Lediglich für Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) ist bei pH 8,5 das Herausklappen der Seitenkette des Tyr 106 aus der Bindetasche zu sehen, was auf eine partielle Besetzung der Bindetasche hindeutet.

Aus diesem Grund wurde versucht, durch Kokristallisation von Isovitexin-2''-O- β -glucosid (**1**) mit der TGT, sowohl bei pH 5,5 als auch pH 8,5, eine ligandgebundene TGT-Kristallstruktur zu erhalten. Leider waren auch diese Versuche erfolglos.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Ein weltweites Problem bei der Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten ist die rasante Entwicklung von Resistenzen und Multiresistenzen gegen die derzeit eingesetzten Antibiotika. Diese Entwicklung hat in den letzten Jahren vor allem im Falle der Shigellen besorgniserregende Ausmaße angenommen [4] [5] [6]. Die tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT) stellt ein neues Target für die Entwicklung von antibiotisch wirkenden Substanzen gegen Shigellen dar [18] [19].

Zum einen war es Ziel der vorliegenden Arbeit, neue Leitstrukturen bzw. potentielle Inhibitoren der TGT in Pflanzenextrakten zu identifizieren und gegebenenfalls zu isolieren. Zum anderen sollten Pflanzenextrakte als Quelle für die Entdeckung neuer Leitstrukturen bzw. inhibitorisch wirkender Verbindungen der Insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase (IGF-1-RTK) dienen.

IGF-1-RTK ist Teil der intrazellulären Untereinheit des IGF-1-Rezeptors. Dieser nimmt eine Schlüsselstellung im Krebsgeschehen ein und könnte durch Blockade der katalytischen Kinasedomäne in seiner Funktion gehemmt werden [73] [78]. Daraus folgend würde eine übermäßige Zellproliferation verhindert sowie ein kontrollierter Übergang in die Apoptose ermöglicht werden [74].

Für das Screening der Extrakte wurde die innovative Methode des Ligandenfischens verwendet. Sie stellt eine gegenüber dem Hochdurchsatzscreening weniger zeitaufwendige und vor allem kostengünstigere Methode zur Auffindung aktiver Verbindungen in komplexen Substanzbibliotheken dar.

Mit dem Ligandenfischen wurden 15 verschiedene Extrakte traditioneller Arzneipflanzen auf Substanzen untersucht, die an die TGT binden. Des Weiteren fand mit dieser Methode eine Überprüfung von sechs aus Pflanzen isolierten sowie von zwei synthetisch gewonnenen Verbindungen hinsichtlich einer TGT-Bindung statt. In Extrakten aus *Passiflorae herba* und *Dulcamarae stipites* konnten Substanzen gefunden werden, die an die TGT binden. Darüber hinaus konnten mit dem Ligandenfischen aus einem Extrakt des asiatischen Wassernabelkrautes erste Hinweise auf das Vorhandensein von an die TGT bindenden Substanzen gewonnen werden.

Das aus dem methanolischen Extrakt aus *Passiflorae herba* gefischte Flavonoid wurde mit präparativer HPLC isoliert. Diese Substanz konnte mit NMR- und massenspektrometrischen Techniken als Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) identifiziert werden. Dabei gelang aufgrund der Verwendung hochfeldiger Messgeräte erstmalig die vollständige Interpretation des ^1H -NMR-Spektrums dieser Verbindung. Weiterhin wurden aus vier anderen Fraktionen des Extraktes vier Flavonoide isoliert und identifiziert. Alle fünf Flavonoide besitzen eine Apigenin-Grundstruktur. Jedoch konnte die TGT nur eines dieser Flavonoide, nämlich Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**), aus dem Pool an Substanzen im Extrakt selektieren. Aus diesem Grund war es notwendig, den Einfluss des Substitutionsmusters am Apigenin-Grundgerüst auf die Enzymbindung näher zu untersuchen. Es wurden Experimente zu Struktur-Wirkungsbeziehungen sowohl mit dem Ligandenfischen als auch in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. Dr. G. Klebe (Philipps-Universität Marburg) durch Bestimmung der K_i -Werte sowie mit kristallographischen Methoden durchgeführt. Aus den Ligandenfischversuchen konnten bereits Hinweise auf eine bevorzugte Bindung des an Position 6 substituierten Apigeninderivates erhalten werden. Für Apigenin selber konnte mit dem Ligandenfischen keine Bindung an die TGT nachgewiesen werden. Durch Bestimmung der K_i -Werte von Apigenin und der fünf isolierten Apigeninderivate wurden diese Ergebnisse bestätigt und erweitert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Substitution am Kohlenstoffatom 6 des Apigenins, wie bei Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**), zu einer Wirkungssteigerung führt. Dabei ist es unerheblich, ob an dieser Position ein Mono- oder ein Disaccharid gebunden ist. Die Bindung eines Zuckers am Kohlenstoffatom 8 führte dagegen, im Vergleich mit dem für Apigenin bestimmten K_i -Wert, nicht zu wesentlich kleineren Inhibitionskonstanten. Ist an beiden genannten Positionen ein Zucker gebunden, werden im Vergleich zu Apigenin und Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) Inhibitionskonstanten mittlerer Größenordnung erhalten.

Ein Bindungsmodus für Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) im Komplex mit der TGT konnte aus den durchgeführten Kokristallisations- und Soakingexperimenten leider nicht bestimmt werden.

Der K_i -Wert von Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) wurde mit 20 μM bestimmt. Damit konnte die K_i -Wert-Grenze für das Ligandenfischen um den Faktor 48 im Vergleich zu den Ergebnissen von J. Lenz [10] erweitert werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen Isovitexin-2''-*O*- β -glucosid (**1**) und Isovitexin (**2**) stellen Vertreter einer neuen Inhibitor-Klasse für die TGT dar. Für weitere Untersuchungen, z. B. an Shigellenkulturen, sollten diese Verbindungen jedoch modifiziert werden, um zu wirksameren Substanzen zu gelangen.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können die an die TGT bindenden Substanzen aus dem *Dulcamarae stipites*-Extrakt isoliert und identifiziert werden. Eine Fraktionierung des Extraktes wurde in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Bei der Untersuchung der Fraktionen mittels Ligandenfischen sind in einer Fraktion zwei weitere an die TGT bindende Substanzen gefunden worden. Trotz wahrscheinlich geringerer Affinität dieser Verbindungen zum Target könnte eine Isolierung und Identifizierung der Strukturen zweckdienlich sein, um zu neuen Leitstrukturen für Inhibitoren der TGT zu gelangen. Nach Verifizierung der Ergebnisse aus dem Ligandenfischen mit der TGT und dem Dichlormethanextrakt aus *Centellae asiaticae herba* könnten auch aus diesem Extrakt potentiell TGT-inhibierende Substanzen isoliert werden.

Auch für das zweite Target, IGF-1-RTK, konnten mit dem Ligandenfischen bindende Substanzen in verschiedenen Extrakten traditioneller Arzneipflanzen gefunden werden. Zwölf Pflanzenextrakte wurden untersucht. In sechs Extrakten aus den Drogen *Liquiritiae radix*, *Lichen islandicus*, *Passiflorae herba* und *Quebracho cortex* konnte eine Bindung einer oder mehrerer Substanzen an IGF-1-RTK festgestellt werden.

Die Extrakte aus *Quebracho cortex* wurden daraufhin näher untersucht. Aus dem Dichlormethanextrakt konnten zwei an das Target bindende Substanzen isoliert werden. Die Isolierung erfolgte hierbei mit einer Extrographie, einer Methode, die auf der Normalphasenchromatographie beruht. Im Anschluss daran fanden Aufreinigungen unter Anwendung von RP-HPLC-Methoden sowie Kristallisationen statt. Eine der isolierten Verbindungen wurde als Aspidospermin (**6**) identifiziert. Für die zweite Verbindung bedarf es noch weiterer Messungen, um die Identität der Verbindung eindeutig zu klären.

Für die aus *Quebracho cortex* isolierten Verbindungen konnte, bedingt durch den Versuchsablauf des Ligandenfischens, lediglich eine Bindung an IGF-1-RTK aus dem Extrakt nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit der isolierten Verbindungen müsste in weiteren Versuchen idealerweise mit einem Zelltest überprüft werden. Dazu wären eine

Reihe verschiedener Zelllinien, z.B. MM-Zelllinien, geeignet. In 92 % der malignen Melanome (MM) wurde eine höhere Expression des IGF-1-Rezeptors im Vergleich zu gesunden Zellen festgestellt [140]. C. S. Mitsiades et al. nutzen 75 verschiedene humane Zelllinien, darunter eine Reihe von MM-Zelllinien, zur Überprüfung der Wirksamkeit eines von ihnen entwickelten IGF-1-RTK-Inhibitors [76].

Daneben sollten auch die an IGF-1-RTK bindenden Substanzen aus *Liquiritiae radix*-Extrakten isoliert, identifiziert und ebenso auf ihre Wirksamkeit an Krebszelllinien untersucht werden. Gleichmaßen könnte mit den Substanzen aus *Lichen islandicus* und *Passiflorae herba*, nach Verifizierung der in dieser Arbeit vorgestellten Ligandenfischergebnisse aus diesen Extrakten, verfahren werden.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der Methode des Ligandenfischens eine Leitstruktur- und Wirkstoffsuche aus komplexen Substanzbibliotheken an der Hochschule kostengünstig und erfolgreich betrieben werden kann.

In der heutigen Zeit kann zur Wirkstoffsuche auch auf umfangreiche Substanzbibliotheken synthetischen Ursprungs zurückgegriffen werden. Im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit ist die Isolierung von wirksamen Substanzen gelungen, deren Struktur für Inhibitoren der untersuchten Targets neuartig ist. Damit konnte die Suche nach Leitstrukturen und potentiellen Wirkstoffen in solch hoch diversen Systemen wie Pflanzenextrakten als weiterhin lohnenswert bewiesen werden.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Methoden und Materialien

9.1.1 Ligandenfischen

9.1.1.1 Geräte für das Ligandenfischen

Inkubator:	Thermostat 5320 der Firma Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge:	Modell Z230M mit Festwinkelrotoren 220,56 V (8.620 x g) und 220,59 V (13.360 x g), Firma Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
Vakuumkonzentrator:	SpeedVac-Concentrator SVC 100 H, Firma Bachofer, Reutlingen
Ultrafiltrationseinheiten:	Microcon 10 bzw. 30 (NMWL 10.000 bzw. 30.000) Amicon-Microconcentrators, Centrifugal Filter Devices aus regenerierter Cellulose, Firma Millipore Corporation, Bedford, MA, USA Ultrafree-0.5 (NMWL 10.000) Zentrifugen-Filtereinheiten mit Biomax-10 Membran aus Polyethersulfon, Firma Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Ultraschallgeräte:	Sonorex Super RK 106 und Super RK 255H, Firma Bandelin, Berlin
Probenschüttler:	Vortex REAX 1 DR (200 – 2400 U/min), Firma Heidolph, Schwabach
Reaktionsgefäße:	1,5 ml PP-Gefäße „Rotilabo“ mit Deckel, Firma Roth, Karlsruhe

9.1.1.2 Lösungen für das Ligandenfischen

Die für das Ligandenfischen verwendeten Lösungsmittel, einschließlich des Wassers, hatten die unter 9.1.2.4 beschriebene Qualität. DMSO wurde in purum-Qualität von der Firma Fluka eingesetzt.

Pufferlösungen

PL 01

Hochsalzpuffer:

10 mM TrisHCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl, 0,01 % (m/V) Natriumazid

PL 02

TGT-Assay-Puffer:

100 mM HEPES, 20 mM MgCl₂, eingestellt auf pH 7,4 mit NaOH

PL 03

Kinase-Assay-Puffer:

125 mM HEPES, 7,5 mM MgCl₂·6H₂O, 7,5 mM MnCl₂·2H₂O, 0,0075 mM Na-Orthovanadat, 2,5 mM DTT, eingestellt auf pH 7,5 mit NaOH

PL 04

IGF-1-RTK-Puffer:

50 mM TrisHCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM DTT, 7,5 mM reduziertes Glutathion, 20 % Glycerol

PL 05

Pufferlösung PL 02 + DMSO = 9 + 1 (V + V)

PL 06

Pufferlösung PL 03: Ethanol = 95 : 5 (V / V)

Freisetzungsreagenz

FR 01

Wasser : Methanol : TFA = 49,5 : 49,5 : 1 (V / V / V)

FR 02

[Wasser : Methanol : TFA = 49,5 : 49,5 : 1 (V / V / V)] + DMSO = 9 + 1 (V + V)

FR 03

[Wasser : Methanol : TFA = 49,5 : 49,5 : 1 (V / V / V)] : Ethanol = 95 : 5 (V / V)

9.1.1.3 Für das Ligandenfischen verwendete Proteine**TGT**

tRNA-Guanin-Transglykosylase aus *Zymomonas mobilis* (MG ca. 42.000 Da).

Das Enzym wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Klebe, Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie, exprimiert und aufgereinigt. Zellanzucht, Überexpression, Herstellung des Roherextraktes sowie Aufreinigung der TGT erfolgten dabei nach der von C. Romier beschriebenen Methode [139]. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde zusätzlich eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Als Zellstamm diente der *E. coli* BL21(DE3)/pLysS – Stamm mit entsprechendem Überexpressionsplasmid. Eine genaue Beschreibung der Gewinnung der in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten TGT findet sich in Literatur [87].

Das gereinigte Enzym wurde in einer Konzentration von 12 – 18 mg/ml in Hochsalzpuffer (Pufferlösung PL 01) bei – 20 °C in Portionen zu je 30 µl bis zur Verdünnung gelagert. Die Verdünnung auf für das Ligandenfischen handhabbare Konzentrationen erfolgte mit Pufferlösung PL 02. Die erhaltene Lösung wurde in Eppendorfgefäße portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

IGF-1-RTK

Tyrosinkinasedomäne des humanen IGF-1-Rezeptors, als Konstrukt aus GST mit IGF-1-RTK vorliegend (MG ca. 80.000 Da).

Rekombinant isoliert aus humaner c-DNA-Bank durch PCR; aus Sf9-Zellen als GST-Fusionsprotein exprimiert mit Baculovirus-Expressionssystem.

Lösung: 1 ml Aliquots mit einer Konzentration von 160 µg/ml (entsprechend ca. 2 nmol IGF-1-RTK-GST-Fusionsprotein/ml Lösung) in Puffer PL 04.

Die Herstellung und Aufreinigung wurde an der Klinik für Tumorbiologie in Freiburg, Institut für Molekulare Medizin und Naturstoffforschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Marmé, Dr. M. Mundt und Dr. G. Siemeister vorgenommen.

Die ASTA Medica AG (Frankfurt/Main) stellte die Aliquots, deren Lagertemperatur bei -80 °C lag, zur Verfügung.

9.1.1.4 Inkubation

Die Inkubation beim Ligandenfischen erfolgte bei entsprechender Temperatur und für eine definierte Zeit (siehe Abschnitt 9.1.1.7 bzw. 9.1.1.8) in einem Eppendorf Thermostat 5220. Während dieser Zeit wurden die Proben alle 15 min unter Zuhilfenahme des Heidolph-Probenschüttlers gemischt.

9.1.1.5 Ultrafiltrationsmethoden

Zur Beseitigung des herstellerseitig als Membranfeuchthalter aufgetragenen Glycerols wurden die einzusetzenden Microcon-Filtrationseinheiten direkt vor ihrer Verwendung vorgewaschen, indem $200\text{ }\mu\text{l}$ auf den Filter aufpipettiertes Wasser durch Zentrifugation den Filter passierte. Das resultierende Filtrat wurde verworfen. Diese, wie auch die anschließenden Ultrafiltrationen, erfolgten in einer Hermle Z 230 M-Zentrifuge.

Tab. 9: Aufstellung der verwendeten Ultrafiltrationen

Methode	U 01	U 02	U 03	U 04	U 05
Filter	Microcon 10	Ultrafree 0,5	Microcon 10	Microcon 30	Microcon 30
Zentrifugation	8.620 x g, RT	8.620 x g, RT	8.620 x g, RT	8.620 x g, RT	8.620 x g, RT
Waschschritte	2 x mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ PL 02	2 x mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ PL 02	2 x mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ PL 05	2 x mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ PL 03	2 x mit je $150\text{ }\mu\text{l}$ PL 06
Freisetzung	1 x mit $200\text{ }\mu\text{l}$ FR 01 , 10 min RT	1 x mit $200\text{ }\mu\text{l}$ FR 01 , 10 min RT	1 x mit $200\text{ }\mu\text{l}$ FR 02 , 10 min RT	1 x mit $200\text{ }\mu\text{l}$ FR 01 , 10 min RT	1 x mit $200\text{ }\mu\text{l}$ FR 03 , 10 min RT

Die für die Waschschritte verwendeten Pufferlösungen waren eiskühlt und hatten somit eine Temperatur von etwa 4 °C .

Alle Filtrationsvorgänge während des Ligandenfischens wurden bis zum vollständigen Passieren der aufgetragenen Lösung durchgeführt.

9.1.1.6 Trocknung der Proben

Die durch Ultrafiltration erhaltenen Filtrate und ein jeweils dem bei der Inkubation verwendeten entsprechendes Volumen der Einzelsubstanz- oder Pflanzenextraktlösung

wurden durch Vakuumzentrifugation im SpeedVac-Concentrator getrocknet. Später wurden die getrockneten Proben in den entsprechenden Anfangsbedingungen der mobilen Phase zur kapillarchromatographischen Vermessung in definierter Menge unter Zuhilfenahme von Ultraschall und Heidolph-Probenschüttler gelöst.

9.1.1.7 Ligandenfischversuche mit TGT

Die allgemeine Durchführung der Versuche ist in Kapitel 5 näher beschrieben. In Abschnitt 9.1.1.3 sind genauere Informationen über das verwendete Protein aufgeführt.

9.1.1.7.1 Ligandenfischen mit 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid

Methode 1

Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, wurden verschiedene Inhibitormengen mit verschiedenen Mengen an TGT getestet. Ebenso wurden die Einspritzmengen der erhaltenen Proben variiert, um Detektionsfehler zu vermeiden. Zu jeder in Tab. 10 angegebenen Probe wurde parallel eine proteinfreie Blindprobe denselben Bedingungen und Prozeduren ausgesetzt.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des 3,5-Diaminophthalsäurehydrazids im Puffermedium mussten die Lösungen unter DMSO-Zusatz hergestellt werden. Dazu wurde die Substanz stets in DMSO angelöst und dann mit der Pufferlösung PL 02 aufgefüllt, so dass eine Endkonzentration von 10 % DMSO in der zum Ligandenfischen eingesetzten Inhibitorlösung resultierte. Die DMSO-Verträglichkeit der TGT wurde überprüft [110].

Tab. 10: Pipettierschema und Bedingungen des Ligandenfischens mit 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid

Probe: TGT / 3,5-Diaminophthal- säurehydrazid	A: 50 µl (200 pmol) / 12,5 µl (400 pmol)			
	B: 50 µl (200 pmol) / 25 µl (800 pmol)			
	C: 100 µl (400 pmol) / 25 µl (800 pmol)			
	D: 100 µl (400 pmol) / 50 µl (1600 pmol)			
	E: 200 µl (800 pmol) / 50 µl (1600 pmol)			
	F: 200 µl (800 pmol) / 100 µl (3200 pmol)			
	G: 60 µl (2 nmol) / 50 µl (40 nmol)			
	H: 60 µl (2 nmol) / 100 µl (80 nmol)			
	I: 120 µl (4 nmol) / 100 µl (80 nmol)			
	J: 120 µl (4 nmol) / 200 µl (120 nmol)			
	K: 50 µl (800 pmol) / 10 µl (800 pmol)			
	L: 50 µl (800 pmol) / 20 µl (1600 pmol)			
	M: 25 µl (400 pmol) / 100 µl (8000 pmol)			
Pufferlösung	Bis zu einem Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt mit: PL 02			
Inkubationstemperatur	37 °C			
Inkubationszeit	60 min			
Filtrationsmethode	U 01			
Proben gelöst in	20 µl Anfangsbe- dingungen	40 µl (1 : 1 = DMSO : Wasser)	60 µl (2/3 DMSO, 1/3 Wasser)	
	A - J	L, M	K	
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 01			
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,200 µl	0,300 µl	0,900 µl
	A, C, G, H, I, J	B, D, E, F	L, M	K

Methode 2

Die Inhibitorlösung wurde, wie unter Methode beschrieben, unter Anwendung von DMSO hergestellt, so dass eine Konzentration des Inhibitors von 1 mg/ml bei einer Konzentration von 10 % DMSO resultierte.

Tab. 11: Pipettierschema Vergleich von Filtereinheiten

Probe	Cellulose	Polyethersulfon
3,5-Diaminophthalsäurehydrazid	100 µl	100 µl
Pufferlösung PL 02	200 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 02
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 01	
Einspritzvolumen	0,150 µl	

9.1.1.7.2 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus Passiflorae herba

Extrakt: Passiflorae e herb. sicc.; Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach, Ch.-B.: 99120349

Extraktlösung 1: 5,0 mg des Extraktes gelöst in 1 ml Pufferlösung PL 02

Extraktlösung 2: 100 µl Extraktlösung 1 verdünnt mit 900 µl Pufferlösung PL 02

Fortsetzung

Tab. 12: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Passiflorae herba*-Extrakt

Probe	08	08 Blind	09	09 Blind	10	10 Blind	11	11 Blind	12	12 Blind	13	13 Blind
TGT	100 µl / 800 pmol	-	50 µl / 400 pmol	-	100 µl / 800 pmol	-	100 µl / 800 pmol	-	106,7 µl / 1600 pmol	-	53,3 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	150 µl	150 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	50 µl	150 µl	200 µl	250 µl	150 µl	250 µl	100 µl	200 µl	93,3 µl	200 µl	146,7 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	90 min	75 min	75 min	75 min	75 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in An- fangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03	K 03
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	1,40 µl	1,40 µl

9.1.1.7.3 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Centellae asiaticae herba*

- Extrakt 1: Dichlormethanextrakt (Herstellung siehe Abschnitt 9.2.3)
- Extraktlösung: 2,04 mg Extrakt in 300 µl DMSO unter Zuhilfenahme von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsame Zugabe von Pufferlösung PL 02 bis zu einem Gesamtvolumen von 800 µl ebenfalls mit zwischenzeitlicher Anwendung von Ultraschall – dabei Auftretung von Trübungen; unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet
- Extrakt 2: Methanol-Extrakt (Herstellung siehe Abschnitt 9.2.3)
- Extraktlösung: 4,75 mg Extrakt in 300 µl DMSO unter Zuhilfenahme von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsame Zugabe von Pufferlösung PL 02 bis zu einem Gesamtvolumen von 800 µl ebenfalls mit zwischenzeitlicher Anwendung von Ultraschall – dabei Auftretung von Trübungen; unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Tab. 13: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Centellae asiaticae herba*-Extrakten

Probe	14	14 Blind	15	15 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extrakt 1	100 µl	100 µl	-	-
Extrakt 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

*9.1.1.7.4 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus Solanum dulcamara L.*Methode 1

- Extrakt: Dulcamarae e stip. sicc., bezogen von Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach, Ch.-B.: 99120044
- Extraktlösung 1: 5,0 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung PL 02 mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert, Überstand verwendet
- Extraktlösung 2: 4,96 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung PL 02 mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst, unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet
- Extraktlösung 3: 1:1-Verdünnung der filtrierten Extraktlösung 2 mit Pufferlösung PL 02
- Extraktlösung 4: 5,19 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung PL 02 mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert, Überstand 1:1 mit Pufferlösung PL 02 verdünnt
- Extraktlösung 5: 4,71 mg Extrakt in 300 µl DMSO unter Einwirkung von Ultraschall gelöst; mit Pufferlösung PL 02 auf 1 ml aufgefüllt; von dieser Lösung 500 µl entnommen und mit 150 µl DMSO und weiteren 350 µl Pufferlösung PL 02 versetzt

Method 2

- Fraktionslösung 1: 4,96 mg methanolisch-wässrige Fraktion (Herstellung siehe 9.4.2) in 1 ml Pufferlösung PL 02 mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; unlösliche Reste abzentrifugiert; Überstand verwendet
- Fraktionslösung 2: 5,78 mg Niederschlag mit Methanol (Herstellung siehe 9.4.2) in 1 ml Pufferlösung PL 02 mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; unlösliche Reste abzentrifugiert; Überstand verwendet
- Fraktionslösung 3: 2,51 mg methanolischer Auszug aus wasserunlöslichem Anteil (Methanol-lösliche Fraktion) des Extraktes (Herstellung siehe 9.4.2) in 300 µl DMSO mittels Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsam insgesamt 700 µl Pufferlösung PL 02 zugegeben; dabei aufgetretene Trübung abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet
- Fraktionslösung 4: 3,01 mg bzw. 1,21 mg der Hexan/Diethylether-Fraktion (Herstellung siehe 9.4.2) in 300 µl DMSO mittels Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsam insgesamt 700 µl Pufferlösung PL 02 zugegeben; dabei aufgetretene Trübung abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet
- Fraktionslösung 5: 5,04 mg bzw. 3,34 mg der Chloroform/Ethanol-Fraktion (Herstellung siehe 9.4.2) in 300 µl DMSO mittels Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsam insgesamt 700 µl Pufferlösung PL 02 zugegeben
- Fraktionslösung 6: 1,70 mg der Hexan/Diethylether-Fraktion zusammen mit 2,13 mg der Chloroform/Ethanol-Fraktion (Herstellung siehe 9.4.2) in 300 µl DMSO mittels Ultraschall und Probenschüttler gelöst; langsam insgesamt 700 µl Pufferlösung PL 02 zugegeben; dabei aufgetretene Trübung abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

9.1.1.7.5 Ligandenfischen aus Extrakten der Zwiebel von *Allium sativum* L.

Extraktlösung 1: 2,74 mg ethanolisches Mazerat (Herstellung siehe 9.2.1.1) in 1 ml Pufferlösung PL 02 gelöst

Extraktlösung 2: 2,54 mg ethanolischer Extrakt in 100 µl DMSO mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; tropfenweise Zugabe von Pufferlösung PL 02 bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml (Herstellung siehe 9.2.1.2)

Extraktlösung 3: frisch hergestellter wässriger Extrakt (Herstellung siehe 9.2.1.3)

Tab. 16: Pipettierschema Ligandenfischen aus verschiedenen Extrakten der Knoblauchzwiebel

Probe	28	28 Blind	29	29 Blind	30	30 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 3	-	-	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 03	U 03	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.6 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Chelidonii herba*

Extrakt: Extract. Chelidonii sicc., bezogen von Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Ch.-B.: 70714455

Extraktlösung: 5,13 mg Extrakt in 500 µl Ethanol mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst und mit Pufferlösung PL 02 auf 1 ml aufgefüllt; 100 µl dieser Lösung mit 900 µl Pufferlösung PL 02 verdünnt; Verdünnung verwendet

Tab. 17: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Chelidonii herba*-Extrakt

Probe	31	31 Blind
TGT	53,3 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	146,7 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60min
Filtrationsmethode	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 06	K 06
Einspritzvolumen	1,4 µl	1,4 µl

9.1.1.7.7 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Crataegus*-Arten

Extrakt: Crategi e fol. cum flor. spir. sicc., bezogen von Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach, Ch.-B.: 98120590

Extraktlösung 1: 5,05 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung PL 02 unter Anwendung von Ultraschall und Probenschüttler gelöst

Extraktlösung 2: 1:1-Verdünnung der Extraktlösung 1 mit Pufferlösung PL 02

Tab. 18: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Crataegus*-Extrakt

Probe	32	32 Blind	33	33 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04 + K 05	K 04 + K 05	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.8 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Millefolii herba*

Extrakt: Millefolii e herb. aquos. sicc., bezogen von Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach, Ch.-B.: 98121215

Extraktlösung 1: 5,03 mg bzw. 4,65 mg bzw. 5,24 mg Extrakt in 1 ml Pufferlösung PL 02 unter Anwendung von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 2: 1:1-Verdünnung der Extraktlösung 1 mit Pufferlösung PL 02

Tab. 19: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Millefolii herba*-Extrakt

Probe	34	34 Blind	35	35 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min bzw. 90 min	60 min bzw. 90 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl bzw. 40 µl	20 µl bzw. 40 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl bzw. 0,300 µl	0,150 µl bzw. 0,300 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.9 Ligandenfischen aus *Opiumtinktur*

Lösung 1: 4,95 mg bzw. 2,82 mg getrocknete Opiumtinktur unter Zuhilfenahme von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Pufferlösung PL 02 gelöst

Lösung 2: 1:1-Verdünnung der Lösung 1 mit Pufferlösung PL 02

Tab. 20: Pipettierschema Ligandenfischen aus Opiumtinktur

Probe	36	36 Blind	37	37 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Lösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Lösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min bzw. 75 min	60 min bzw. 75 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.10 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Quebracho cortex*

Herstellung der Extrakte siehe Abschnitt 9.2.2.1.

Extraktlösung 1: 1,05 mg des selektiven methanolischen Extraktes aus dem analytischen Ansatz in 300 µl DMSO unter Einwirkung von Ultraschall und mit Hilfe des Probenschüttlers gelöst; anschließend tropfenweise Zugabe von Pufferlösung PL 02 bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml; unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Extraktlösung 2: 1,06 mg des selektiven Dichlormethanextraktes aus dem analytischen Ansatz in 300 µl DMSO unter Einwirkung von Ultraschall und mit Hilfe des Probenschüttlers gelöst; anschließend tropfenweise Zugabe von Pufferlösung PL 02 bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml; unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Tab. 21: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Quebracho cortex*-Extrakten

Probe	38	38 Blind	39	39 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 03	U 03	U 03	U 03
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.11 Ligandenfischen aus einem methanolischen Extrakt aus *Rauwolfiae radix*

Extrakt: Extraktgewinnung durch O. Wachsmuth; genaue Angaben dazu in Literatur [103]

Extraktlösung 1: 4,96 mg des selektiven methanolischen Extraktes aus *Rauwolfiae radix* unter Anwendung von Ultraschall und mit Hilfe des Probenschüttlers in 1 ml Pufferlösung PL 02 gelöst; unlösliche Bestandteile abfiltriert durch HPLC-Membranfilter 3 mm/0,2 µm (Roth); Filtrat verwendet

Extraktlösung 2: 1:1-Verdünnung der Extraktlösung 1 mit Pufferlösung PL 02

Tab. 22: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem methanolischen Extrakt der *Rauwolfiawurzel*

Probe	40	40 Blind	41	41 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.12 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Urticae folium*

- Extrakt: *Urticae e fol. aquos. sicc.*, bezogen von Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach, Ch.-B.: 99120733
- Extraktlösung: 5,25 mg des Trockenextraktes mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 300 µl DMSO gelöst; langsame Zugabe von insgesamt 500 µl Pufferlösung PL 02; Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile; Überstand verwendet

Tab. 23: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem Trockenextrakt aus *Urticae folium*

Probe	42	42 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 03	U 03
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.13 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Vitex agnus-castus L.*

- Extraktlösung 1: 5,36 mg des Extraktes mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 500 µl Ethanol gelöst; anschließend 500 µl Pufferlösung PL 02 zugesetzt; von dieser Lösung 100 µl mit 900 µl Pufferlösung PL 02 verdünnt; Verdünnung verwendet
- Extraktlösung 2: 3,90 mg bzw. 3,56 mg des Extraktes in 100 µl Ethanol mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; beim tropfenweisen Verdünnen mit insgesamt 900 µl Pufferlösung PL 02 ausgefallene Bestandteile mit HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC abgetrennt; Filtrat 1:1 mit Pufferlösung PL 02 verdünnt; Verdünnung verwendet
- Extraktlösung 3: 100 µl des Filtrats, wie unter Extraktlösung 2 beschrieben, mit 900 µl Pufferlösung PL 02 verdünnt

Tab. 24: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Vitex agnus-castus*-Extrakt

Probe	43	43 Blind	44	44 Blind	45	45 Blind	46	46 Blind
TGT	53,3 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-	-	-	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl	-	-	-	-
Extraktlösung 3	-	-	-	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	146,7 µl	200 µl	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	75 min	75 min	75 min	75 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 06	K 06	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	1,4 µl	1,4 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.7.14 Ligandenfischen mit verschiedenen Einzelsubstanzen

Methode 1

Substanzlösung 1: 0,85 mg Apigenin (Carl Roth KG, Karlsruhe) mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml DMSO gelöst; 50 µl dieser Lösung mit weiteren 950 µl DMSO verdünnt; 100 µl dieser Verdünnung durch tropfenweise Zugabe von 900 µl PL 02 auf eine Apigenin-Konzentration von 1,57 nmol/100 µl bei 10 %igem DMSO-Anteil gebracht

Substanzlösung 2: 0,99 mg Apigenin (Carl Roth KG, Karlsruhe) mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml DMSO gelöst; 400 µl dieser Lösung mit weiteren 600 µl DMSO verdünnt; 100 µl dieser Verdünnung mit abermals 900 µl DMSO versetzt; von dieser Lösung 100 µl mit 200 µl DMSO und 700 µl Pufferlösung PL 02 versetzt,

so dass in dieser verwendeten Lösung eine Konzentration von 1,47 nmol/100 µl an Apigenin bei einem DMSO-Anteil von 30 % resultierte

Tab. 25: Pipettierschema Ligandenfischversuche mit Apigenin

Probe	47	47 Blind	48	48 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Substanzlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Substanzlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
DMSO	20 µl	20 µl	-	-
Pufferlösung (PL 02)	130 µl	180 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	75 min	75 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 03	U 03	U 03	U 03
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

Methode 2

Die verwendeten Alkaloide Ajmalin, Yohimbin, Reserpin und Rescinnamin wurden von O. Wachsmuth aus *Rauwolfia radix* isoliert. Eine genaue Beschreibung der Isolierung befindet sich in Literatur [103].

Substanzlösung 1: 1,04 mg Ajmalin, 1,55 mg Yohimbin, 1,26 mg Reserpin und 1,2 mg Rescinnamin in je 1 ml DMSO mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; je 50 µl der Lösungen von Ajmalin und Yohimbin mit jeweils 950 µl DMSO und je 100 µl der Lösungen von Reserpin und Rescinnamin mit jeweils 900 µl DMSO verdünnt; je 100 µl dieser Verdünnungen mit je 900 µl Pufferlösung PL 02 versetzt; davon Herstellung eines 1:1:1:1 Gemisches (V:V:V:V) der Lösungen; Gemisch verwendet

Substanzlösung 2: 1,07 mg Ajmalin, 1,92 mg Yohimbin, 1,19 mg Reserpin und 1,12 mg Rescinnamin in je 1 ml DMSO mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst; je 500 µl der Ajmalin- und der Yohimbinlösung mit je 500 µl DMSO versetzt; je 100 µl dieser Verdünnung mit je 600 µl DMSO und je 300 µl Pufferlösung PL 02

verdünnt; je 100 µl der Reserpin- und der Rescinnaminlösung mit je 800 µl DMSO und je 100 µl Pufferlösung PL 02 versetzt; von den jeweils letzten Verdünnungsstufen Herstellung einer 1:1:1:1-Mischung aus jeweils 100 µl versetzt mit 600 µl Pufferlösung PL 02, Gemisch verwendet

Tab. 26: Pipettierschema Ligandenfischen mit Alkaloiden aus *Rauwolfia radix*

Probe	49	49 Blind	50	50 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Substanzlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Substanzlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
DMSO	20 µl	20 µl	-	-
Pufferlösung (PL 02)	130 µl	180 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	75 min	75 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 03	U 03	U 03	U 03
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

Methode 3

Substanzlösung 1: 1,82 mg bzw. 2,83 mg Desoxypeganin mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Pufferlösung PL 02 gelöst; Lösung mit Pufferlösung PL 02 auf eine Desoxypeganin-Konzentration von 0,182 µg/100 µl (1,06 nmol/100 µl) bzw. 0,283 µg/100 µl (1,65 nmol/100 µl) verdünnt

Substanzlösung 2: 3,13 mg Pegenon mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Pufferlösung PL 02 gelöst; Lösung mit Pufferlösung PL 02 auf eine Pegenon-Konzentration von 0,313 µg/100 µl (1,68 nmol/100 µl) verdünnt

Tab. 27: Pipettierschema Ligandenfischen mit Pegenon und Desoxypeganin

Probe	51	51 Blind	52	52 Blind
TGT	50 µl / 800 pmol	-	50 µl / 800 pmol	-
Substanzlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Substanzlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 02)	150 µl	200 µl	150 µl	200 µl
Inkubationstemperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 01	U 01	U 01	U 01
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	50 µl	50 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,300 µl	0,300 µl

9.1.1.8 Ligandenfischversuche mit IGF-1-RTK

Die allgemeine Durchführung der Versuche ist in Kapitel 5 näher beschrieben. In Abschnitt 9.1.1.3 sind genauere Angaben über das verwendete Protein aufgeführt. Die hinsichtlich der Inkubationstemperatur, des Inkubationsmediums sowie der Inkubationszeit optimierten Parameter wurden Literatur [104] entnommen. Es erfolgte lediglich im Verlaufe der Versuche eine Anpassung der Pufferzusammensetzung der Blindprobe an die Probe im Gegensatz zu der in der oben genannten Literatur beschriebenen Zusammensetzung.

9.1.1.8.1 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Centellae asiaticae herba*

Extraktlösung 1: 3,96 mg des Dichlormethanextraktes aus *Centellae asiaticae herba* gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03) mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 2: 3,64 mg des Dichlormethanextraktes aus *Centellae asiaticae herba* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 150 µl Ethanol gelöst; langsame Zugabe von insgesamt 850 µl Pufferlösung PL 03; Filtration durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Extraktlösung 3: 5,70 mg des Methanolextraktes aus *Centellae asiaticae herba* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Kinase-Assay-

Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 28: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Centellae asiaticae herba-Extrakten*

Probe	53	53 Blind	54	54 Blind	55	55 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 3	-	-	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl	-	200 µl	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 04	U 04	U 05	U 05	U 04	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermes- sung	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.2 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Liquiritiae radix*

Extraktlösung 1: 3,67 mg des Dichlormethanextraktes aus *Liquiritiae radix* gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03) mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 2: 1,08 mg des Dichlormethanextraktes aus *Liquiritiae radix* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 150 µl Ethanol gelöst; langsame Zugabe von insgesamt 850 µl Pufferlösung PL 03; Filtration durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Extraktlösung 3: 4,67 mg bzw. 3,96 mg des Methanolextraktes aus *Liquiritiae radix* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 29: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Liquiritiae radix*-Extrakten

Probe	56	56 Blind	57	57 Blind	58	58 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 3	-	-	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl	-	200 µl	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 05	U 04	U 05	U 05	U 04	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.3 Ligandenfischen aus Extrakten aus *Lichen islandicus*

Extraktlösung 1: 3,14 mg des Dichlormethanextraktes aus *Lichen islandicus* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 150 µl Ethanol gelöst; langsame Zugabe von insgesamt 850 µl Pufferlösung PL 03; Filtration durch HPLC-Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Extraktlösung 2: 4,74 mg des Methanolextraktes aus *Lichen islandicus* mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 30: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Lichen islandicus*-Extrakten

Probe	59	59 Blind	60	60 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 05	U 05	U 04	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.4 Ligandenfischen aus *Opiumtinktur*

Lösung: 4,69 mg des nach Abrotieren des Lösungsmittels verbliebenen Rückstandes der Tinktur gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03) mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 31: Pipettierschema Ligandenfischen aus *Opiumtinktur*

Probe	61	61 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-
Lösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 05	U 05
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.5 Ligandenfischen aus einem Extrakt aus *Passiflorae herba*

Extrakt: Passiflorae e herb. sicc.; Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach, Ch.-B.: 99120349

Extraktlösung: 4,66 mg mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 1 ml Pufferlösung PL 03 gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 32: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem *Passiflorae herba*-Extrakt

Probe	62	62 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 05	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	100 µl bzw. 20 µl	100 µl bzw. 20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,750 µl bzw. 0,150 µl	0,750 µl bzw. 0,150 µl

9.1.1.8.6 *Ligandenfischen aus einem selektiven Dichlormethanextrakt aus der Rinde von Prunus africana (HOOK. F.) KALKM.*

Extrakt: Extraktgewinnung durch S. Schleich; genaue Angaben dazu in Literatur [102]

Extraktlösung: 3,77 mg des Dichlormethanextraktes aus der Rinde von *Prunus africana* (HOOK. F.) KALKM. gelöst in 150 µl Ethanol mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler; langsame Zugabe von insgesamt 850 µl Pufferlösung PL 03; Filtration durch HPLC- Spritzenfilter S&S Spartan 13 mm/0,2 µm RC; Filtrat verwendet

Tab. 33: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem Extrakt der Rinde von *Prunus africana* (HOOK. F.) KALM.

Probe	63	63 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 05	U 05
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.7 *Ligandenfischen aus selektiven Extrakten aus Quebracho cortex sowie deren Fraktionen*

Methode 1

Extraktlösung 1: 4,88 mg des selektiven Wasserextraktes aus dem analytischen Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer PL 03; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 2: 5,25 mg, 4,62 mg, 4,36 mg, 1,04 mg, 0,47 mg, 1,07 mg bzw. 0,51 mg des selektiven Methanolextraktes aus dem analytischen Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer PL 03; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 3: 5,05 mg, 4,60 mg bzw. 5,17 mg des selektiven Methanol-Wasserextraktes aus dem analytischen Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer PL 03; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Extraktlösung 4: 2,61 mg des selektiven Dichlormethanextraktes aus dem analytischen Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer PL 03; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Methode 2

- Extraktlösung 1: Gesamtmenge an Fraktion 4 des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex aus analytischem Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 330 µl Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet
- Extraktlösung 2: Gesamtmenge an Fraktion 5 des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex aus analytischem Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 330 µl Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet
- Extraktlösung 3: Gesamtmenge an Fraktion 6 des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex aus analytischem Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 330 µl Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet
- Extraktlösung 4: Gesamtmenge an Fraktion 7 des selektiven Methanolextraktes aus Quebracho cortex aus analytischem Ansatz mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler in 330 µl Kinase-Assay-Puffer (PL 03) gelöst; unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 35: Pipettierschema Ligandenfischen aus Fraktionen des selektiven Methanolextraktes aus *Quebracho cortex*

Probe	70	70 Blind	71	71 Blind	72	72 Blind	73	73 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung 1	100 µl	100 µl	-	-	-	-	-	-
Extraktlösung 2	-	-	100 µl	100 µl	-	-	-	-
Extraktlösung 3	-	-	-	-	100 µl	100 µl	-	-
Extraktlösung 4	-	-	-	-	-	-	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 04)	-	200 µl	-	200 µl	-	200 µl	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 04	U 04	U 04	U 04	U 04	U 04	U 04	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl	0,150 µl

9.1.1.8.8 Ligandenfischen aus einem Trockenextrakt aus *Solanum dulcamara L.*

Extrakt: Dulcamarae e stip. sicc.; Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach, Ch.-B.: 99120044

Extraktlösung: 5,01 mg des Extraktes mit Hilfe von Ultraschall und Probenschüttler gelöst in 1 ml Kinase-Assay-Puffer (PL 03); unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; Überstand verwendet

Tab. 36: Pipettierschema Ligandenfischen aus einem Trockenextrakt aus Bittersüßstängeln

Probe	74	74 Blind
IGF-1-RTK	200 µl / 400 pmol	-
Extraktlösung	100 µl	100 µl
Pufferlösung (PL 03)	-	200 µl
Inkubationstemperatur	30 °C	30 °C
Inkubationszeit	60 min	60 min
Filtrationsmethode	U 04	U 04
Proben gelöst in Anfangsbedingungen	20 µl	20 µl
HPLC-Methode zur Probenvermessung	K 04	K 04
Einspritzvolumen	0,150 µl	0,150 µl

9.1.2 Chromatographie

9.1.2.1 HPLC-Geräte

Kapillar-HPLC

Gerät: Waters CapLC mit integriertem Autosampler und Probenrack für 48 Vials (Total recovery vial, 12 x 32 mm mit Schraubdeckel und PTFE / Silicon-Septum), PDA-Detektor mit Lichtleitertechnologie, Säulenofen und Vici-Injektionsventil mit 10 µl Dosierschleife. Pumpensystem aus drei Pumpen, die jeweils aus zwei alternierend fördernden Spritzenpumpen aufgebaut sind.

Datenverarbeitung: Dell OptiPlex GX 100 mit Intel Celeron-Prozessor und Micromass MassLynx NT Software Version 3.5.

Drucker: Epson Stylus Color 600

Konventionelle analytische HPLC

Pumpensysteme: Waters MSDS 600

Waters 600E

Controller: Waters 600

Waters 600 E

Detektor: Photodiodenarraydetektor Waters 991

Injektionsventil: Rheodyne 7125 (200 bzw. 300 μ l Dosierschleife)

Datenverarbeitung: NEC PowerMate 386/25 mit Waters Software 991

Plantron 386 mit Waters Software 991

Drucker: Waters 5200 Printer Plotter

Fraktionssammler: Gilson Abimed Fraction Collector, Model 202

Präparative HPLC

Pumpensysteme: Waters Prep LC 4000 System

Waters 2000 System

Controller: Waters 4000

Waters 2000

Detektor: Photodiodenarraydetektor Waters 990

Injektionsventil: Rheodyne 7725i (5100 bzw. 5148 μ l Dosierschleife)

Datenverarbeitung: NEC PowerMate2 mit Waters Software 991

Drucker: Waters 990 Plotter

9.1.2.2 Übersicht über die verwendeten kapillaren (K) und analytischen (A) HPLC-Systeme

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektor/ Detektion																								
K 01	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Isokratisch: 5% A, 95% B	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm																								
K 02	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>70</td><td>78</td><td>22</td></tr> <tr><td>104</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>114</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>124</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>144</td><td>5</td><td>95</td></tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	5	95	70	78	22	104	95	5	114	95	5	124	5	95	144	5	95	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm			
Zeit [min]	A [%]	B [%]																										
0	5	95																										
70	78	22																										
104	95	5																										
114	95	5																										
124	5	95																										
144	5	95																										
K 03	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>50</td><td>37</td><td>63</td></tr> <tr><td>70</td><td>70</td><td>30</td></tr> <tr><td>80</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>90</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>100</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>120</td><td>5</td><td>95</td></tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	5	95	50	37	63	70	70	30	80	95	5	90	95	5	100	5	95	120	5	95	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
Zeit [min]	A [%]	B [%]																										
0	5	95																										
50	37	63																										
70	70	30																										
80	95	5																										
90	95	5																										
100	5	95																										
120	5	95																										
K 04	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>80</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>90</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>110</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>170</td><td>5</td><td>95</td></tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	5	95	80	98	2	90	98	2	110	5	95	170	5	95	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm						
Zeit [min]	A [%]	B [%]																										
0	5	95																										
80	98	2																										
90	98	2																										
110	5	95																										
170	5	95																										

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektor/ Detektion
K 05	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
		Zeit [min] A [%] B [%]		
		0 5 95		
		50 37 63		
		70 70 30		
		80 95 5		
		90 95 5		
		110 5 95		
170 5 95				
K 06	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
		Zeit [min] A [%] B [%]		
		0 5 95		
		35 40 60		
		64 98 2		
		74 98 2		
		84 5 95		
		113 5 95		
K 07	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,0425% TFA Gradient: linear	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
		Zeit [min] A [%] B [%]		
		0 5 95		
		35 40 60		
		64 98 2		
		74 98 2		
		79 5 95		
		98 5 95		
K 08	Macherey&Nagel Nucleosil 100 C18-HD, 3 µm, 150 x 0,3 mm	A: Acetonitril/0,05% TFA B: Wasser/0,425% TFA Gradient: linear	5,0 µl/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
		Zeit [min] A [%] B [%]		
		0 5 95		
		80 95 5		
		90 95 5		
		100 5 95		
		120 5 95		
A 01	Macherey&Nagel Nucleosil 50-5 C18 EC 250 x 4,6 mm	A: Methanol/0,1% HCOOH B: Wasser/0,1% HCOOH Isokratisch: 32% A, 68% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektor/ Detektion
A 02	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 29% A, 71% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 03	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 15% A, 85% B	0,8 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 04	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 15% A, 85% B	0,72 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 05	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 22% A, 78% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 06	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 25% A, 75% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 07	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 30% A, 70% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 08	Macherey&Nagel Nucleodur C18 Gravity, 5 µm CC 250 x 4 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 10% A, 90% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 09	Macherey&Nagel Nucleodur C18 Gravity, 5 µm CC 250 x 4 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 13% A, 87% B	1,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
A 10	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 5 µm 250 x 4 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 25% A, 75% B	0,72 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm

9.1.2.3 Übersicht über die verwendeten präparativen HPLC-Systeme

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektor/ Detektion																					
P 01	Macherey&Nagel Nucleodur 100-5 C18 EC VP 250 x 21 mm	A: Methanol/0,1% HCOOH B: Wasser/0,1% HCOOH Isokratisch: 30% A, 70% B	20,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
P 02	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 μ m 250 x 25 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Isokratisch: 26% A, 74% B	28,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
P 03	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 μ m 250 x 25 mm	A: Methanol/0,15% TFA B: Wasser/0,15% TFA Gradient: Stufengradient	28,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>165</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>183</td> <td>16,5</td> <td>83,5</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>18,3</td> <td>81,7</td> </tr> <tr> <td>205</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>220</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	15	85	165	15	85	183	16,5	83,5	200	18,3	81,7	205	100	0	220	100	0
		Zeit [min]			A [%]	B [%]																			
		0			15	85																			
		165			15	85																			
		183			16,5	83,5																			
		200			18,3	81,7																			
205	100	0																							
220	100	0																							
P 04	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 μ m 250 x 25 mm	A: Methanol/1,0% HCOOH B: Wasser/1,0% HCOOH Isokratisch: 15% A, 85% B	28,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
P 05	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 μ m 250 x 25 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Gradient: linear	28,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>22</td> <td>78</td> </tr> <tr> <td>95</td> <td>22</td> <td>78</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>110</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	22	78	95	22	78	100	100	0	110	100	0						
		Zeit [min]			A [%]	B [%]																			
		0			22	78																			
		95			22	78																			
100	100	0																							
110	100	0																							
P 06	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 μ m 250 x 25 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Gradient: linear	28,0 ml/min	PDA: $\lambda =$ 200 – 400 nm																					
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>76</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>81</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>91</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>			Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	25	75	76	25	75	81	100	0	91	100	0						
		Zeit [min]			A [%]	B [%]																			
		0			25	75																			
		76			25	75																			
81	100	0																							
91	100	0																							

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase	Fluss	Detektor/ Detektion																																																																														
P 07	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 µm 250 x 25 mm	A: Methanol/0,15% HCOOH B: Wasser/0,15% HCOOH Gradient: linear <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>76</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>81</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>86</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	0	30	70	76	30	70	81	100	0	86	100	0	28,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm																																																															
Zeit [min]	A [%]	B [%]																																																																																
0	30	70																																																																																
76	30	70																																																																																
81	100	0																																																																																
86	100	0																																																																																
P 08	Macherey&Nagel Nucleodur C18 Gravity, 5 µm VP 250 x 21 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 10% A, 90% B	28,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm																																																																														
P 09	Macherey&Nagel Nucleodur C18 Gravity, 5 µm VP 250 x 21 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 13% A, 87% B	28,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm																																																																														
P 10	Merck Lichrospher 60 RP Select B, 15 µm 250 x 25 mm	A: Acetonitril/0,1% TFA B: Wasser/0,1% TFA Isokratisch: 25% A, 75% B	28,0 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm																																																																														
P 11	Macherey&Nagel Kieselgel 60, 15 – 25 µm in Merck Prepara- Edelstahl- kartusche 400 x 100 mm Probenzone: ca. 1 cm Trennbett: ca. 35 cm	A: Hexan/0,1% DEA B: Diethylether/0,1% DEA C: Methanol/0,1% DEA D: Wasser/0,1% DEA E: Gradient (Curve) Table 1 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> <th>C [%]</th> <th>D [%]</th> <th>E</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>490</td> <td>0</td> <td></td> <td>100</td> <td>0</td> <td>9</td> </tr> </tbody> </table> Ab min 200 Abbruch und Sprung in Table 2 Table 2 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> <th>C [%]</th> <th>D [%]</th> <th>E</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>99</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>490</td> <td>0</td> <td>96</td> <td>4</td> <td>0</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>540</td> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> <td>0</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>600</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>660</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>680</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>720</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	E	0	100	0	0	0	-	50	0	100	0	0	6	490	0		100	0	9	Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	E	0	0	99	1	0	-	100	0	98	2	0	6	490	0	96	4	0	7	540	0	90	10	0	7	600	0	0	100	0	6	660	0	0	100	0	6	680	0	0	0	100	6	720	0	0	0	100	6	100 ml/min	PDA: λ = 200 – 400 nm
Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	E																																																																													
0	100	0	0	0	-																																																																													
50	0	100	0	0	6																																																																													
490	0		100	0	9																																																																													
Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	E																																																																													
0	0	99	1	0	-																																																																													
100	0	98	2	0	6																																																																													
490	0	96	4	0	7																																																																													
540	0	90	10	0	7																																																																													
600	0	0	100	0	6																																																																													
660	0	0	100	0	6																																																																													
680	0	0	0	100	6																																																																													
720	0	0	0	100	6																																																																													

9.1.2.4 Verwendete Lösungsmittel

Für die Kapillar-HPLC wurden Lösungsmittel der Firma Merck in LiChrosolv[®] Gradient Grade-Qualität verwendet. Die für die konventionelle und präparative HPLC verwendeten Lösungsmittel der Firmen Merck, Promochem und Baxter hatten ebenfalls Gradient Grade-Qualität.

Wasser für die HPLC wurde über eine mit demineralisiertem Wasser gespeiste Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 C der Firma Seral mit Bakterienmembranfilter Supor DCF[™] CHS92DE, 0,2 µm (Fa. Gelman Sciences) gewonnen. Die Leitfähigkeit des Wassers lag bei Entnahme unter 0,1 µS/cm.

9.1.3 Spektroskopische Methoden

9.1.3.1 NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der Spektren wurde ein JEOL Eclipse+ 500 (500 MHz) Spektrometer verwendet. Die Werte der chemischen Verschiebung sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ-Skala. Die Kalibrierung erfolgte auf das Lösungsmittelsignal. Wurden Lösungsmittel verwendet, die in ¹H-Spektren kein Signal geben, wurde TMS zugegeben und auf dieses Signal geeicht. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

<i>s</i> = Singulett	<i>d</i> = Dublett	<i>t</i> = Triplett
<i>q</i> = Quartett	<i>sext</i> = Sextett	<i>m</i> = Multiplett
<i>dd</i> = Dublett eines Dubletts	<i>ddd</i> = Dublett von Dubletts vom Dublett	
<i>br</i> = breites Signal		

Die mathematische Bearbeitung und die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm JEOL Delta der JEOL (Germany) GmbH, Eching, Version 4.3.1.

Für die zum Einsatz gekommenen NMR-Experimente verwendeten Abkürzungen sind nachfolgend aufgelistet:

¹ H-NMR	vollständig gekoppeltes ¹ H-NMR-Spektrum
¹³ C-NMR	breitbandentkoppeltes ¹³ C-NMR-Spektrum
COSY	C orrelation S pectroscopy

HMQC	H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence
HMBC	H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation
APT	A ttached P roton T est

9.1.3.2 Massenspektroskopie

Die Messungen erfolgten mit einem doppelfokussierenden (EBE-Geometrie) VG Autospec-Massenspektrometer der Firma Micromass. Die Auflösung betrug 5000.

9.1.4 Weitere analytische Methoden

9.1.4.1 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop HM-LUX der Firma Leitz, gemessen und sind unkorrigiert in °C wiedergegeben.

9.2 Herstellung der Pflanzenextrakte

9.2.1 *Allium sativum* L.

Verschiedene Extrakte der Zwiebel von *Allium sativum* L. haben sich bei Untersuchungen an Shigellen als antibiotisch wirksam erwiesen [86]. Daher wurden Extrakte nach den in dieser Literatur [86] beschriebenen Extraktionsverfahren hergestellt.

9.2.1.1 Herstellung eines ethanolischen Mazerates aus dem Pulver der Zwiebel

20 g eines Pulvers der Knoblauchzwiebel (*Bulbus Allii sativi* plv., Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Ch.-B.: 23888472) wurden mit 50 %igem Ethanol versetzt und abgedeckt bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umrühren stehen gelassen. Nach sieben Tagen wurde das gewonnene Mazerat zunächst durch Zentrifugation (Sigma 3E-1, 4000 U/min, 20 min) von größeren unlöslichen Bestandteilen befreit. Die Klärfiltration des Überstandes erfolgte mittels eines Filtrationsgerätes (S&S mit Glasfaserfritte) und Glasfaserfilter (Whatman GF/F 0,7 µm, Ø 47 mm) unter Anlegen von Unterdruck (Membranpumpe ABM 3 EKF 63 cx-4). Das Filtrat wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Vakuum nachgetrocknet. Die Ausbeute an getrocknetem Extrakt betrug 9,88 g. Dies entspricht 49,4 % der eingesetzten Pulvermasse.

9.2.1.2 Herstellung eines ethanolischen Extraktes aus der frischen Zwiebel

Für die Extraktbereitung wurden die Zwiebeln des weißen Knoblauchs (Herkunftsland: Spanien, Ajos Bravos, NRS 2115196/V, 41520 EL Viso, L-00-11-54) verwendet. 20,1 g der geschälten Zwiebeln wurden mit 100 ml 50 %igem Ethanol in einem handelsüblichen Standmixer mit Glaskrug (Moulinex Deutschland GmbH, Q 50-Turbo-Blender, 400 W, 1,25 l-Glaskrug) in 5 min bei Stufe 2 zerkleinert. Nach Überführung der Masse in einen Erlenmeyerkolben erfolgte die weitere Zerkleinerung mit einem Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel IKA-Werk; Typ T45 mit Werkzeug S50N-G45M) unter Eiskühlung. Die Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte durch Zentrifugation (Sigma 3E-1, 4000 U/min, 20 min) und anschließende Filtration des Überstandes mittels eines Filtrationsgerätes (S&S mit Glasfaserfritte) und Glasfaserfilter (Whatman GF/F 0,7 µm, Ø 47 mm) unter Anlegen von Unterdruck (Membranpumpe ABM 3 EKF 63 cx-4). Der Rückstand der Zentrifugation wurde erneut mit 100 ml 50 %igem Ethanol wie eben beschrieben behandelt. Nach Vereinigung der erhaltenen Filtrate wurden diese am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Vakuum nachgetrocknet. Die Ausbeute an getrocknetem Extrakt betrug 5,04 g. Dies entspricht 25,1 % der eingesetzten Pflanzenmasse.

9.2.1.3 Herstellung eines wässrigen Extraktes aus der frischen Zwiebel

Zur Herstellung dieses Extraktes wurde dieselbe Charge der in Abschnitt 9.2.1.2 beschriebenen Knoblauchzwiebeln verwendet. 101,9 g der geschälten Zwiebeln wurden zusammen mit 100 ml bidemineralisiertem Wasser in einem handelsüblichen Standmixer mit Glaskrug (Moulinex Deutschland GmbH, Q 50-Turbo-Blender, 400 W, 1,25 l-Glaskrug) in 5 min bei Stufe 2 zerkleinert. Die erhaltene Knoblauchmasse wurde durch ein Koliertuch aus Baumwolle filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde zur Beseitigung von Schwebstoffen für 20 min einer Zentrifugation bei 2000 U/min und anschließend für 10 min bei 4000 U/min (Digifuge, Heraeus) unterzogen. Der Überstand wurde durch Spritzenvorsatzfilter (WiCom Opti-Flow, 0,45 µm, regenerierte Cellulose) filtriert. Das Filtrat fand in den zu dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ohne vorherige Trocknung umgehende Verwendung.

9.2.2 *Aspidosperma quebracho-blanco* SCHLECHT.

9.2.2.1 Selektive Extrakte im analytischen Maßstab

Die von der Caesar & Loretz GmbH, Hilden, bezogene, geschnittene Rinde der Pflanze, Cortex Quebracho conc. DAC 1999, Ch.-B.: 10703052, wurde in einer handelsüblichen, elektrischen Kaffeemühle (Tchibo „Aroma Garant“) mit der Zerkleinerungsstufe 3 gemahlen. 49,5 g der gemahlenden Rinde wurden in einem Erlenmeyerkolben in 200 ml n-Hexan mittels eines Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel IKA-Werk; Typ T45 mit Werkzeug S50N-G45M) unter Eiskühlung weiter zerkleinert. Die Suspension wurde anschließend mittels einer Porzellanfilternutsche (Ø 90 mm) durch einen Filter (S&S, Ref.No: 300109, 589² Weißband, Ø 90 mm) unter Anlegung eines mit einer Membranpumpe (ABM (Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz), Typ: 3EKF63cx-4) erzeugten Unterdrucks filtriert. Der Rückstand wurde in den Kolben zurück geführt und abermals mit 200 ml n-Hexan wie oben beschrieben behandelt. Der nach erneuter Filtration erhaltene Rückstand wurde wiederum mit 200 ml n-Hexan wie beschrieben ausgezogen und die erhaltene Suspension filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden noch einmal mittels eines Filtrationsgerätes mit Glasfaserfritte (S&S) durch einen Filter engerer Porenweite (Glasfaservorfilter, Whatman, GF/F, 0,7 µm, Ø 47 mm in Kombination mit S&S Membranfilter, RC58, 0,2 µm, Ø 47 mm) ebenfalls unter Anlegung eines Unterdrucks (Membranpumpe, ABM (Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz), Typ: 3EKF63cx-4) filtriert. Das nunmehr erhaltene Filtrat wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet.

Mit dem Rückstand des mit n-Hexan behandelten Rindenmaterials wurde nun drei Mal mit je 200 ml Dichlormethan nach der gleichen Art und Weise verfahren, wie bereits mit n-Hexan beschrieben. Das resultierende Filtrat dieses selektiven Dichlormethanextraktes wurde ebenfalls am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet.

Der aus der Behandlung mit Dichlormethan verbliebene Rückstand wurde nun sechs Mal einer Behandlung mit je 200 ml Methanol unterzogen. Die dabei verwendete Verfahrensweise war dieselbe, wie schon beim Auszug des Rindenmaterials mit n-Hexan

beschrieben. Das resultierende Filtrat dieses selektiven Methanolextraktes wurde ebenfalls am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet.

Der nun folgende Auszug des aus der vorangegangenen Behandlung mit Methanol verbliebenen Rückstandes des Drogenmaterials wurde, wie beim Auszug mit n-Hexan beschrieben, drei mal mit je 200 ml eines 1:1-Gemisches aus Methanol und Wasser ausgezogen. Auch dieses resultierende Filtrat des selektiven Methanol-Wasserextraktes wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet.

Abschließend wurde der nun verbliebene Rückstand mit 200 ml Wasser in der gleichen Art und Weise, die schon bei Auszug mit den anderen Lösungsmitteln beschrieben wurde, behandelt und getrocknet.

Der Auszug mit dem entsprechenden Lösungsmittel erfolgte solange, bis das erhaltene Filtrat nicht mehr oder nur noch leicht gefärbt war.

Tab. 37: Ausbeute der selektiven Extraktion von Quebracho cortex in analytischem Maßstab

Selektiver Extrakt	Verwendetes Lösungsmittelvolumen [ml]	Auswaage [mg]	Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]
n-Hexan	600	99,10	0,20
Dichlormethan	600	186,56	0,38
Methanol	1200	1287,65	2,60
Methanol/Wasser = 50/50	600	952,50	1,93
Wasser	200	257,17	0,52
Gesamt	3200	2782,98	5,63

9.2.2.2 Selektive Extrakte im präparativen Maßstab

Für die Herstellung von selektiven Extrakten aus Quebracho cortex in diesem Maßstab musste eine größere Menge der Droge beschafft werden (Quebracho cortex conc. DAC, Ch.-B./Lot: 2283/6500017, bezogen von der KMF Laborchemie Handels-GmbH). Die Droge sollte mittels einer Durchflussextraktion ausgezogen werden. Dazu wurde die geschnittene Rinde in einer handelsüblichen, elektrischen Kaffeemühle (Tchibo „Aroma Garant“) mit der Zerkleinerungsstufe 1 gemahlen. 3268 g der gemahlenden Droge wurden in Portionen zu je etwa 500 g mit jeweils 1,5 l n-Hexan bzw. einmal etwa 250g mit

750 ml n-Hexan mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel IKA-Werk; Typ T45 mit Werkzeug S50N-G45M) in einem 4-l-Rundkolben unter Eiskühlung weiter zerkleinert.

Das so erhaltene Homogenisat wurde in eine beidseitig unter bzw. über der Droge mit einer dünnen Schicht aus Seesand (Roth, reinst, mit Säure gereinigt) und mit Stahlfritten (Rückhaltevermögen 2 µm) verschlossenes Stahlrohr, bestehend aus zwei miteinander verbundenen Edelstahlkartuschen (Merck Preppar, jeweilige Abmessungen: 400 x 100 mm, Säulenvolumen 3150 ml) gefüllt und erschöpfend mit Elutionsmitteln steigender Polarität unter Zuhilfenahme einer HPLC-Pumpe extrahiert. n-Hexan und Dichlormethan wurden dabei von unten nach oben durch das Pflanzenmaterial gepumpt. Für die dann folgenden Elutionsmittel wurde die Fließrichtung gewechselt. Die Flussrate lag bei maximal 10 ml/min. Die mit den einzelnen Lösungsmitteln erzielten Eluate wurden getrennt gesammelt, am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei etwa 40 °C im Wasserbad vom Lösungsmittel befreit, an der Ölpumpe unter Vakuum nachgetrocknet und gewogen.

Tab. 38: Ausbeute der selektiven Extraktion von *Quebracho cortex* in präparativem Maßstab

Elutionsmittel	Durchflussvolumen [l]	Ausbeute [g]	Ausbeute [% der eingesetzten Drogenmenge]
n-Hexan	19,0	9,44	0,29
Dichlormethan	49,5	90,08	2,76
Methanol	33,7	63,80	1,95
Methanol/Wasser = 50/50	49,7	62,50	1,91
Wasser	28,8	14,70	0,45
Gesamtvolumen	187,0	240,52	7,36

9.2.3 *Centella asiatica* (L.) URBAN

Das von der Caesar & Loretz GmbH, Hilden, bezogene, geschnittene Kraut der Pflanze, *Centellae asiaticae herba conc.*, Ch.-B.: 02509222, wurde in einer handelsüblichen, elektrischen Kaffeemühle (Tchibo „Aroma Garant“) mit der Zerkleinerungsstufe 1 gemahlen. Die gemahlene Droge wurde in zwei Portionen á 2 g geteilt und in Zentrifugengläser gefüllt. Auf die eine Portion wurden 7 ml Dichlormethan, auf die andere 7 ml Methanol gegeben und jeweils für 2 x 2 min mit einem Ultraschallstab (Banson, Sonifier 250, Constant, Duty Cycle, Output Control = 4) behandelt. Unlösliche Bestandteile

wurden abzentrifugiert (Heraeus, Digifuge, 3000 U/min, 25 min) und der jeweilige Überstand anschließend abpipettiert. Die verbliebenen Rückstände wurden mit 5 ml Dichlormethan bzw. 5 ml Methanol versetzt, mit dem Ultraschallstab erneut für 2 x 2 min behandelt, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert, Überstände abpipettiert und mit den zuvor erhaltenen Überständen vereinigt. Die Rückstände wurden ein zweites Mal mit je 5 ml des entsprechenden Lösungsmittels versetzt und wie zuvor beschrieben behandelt. Die vereinigten Überstände wurden am Rotavapor bei etwa 40 °C im Wasserbad und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und an der Ölpumpe unter Stickstoffkühlung nachgetrocknet und anschließend gewogen.

9.2.4 Cetraria islandica L.

Die von der Caesar & Loretz GmbH, Hilden, bezogene, geschnittene Droge der Pflanze, Lichen islandicus conc. DAB 9, Ch.-B.: 70519527, wurde in einer handelsüblichen, elektrischen Kaffeemühle (Tchibo „Aroma Garant“) mit der Zerkleinerungsstufe 1 gemahlen. Mit der gemahlene Droge wurde ebenso wie mit dem gemahlene Kraut von Centella asiatica (L.) URBAN (9.2.3) verfahren. Es wurden 44,15 mg an Methanol-extrakt und 11,29 mg an Dichlormethanextrakt erhalten.

9.2.5 Glycyrrhiza glabra L.

Je 2 g der von der Caesar & Loretz GmbH, Hilden, bezogenen, gepulverten Droge der Wurzel der Pflanze, Radix Liquiritiae mundat. Plv. Sbt., Ch.-B.: 22040182, wurden gleichermaßen wie die des gemahlene Wassernabelkrautes (9.2.3) behandelt. Die Ausbeute an methanolischem Extrakt betrug 137,17 mg, die an Dichlormethanextrakt 7,52 mg.

9.2.6 Papaver somniferum L. ssp. somniferum

Die Tinktur wurde aus Opium, dem getrockneten Milchsaft der angeschnittenen, unreifen Früchte von Papaver somniferum L. ssp. somniferum hergestellt. Nach Mazeration des Opiums mit 70 %igem Ethanol bei Raumtemperatur über 3 Tage unter gelegentlichem Rühren wurde der Ansatz filtriert. Das aufgefangene Filtrat wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei ca. 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt.

9.2.7 Vitex agnus-castus L.

Der für die Versuche zu der vorliegenden Arbeit verwendete Extrakt wurde durch Abziehen des Lösungsmittels am Rotavapor bei vermindertem Druck und ca. 40 °C im Wasserbad aus dem Fertigarzneimittel Castufemin N (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Ch.-B.: 810230) gewonnen.

9.3 Verwendete Trockenextrakte

Tab. 39: Übersicht über die verwendeten Trockenextrakte

Stammpflanze	Extraktbezeichnung	Bezugsquelle
Achillea millefolium L.	Millefolii e herb. aquos. sicc., Ch.-B.: 98121215	Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach
Chelidonium majus L.	Extract. Chelidonii sicc., Ch.-B.: 70714455	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Crataegus monogyna JACQ. emend. LINDM. bzw. Crataegus laevigata (POIR.) DC	Crategi e fol. cum flor. spir. sicc., Ch.-B.: 98120590	Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach
Passiflora incarnata L.	Passiflorae e herb. sicc., Ch.-B.: 99120349	Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach
Solanum dulcamara L.	Dulcamarae e stip. sicc., Ch.-B.: 99120044	Finzelberg GmbH & Co. KG; Andernach
Urtica dioica L. bzw. Urtica urens L.	Urticae e fol. aquos. sicc., Ch.-B.: 99120733	Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach

9.4 Bearbeitung verschiedener Extrakte und Isolierung von Reinsubstanzen

9.4.1 Bearbeitung des Trockenextraktes aus Passiflorae herba

Zunächst wurden präparative HPLC-Trennungen des Trockenextraktes (Passiflorae e herb. sicc., Ch.-B.: 99120349, Finzelberg, Andernach) mit einer VP 250/21 Nucleodur 100-5 C18 EC – HPLC-Säule (Macherey&Nagel) nach analytischer Optimierung der Trennbedingungen (A01) durchgeführt. Als mobile Phase diente eine Mischung aus 30 % Methanol und 70 % Wasser unter Zusatz von 0,1 % Ameisensäure (P01). Es wurden insgesamt 8 g des methanolischen Trockenextraktes in 160 ml einer Mischung aus Methanol/Wasser = 50/50 mit Hilfe von Ultraschall gelöst, filtriert (Filtrationsgerät S&S GV 050/1; Glasfaser-Vorfilter S&S GF92, Ø 40 mm; Membranfilter S&S RC 58, 0,2 µm, Ø 47 mm; Pumpe Vacuubrand) und in Mengen zu je 5 ml eingespritzt. Die

erhaltenen 12 Fraktionen wurden am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei etwa 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt. Dabei wurde Toluol eingesetzt, um die Ameisensäure aus der Probe zu entfernen und somit ein zu saures Milieu zu vermeiden. Die Proben wurden an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet, gewogen und kapillarchromatographisch auf ihre Zusammensetzung untersucht (K03).

Die Trennungen brachten allerdings nicht die gewünschten Ergebnisse hinsichtlich der Menge der isolierten Substanzen. Deshalb wurde das chromatographische System umgestellt, indem die stationäre Phase durch Lichrospher 60 RP Select B (Merck) ersetzt wurde. Die analytische Optimierung erfolgte zunächst nach Methode A02. Nach Upscaling der Methode auf den präparativen Maßstab wurden 15,2 g Extrakt in 61 Trennungen mit Methode P02 in 15 Fraktionen getrennt. Dazu wurde der Trockenextrakt in 304 ml einer Mischung aus 25 % Methanol und 75 % Wasser unter Zusatz von 0,15 % Ameisensäure im Ultraschallbad gelöst und anschließend filtriert (Filtrationsgerät S&S GV 050/1; Glasfaser-Vorfilter S&S GF92, Ø 40 mm; Membranfilter S&S RC 58, 0,2 µm, Ø 47 mm; Pumpe Vacuubrand). Der Verlust an Extrakt durch die Filtration betrug 4,4 %. Die erhaltenen 15 Fraktionen wurden am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei etwa 40 °C im Wasserbad unter Toluolzusatz bis zur Trockne eingengt, an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet und gewogen.

Die erhaltenen Fraktionen wurden kapillarchromatographisch auf Anwesenheit der aus dem Gesamtextrakt gefischten Verbindung überprüft (K03).

Tab. 40: Übersicht über die mit der präparativen Trennung erhaltenen Fraktionen

Fraktion	Auswaage [mg]	Ausbeute [% der eingesetzten Extraktmenge]
1	14294,0	94,0
2	362,8	2,4
3	168,9	1,1
4	225,4	1,5
5	137,5	0,9
6	273,8	1,8
7	228,5	1,5
8	174,7	1,1
9	199,2	1,3
10	126,4	0,8
11	288,8	1,9
12	218,3	1,4
13	102,5	0,7
14	319,7	2,1
15	1417,0	9,3
Gesamt	18537,5	129,0

9.4.1.1 Isolierung von Reinsubstanzen aus den Fraktionen des Trockenextraktes

Die Fraktionen 6, 7, 11, 12 und 14 aus der im vorherigen Abschnitt beschriebenen präparativen Trennung wurden mit Hilfe weiterer präparativer RP-chromatographischer Methoden und teilweise anschließender Umkristallisierung bis zur Reinheit des entsprechenden Flavonoids nachgetrennt. Die Reinheit konnte mit analytischen HPLC-Verfahren bestätigt werden.

Tab. 41 gibt einen Überblick über die durchgeführten Trennschritte.

Tab. 41: Übersicht über die Isolierung der Flavonoide aus *Passiflorae herba-Extrakt*

Fraktion	6	7	11	12	14
Analytisch optimierte HPLC-Methode A	A03	A04	A05	A06	A07
Präparative HPLC-Methode A	P03 (7 Trennungen)	P04 (6 Trennungen)	P05	P06	P07
Lösung der Fraktion für präparative HPLC-Trennung A	Vollständig in 5 ml MeOH/H ₂ O 15/85	Vollständig in 5 ml MeOH/H ₂ O 15/85	Vollständig in 3 ml MeOH/H ₂ O 1:2	Vollständig in 2 ml 25/75 MeOH/H ₂ O	Vollständig in 7 ml 30/70 MeOH/H ₂ O
Umkristallisation	Unterfraktion 06/14 (51,39 mg) aus Methanol/Wasser = 1:1 (V/V) bei RT umkristallisiert	Unterfraktion 07/14 (55,55 mg) aus Methanol/Wasser = 1:2 (V/V) bei RT und anschließend bei 8 °C umkristallisiert	Unterfraktion 11/04 (53,77 mg) tropfenweise in 10,5 ml einer Mischung aus Methanol/Wasser = 2:1 (V/V) gelöst und einer fraktionierenden Kristallisation mit Wasser als Vorlage im Kristallisationspilz für 14 Tage bei RT unterworfen	-	-

Fraktion	6	7	11	12	14
Analytisch optimierte HPLC-Methode B	-	A08	-	A 09	-
Präparative HPLC-Methode B	-	P08 (3 Trennungen)	-	P 09 (3 Trennungen)	-
Lösung der Unterfraktion aus der präparativen HPLC-Trennung A für präparative HPLC-Trennung B	-	Kristalle aus Unterfraktion 07/14 (26,3 mg) vollständig gelöst in 1,8 ml Methanol und 7,2 ml Wasser	-	Unterfraktion 12/05 vollständig (27 mg) gelöst in 1,7 ml Acetonitril/Wasser = 13/87	-
Isolierte Substanz (Auswaage dieser Substanz)	Isoschaftosid (5) (18,56 mg)	Schaftosid (4) (20,1 mg)	Vitexin (3) (8,98 mg)	Isovitexin-2''-O-β-glucosid (1) (19,9 mg)	Isovitexin (2) (86,44 mg)

9.4.2 Bearbeitung des Trockenextraktes aus *Solanum dulcamara* L.

Die Bearbeitung erfolgte in Anlehnung an die in Literatur [141] beschriebene Vorgehensweise.

20,0 g eines Trockenextraktes aus den Stängeln von *Solanum dulcamara* L. (*Dulcamarae* e stip. sicc., Finzelberg GmbH & Co. KG, Andernach, Ch.-B.: 99120044) wurden mit 100 ml bidemineralisiertem Wasser versetzt und unter ständigem Rühren einer 15minütigen Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend innerhalb von 20 min bei 5000 U/min abzentrifugiert (Zentrifuge: Sigma 3E-1), der Überstand abpipettiert und der Rückstand erneut mit 100 ml bidemineralisiertem Wasser in gleicher Art und Weise wie zuvor behandelt. Der nun erhaltene Rückstand wurde noch ein drittes Mal ebenso mit 100 ml bidemineralisiertem Wasser behandelt. Die erhaltenen hellbraunen, klaren Überstände wurden vereinigt und 13 Mal mit je 100 ml eines 1:1-Gemisches aus n-Hexan und Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase färbte sich dabei grün.

Die verbliebene wässrige Phase wurde mit Kaliumcarbonat (Merck, reinst) auf pH 9,5 eingestellt und anschließend 30 mal mit je 100 ml eines 2:1-Gemisches aus Chloroform und Ethanol ausgeschüttelt, bis die anfangs stark gelb gefärbte organische Phase nur noch eine leichte Färbung aufwies. Beim jeweiligen Eingießen der organischen in die wässrige Phase trat in der wässrigen Phase ein hellbrauner Niederschlag auf, der jedoch mit steigender Anzahl an Ausschüttelungen weniger wurde.

Die nunmehr verbliebene wässrige Phase, wie auch die organische Phase wurden mit der Dragendorff-Reaktion auf das Vorhandensein von Alkaloiden überprüft. Beide Fraktionen zeigten eine positive Reaktion.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass eine Abtrennung der Alkaloide aus der alkalisierten, wässrigen Phase durch Niederschlagsbildung mit Methanol möglich ist. Deshalb wurde ein Niederschlag mit zunächst 400 ml Methanol aus der wässrigen Phase gebildet. Dieser hellbraune Niederschlag wurde mittels eines Büchner-Trichters und eines Glasfaserfilters (Whatman GF/D, 3 μ m, \varnothing 10 cm) unter Anlegen eines Unterdruckes (Membranpumpe Vacuubrand MZ20/2.4) abgetrennt. Zum Filtrat wurde erneut Methanol zugegeben und der entstandene Niederschlag wiederum durch Filtration abgetrennt.

Dies geschah solange, bis keine weitere Niederschlagsbildung mehr auftrat. Das verbliebene Filtrat wurde mittels Büchner-Trichter und Glasfaserfilter (Whatman GF/F, 0,7 μm , \varnothing 10 cm) unter Anlegen eines Unterdruckes (Membranpumpe Vacuubrand MZ20/2.4) und anschließend mittels eines Filtrationsgerätes mit Glasfaserfritte (S&S) durch einen Membranfilter (S&S RC58, 0,2 μm , \varnothing 47 mm) mit einem aus Glasfaser bestehenden Vorfilter (Whatman GF/F 0,7 μm , \varnothing 47 mm) ebenfalls unter Anlegen eines Unterdruckes (Membranpumpe Vacuubrand MZ20/2.4) klarfiltriert. Die verbliebene wässrige Phase zeigte keine positive Dragendorff-Reaktion mehr.

Die Niederschläge wurden durch Waschen der Filter in bidemineralisiertem Wasser vereinigt. Dabei abgelöste Filterfasern wurden mittels eines Filtrationsgerätes mit Glasfaserfritte (S&S) durch einen Membranfilter (S&S RC58, 0,2 μm , \varnothing 47 mm) mit einem aus Glasfaser bestehenden Vorfilter (Whatman GF/F 0,7 μm , \varnothing 47 mm) ebenfalls unter Anlegen eines Unterdruckes (Membranpumpe Vacuubrand MZ20/2.4) von der Lösung abgetrennt.

Der anfangs in Wasser unlösliche Anteil des Trockenextraktes wurde nun mit 100 ml Methanol unter Behandlung im Ultraschallbad ausgezogen. Die auch in Methanol unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch eine 20minütige Zentrifugation (Zentrifuge: Sigma 3E-1) bei 4000 U/min abgetrennt. Nach Abpipettieren des braungrünen Überstandes wurde der verbliebene Rückstand erneut mit 100 ml Methanol in gleicher Art und Weise ausgezogen. Mit dem jeweils verbliebenen Rückstand wurde noch zwei Mal mit je 100 ml Methanol ebenso verfahren. Die Überstände wurden vereinigt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden am Rotavapor unter vermindertem Druck bei etwa 40 °C im Wasserbad vom jeweiligen Lösungsmittel befreit und an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet.

Tab. 42: Massenverteilung nach Fraktionierung des methanolischen Trockenextraktes aus *Dulcamarae stipites*

Fraktion	Auswaage [g]	Ausbeute [% des eingesetzten Trockenextraktes]
Hexan/Diethylether-lösliche Fraktion	0,14	0,70
Chloroform/Ethanol-lösliche Fraktion	2,40	12,00
Methanolisch-wässrige Phase	14,02	70,10
Niederschlag mit Methanol	5,19	25,95
Methanol-lösliche Fraktion	0,62	3,10
Methanol-unlösliche Fraktion	0,15	0,75
Gesamt	22,52	112,60

9.4.3 Bearbeitung des selektiven Dichlormethanextraktes aus *Quebracho cortex*

Die Herstellung des verwendeten Extraktes ist in Abschnitt 9.2.2.2 beschrieben.

9.4.3.1 Analytische Entwicklung einer geeigneten extrographischen Methode

Zunächst musste der selektive Dichlormethanextrakt aus *Quebracho cortex* auf Kieselgel aufgezogen werden. Dazu wurden 2,0 g des selektiven Dichlormethanextraktes aus *Quebracho cortex* in 800 ml Dichlormethan unter Behandlung im Ultraschallbad gelöst. Nach Zugabe von 10,0 g Kieselgel (Merck Si 60, 63 – 200 μm) zu dieser Lösung und erneuter Behandlung im Ultraschallbad unter langsamer Drehung des Kolbens bis zur deutlichen Aufhellung der überstehenden Lösung wurde das Lösungsmittel am Rotavapor bei leicht vermindertem Druck und ca. 40 °C im Wasserbad wieder abgezogen. Dabei entstand ein trockenes, leicht rieselfähiges Material, wobei das Extrakt-Kieselgelverhältnis 1:5 betrug (2,0 g selektiver Dichlormethanextrakt in 12,0 g aufgezogenem Extrakt).

Für die analytische Entwicklung der Extrographie wurden zwischen 300 und 600 mg des aufgezogenen Extraktes verwendet, was einer reinen Extraktmenge an selektivem Extrakt von 50 – 100 mg entsprach.

Der auf Kieselgel aufgezogene Extrakt wurde dazu in eine bereits mit einer dünnen Schicht aus feinem Kieselgel (Macherey&Nagel Kieselgel 60, 15 – 25 μm) befüllten Edelstahlkartusche (250 x 10 mm) gefüllt. Die weitere Befüllung erfolgte mit feinem Kieselgel in dünnen Schichten, wobei jede Schicht durch Andruck mit einem Stampfwerkzeug geeigneten Durchmessers komprimiert wurde. Dies führte zu einer möglichst dichten und homogenen Packung der Säule.

Die an beiden Enden mit Stahlfritten und HPLC-Säulenköpfen verschlossene Kartusche wurde nun in Fließrichtung an eine HPLC-Anlage angeschlossen. Zunächst wurde solange n-Hexan bzw. n-Hexan/DEA durch die Säule gepumpt, bis keine Luftblasen mehr austraten. Nach nun folgendem Anschluss des Säulenausgangs an den Detektor wurde das jeweilige Gradientenprogramm gestartet. Nach mehrmaliger Durchführung der hier beschriebenen Extrographie unter Anwendung verschiedener Gradienten konnte ein geeigneter Gradient gefunden werden. Zur Ermittlung dieses geeigneten Gradienten wurden während der durchgeführten Extrographien Fraktionen im 10-min-Rhythmus gesammelt (Gilson Abbimed Fraction Collector, Model 202), an der SpeedVac (SpeedVac-Concentrator SVC 100 H, Firma Bachofer) getrocknet, in je 1 ml Dichlormethan wieder aufgenommen und kapillarchromatographisch (Methode K 04) vermessen. Die erhaltenen Chromatogramme wurden beziehungsweise auf die mit dem Ligandenfischen mit IGF-1-RTK erhaltenen Chromatogramme hinsichtlich der gefischten Substanzen ausgewertet. Eine weitere Optimierung der Gradientenextrographie erfolgte dann hinsichtlich einer besonders guten Abtrennung dieser Substanzen. Der optimierte Gradient wurde auf die dann folgende präparative Gradientenextrographie übertragen.

9.4.3.2 Präparative Gradientenextrographie

Ausgehend von den in Abschnitt 9.4.3.1 beschriebenen, optimierten Parametern wurden 16,0 g des selektiven Dichlormethanextraktes aus Quebracho cortex in insgesamt 6400 ml Dichlormethan mit Hilfe von Ultraschall in einem Rundkolben gelöst. Zu dieser Lösung wurden insgesamt 80 g Kieselgel (Merck Si 60, 63 – 200 μm) gegeben. Unter Ultraschallbehandlung bei langsamer Drehung des Kolbens sowie nachfolgender langsamer Entfernung des Lösungsmittels am Rotavapor bei geringfügig vermindertem Druck und ca. 40 °C im Wasserbad wurde der Extrakt auf das Kieselgel aufgezogen.

Der aufgezogene Extrakt wurde in eine modifizierte Edelstahlkartusche (Merck Preprar, 400 x 100 mm) mit variablem Säulenkopf gegeben, die bereits am unteren Ende mit einer dünnen Schicht aus feinem Seesand (Roth, reinst, mit Säure gereinigt) und einer dünnen Schicht aus feinem Kieselgel (Macherey&Nagel Kieselgel 60, 15 – 25 μm) gefüllt war.

Die weitere Befüllung der Säule mit Kieselgel (Macherey&Nagel Kieselgel 60, 15 – 25 μm) erfolgte in Analogie zu den analytischen Ansätzen mit einem geeigneten

Stampfwerkzeug. Um eine möglichst homogene Kieselgelpackung zu erzeugen, wurde zusätzlich während des Füllvorgangs mit Hilfe einer 4-Kammer-Membranpumpe ein Unterdruck angelegt. Die Säule wurde bis etwa 3 cm unter den Säulenrand gefüllt, wobei eine dünne Schicht aus feinem Seesand den Abschluss bildete. Nach Entfernen von Kieselgelresten am Säulenrand wurde die Kartusche mit dem variablen Säulenkopf verschlossen und der Anpressdruck an der Millimeterskala des Säulenkopfes auf eine Eintauchtiefe von 41 mm justiert.

Die Säule wurde in Fließrichtung langsam mit 99,9 % n-Hexan / 0,1 % DEA geflutet, bis keine Luftblasen mehr am oberen Säulenende austraten. Das dabei aufgefangene Eluat wurde später mit Fraktion 1 vereinigt.

Vor Beginn des Gradientenprogramms wurde die Flussrate innerhalb von 15 min langsam auf den Endwert von 100 ml/min gesteigert. Nach anschließend erfolgtem Start des Gradientenprogramms wurde die Trennung über einen Zeitraum von 920 min durchgeführt (P 11).

Die Verwendung von Diethylether erforderte als besondere Sicherheitsmaßnahme die Erdung der 25-l-Vorratsbehälter für die mobile Phase, der Kapillaren, der HPLC-Pumpen und der Säule.

Tab. 43: Ergebnisse der präparativen Gradientenextrographie des selektiven Dichlormethanextraktes aus *Quebracho cortex*

Fraktion	Retentionszeit [min]	Auswaage [mg]	Ausbeute [% des eingesetzten Extraktes]
1	0-28	4,38	0,03
2	28-43	200,42	1,25
3	43-71	413,01	2,58
4	71-99	354,33	2,21
5	99-127	93,01	0,58
6	127-153	31,91	0,20
7	153-181	44,91	0,28
8	181-210	77,40	0,48
9	210-237	47,09	0,29
10	237-263	59,28	0,37
11	263-291	126,38	0,79
12	291-307	103,95	0,65
13	307-329	154,09	0,96
14	329-349	181,78	1,14
15	349-375	233,32	1,46
16	375-387	86,93	0,54
17	387-397	56,12	0,35
18	397-425	140,28	0,88
19	425-453	42,61	0,27
20	453-478	117,88	0,74
21	478-500	120,19	0,75
22	500-516	113,70	0,71
23	516-536	164,93	1,03
24	536-556	141,69	0,89
25	556-580	147,42	0,92
26	580-600	96,08	0,60
27	600-608	36,11	0,23
28	608-630	99,81	0,62
29	630-656	91,47	0,57
30	656-678	93,87	0,59
31	678-700	107,54	0,67
32	700-714	59,25	0,37
33	714-738	99,98	0,62
34	738-756	236,80	1,48
35	756-777	748,08	4,68
36	777-801	6140,0	38,38
37	801-830	4527,0	28,29
38	830-858	885,03	5,53
39	858-879	429,89	2,69
40	879-900	1807,44	11,30
41	900-920	311,64	1,95
Gesamt	0-920	19026,97	118,92

9.4.3.3 Isolierung von Substanzen aus den Extrographiefractionen

Die Isolierung und Identifizierung von Aspidospermin (**6**) gelang aus den vereinigten Fraktionen 14 – 16 der präparativen Gradientenextrographie. Dazu wurden die Fraktionen in 10 ml Acetonitril gelöst. Dabei bildete sich über einem beigen, unlöslichen Bestandteil ein dunkelbrauner Überstand. Die Abtrennung erfolgte durch Filtration mittels eines Filtrationsgerätes mit Glasfaserfilter (S&S) durch einen Membranfilter (S&S RC58, 0,2 µm, Ø 47 mm). Filtrat und Rückstand wurden am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei ca. 40 °C im Wasserbad vom Lösungsmittel befreit. Das Filtrat wurde erneut mit wenig Acetonitril versetzt. Der wiederum nicht lösliche Rückstand wurde wie oben beschrieben durch Filtration abgetrennt. Um eine möglichst vollständige Abtrennung des Aspidospermins (**6**) zu erreichen, wurde so lange wie beschrieben verfahren, bis auch nach Stehenlassen über zehn Stunden bei Raumtemperatur in der Acetonitrillösung des Filtrates keine unlöslichen Bestandteile mehr zu erkennen waren. Die Rückstände wurden vereinigt und ebenso wie das verbliebene Filtrat kapillarchromatographisch überprüft (K 04). Durch anschließende fraktionierende Kristallisation des Rückstandes aus Acetonitril/Dichlormethan (3:10 = V:V) konnten 64,54 mg Aspidospermin (**6**) gewonnen werden.

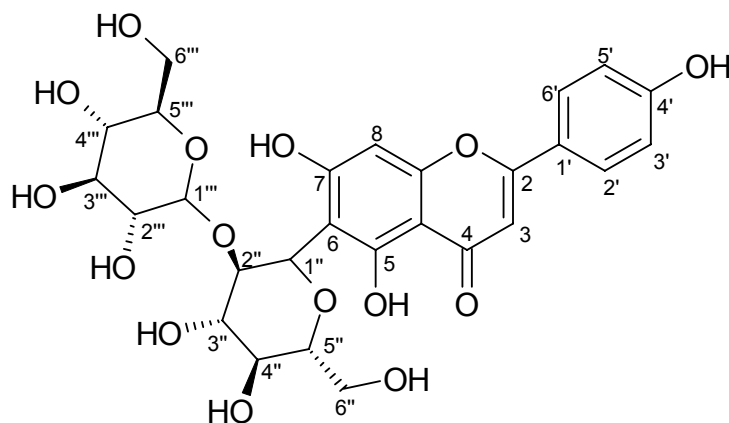
Aus der Fraktion 34 der präparativen Extrographie konnte ein weiteres Alkaloid gewonnen werden. Dazu wurde die Fraktion mit 2 ml Acetonitril versetzt. Der dunkelbraune Überstand wurde vom beigen Rückstand durch Filtration getrennt (Filtrationsgerät S&S mit Glasfaserfilter; Glasfaservorfilter 0,7 µm; Ø 47 mm; Membranfilter S&S RC58, 0,2 µm, Ø 47 mm). Rückstand und Filtrat wurden am Rotavapor unter vermindertem Druck und bei ca. 40 °C im Wasserbad bis zur Trockne eingengt. Das Filtrat wurde erneut mit 2 ml Acetonitril versetzt. Der nun verbliebene Rückstand wurde wie oben beschrieben durch Filtration abgetrennt und mit dem ersten Rückstand vereinigt. Die Proben wurden wie oben beschrieben getrocknet, an der Ölpumpe unter Anlegen eines Vakuums nachgetrocknet, gewogen und kapillarchromatographisch überprüft (K04). Das Filtrat (160 mg), das die gesuchte Substanz enthielt, wurde in 10 ml Acetonitril (0,1 % TFA) und 3 ml Wasser (0,1 % TFA) gelöst und nach analytischer Optimierung der Trennparameter (A10) in 25 Trennungen präparativ getrennt (P10).

Es konnten 71,55 mg dieses Alkaloids isoliert werden.

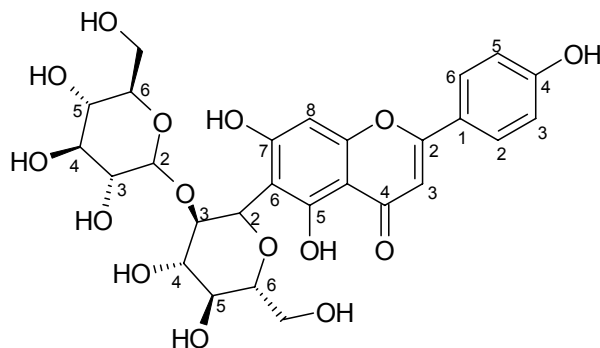
9.5 Verzeichnis der isolierten Substanzen

Die Nummerierung der Kohlenstoffatome der hier aufgeführten Substanzen erfolgte in dieser Arbeit nach der in der Literatur üblichen Bezifferung. Zusätzlich ist für die Flavonoide (Substanzen 1 - 5) in diesem Abschnitt die Bezifferung und die Namensgebung nach Beilstein angegeben.

9.5.1 Isovitexin-2''-O- β -glucosid (1)



$C_{27}H_{30}O_{15}$



(Nummerierung nach Beilstein)

6-[(3R,4S,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-hydroxymethyl-3-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yloxy)-tetrahydropyran-2-yl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-chromen-4-on (Benennung nach Beilstein)

Amorphe, hellbraune Substanz

Identifiziert in: Fraktion 12/05/U07 aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Passiflorae herba*

UV: λ_{max} : 217, 271, 340 nm (Acetonitril-Wasser-TFA =13:87:0,1)

¹H-NMR (DMSO-D6, 500 MHz, 50 °C), δ (ppm):

13.60 (1H, <i>brs</i> , C-5-OH)	10.60 (1H, <i>brs</i> , OH)
10.24 (1H, <i>brs</i> , OH)	7.90 (2H, <i>d</i> , $^3J = 8.7$ Hz, C-2'-H, C-6'-H)
6.93 (2H, <i>d</i> , $^3J = 8.9$ Hz, C-3'-H, C-5'-H)	6.72 (1H, <i>s</i> , C-3-H)
6.48 (1H, <i>s</i> , C-8-H)	5.34 (2H, <i>brs</i> , OH, OH)
4.68 (1H, <i>d</i> , $^3J = 9.85$ Hz, C-1''-H)	4.41 (1H, <i>brs</i> , C-2''-H)
4.19 (1H, <i>d</i> , $^3J = 7.55$ Hz, C-1'''-H)	3.69 (1H, <i>d</i> , $^3J = 11.45$ Hz, C-6''-Ha)
3.43 (2H, <i>m</i> , C-6''-Hb, C-6'''-Ha)	3.19 (3H, <i>m</i> , C-5''-H, C-4''-H, C-6'''-Hb)
3.06 (2H, <i>t</i> , $^3J = 8.7, 8.95$ Hz, C-3''-H, C-4'''-H)	
2.99 (1H, <i>t</i> , $^3J = 9.15, 9.4$ Hz, C-3'''-H)	
2.87 (1H, <i>t</i> , $^3J = 8.45, 8.25$ Hz, C-2'''-H)	2.66 (1H, <i>brs</i> , C-5'''-H)

¹³C-NMR (DMSO-D6, 125 MHz, 80 °C), δ (ppm):

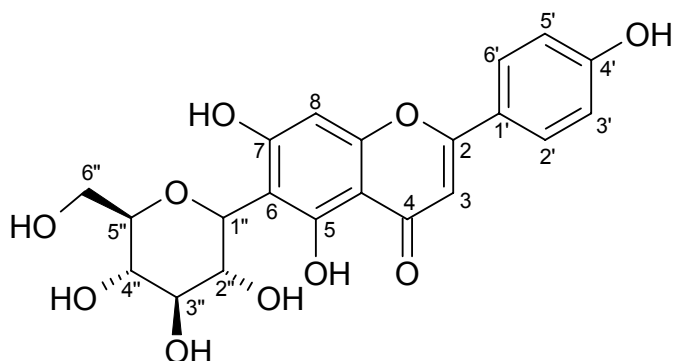
181.7 (C-4)	163.5 (C-7)	163.0 (C-2)
160.8 (C-5)	160.7 (C-4')	156.3 (C-9)
128.1 (C-2', C-6')	121.2 (C-1')	115.8 (C-3', C-5')
108.0 (C-6)	104.7 (C-1'')	103.3 (C-10)
102.7 (C-3)	93.4 (C-8)	81.0 (C-5'')
80.4 (C-2'')	78.2 (C-3'')	76.3 (C-3''')
75.9 (C-5''')	74.5 (C-2''')	71.2 (C-1''')
70.3 (C-4'')	69.8 (C-4''')	61.3 (C-6'')
60.7 (C-6''')		

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

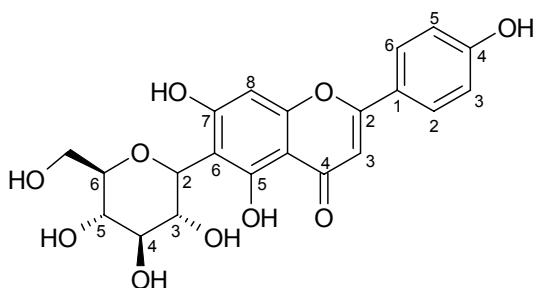
Berechnet: 617,148241 für $[M+Na]^+$

Gefunden: 617,144030

9.5.2 Isovitexin (2)



$C_{21}H_{20}O_{10}$



(Nummerierung nach Beilstein)

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-((3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yl)-chromen-4-on (Benennung nach Beilstein)

Dunkelgelbe Kristalle

Identifiziert in: Fraktion 14/04 aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Pasiflorae herba*

Schmelzpunkt: 193 – 196 °C

UV: λ_{\max} : 214, 270, 337 nm (Acetonitril-Wasser-TFA = 34:66:0,05)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6 , 500 MHz, 35 °C), δ (ppm):

13.53 (1H, *s*, C-5-OH)

10.33 (1H, *brs*, OH)

7.91 (2H, *d*, $^3J = 8.5$ Hz, C-2'-H, C-6'-H)

6.92 (2H, *d*, $^3J = 8.5$ Hz, C-3'-H, C-5'-H)

6.76 (1H, *s*, C-3-H)

6.50 (1H, *s*, C-8-H)

4.80 (2H, *brs*, OH, OH)

4.59 (2H, *d*, $^3J = 9.85$ Hz, C-1''-H, OH)

4.42 (2H, *brs*, OH)

4.02 (2H, *t*, $^3J = 8.9, 9.2$ Hz, C-2''-H, OH)

3.68 (1H, *d*, $^3J = 11.45$ Hz, C-6''-Ha)

3.41 (1H, *dd*, $^3J = 11.45$ Hz, $^2J = 5.3, 5.5$ Hz, C-6''-Hb)

3.30 (2H, *m*, C-3''-H, C-4''-H)

3.20 (1H, *m*, C-5''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-D₆, 125 MHz, 35 °C), δ (ppm):

181.9 (C-4)

163.5 (C-2)

163.1 (C-7)

161.1 (C-4')

160.6 (C-5)

156.2 (C-9)

128.4 (C-2', C-6')

121.1 (C-1')

115.9 (C-3', C-5')

108.8 (C-6)

103.4 (C-10)

102.7 (C-3)

93.6 (C-8)

81.4 (C-5'')

78.8 (C-3'')

73.0 (C-1'')

70.5 (C-2'')

70.2 (C-4'')

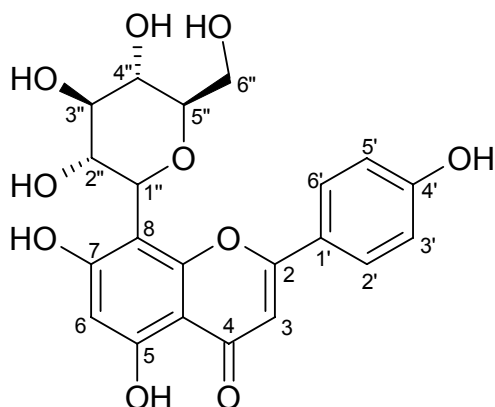
61.4 (C-6'')

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

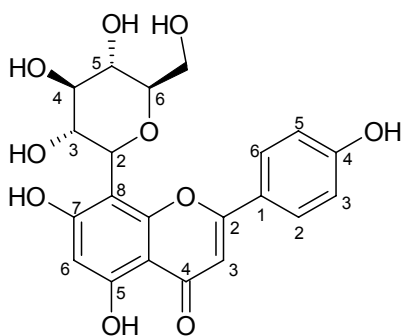
Berechnet: 455,095417 für $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gefunden: 455,087752

9.5.3 Vitexin (3)



$C_{21}H_{20}O_{10}$



(Nummerierung nach Beilstein)

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-((3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yl)-chromen-4-on (Benennung nach Beilstein)

Hellgelbes Pulver

Identifiziert in: Fraktion 11/04 aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Pasiflorae herba* nach fraktionierender Kristallisation

Schmelzpunkt: 249 – 252 °C (unter Zersetzung)

UV: λ_{\max} : 215, 270, 335 nm (Methanol-Wasser-Ameisensäure = 78:22:0,15)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6 , 500 MHz, 30 °C), δ (ppm):

13.15 (1H, *s*, C-5-OH)

10.80 (1H, *brs*, C-7-OH)

10.31 (1H, *brs*, C-4'-OH)

- 8.01 (2H, *d*, $^3J = 8.7$ Hz, C-2'-H, C-6'-H)
 6.88 (2H, *d*, $^3J = 8.7$ Hz, C-3'-H, C-5'-H)
 6.76 (1H, *s*, C-3-H)
 6.26 (1H, *s*, C-6-H)
 4.96 (1H, *d*, $^3J = 5.25$ Hz, OH)
 4.94 (1H, *d*, $^3J = 4.4$ Hz, OH)
 4.68 (2H, *d*, $^3J = 9.8$ Hz, C-1''-H, OH)
 4.57 (1H, *t*, $^3J = 5.6$ Hz, C-6''-OH)
 3.83 (1H, *t*, $^3J = 8.9, 9.2$ Hz, C-2''-H)
 3.76 (1H, *ddd*, $^3J = 10.8$ Hz, $^2J = 5.95$ Hz, C-6''-Ha)
 3.52 (1H, *ddd*, $^3J = 11.8$ Hz, $^2J = 5.7, 5.55$ Hz, C-6''-Hb)
 3.37 (1H, *ddd*, $^3J = 19.8, 9.05$ Hz, $^2J = 5.5$ Hz, C-4''-H)
 3.27 (1H, *m*, C-3''-H)
 3.25 (1H, *m*, C-5''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-D₆, 125 MHz, 30 °C), δ (ppm):

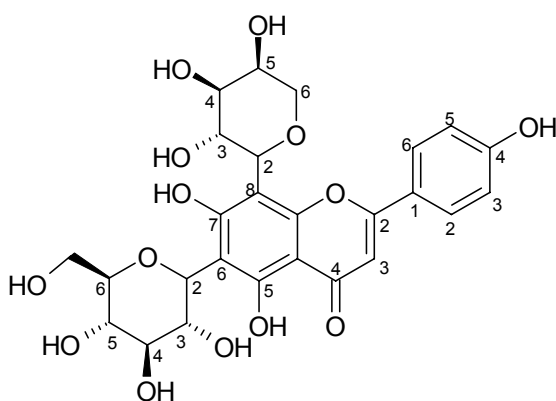
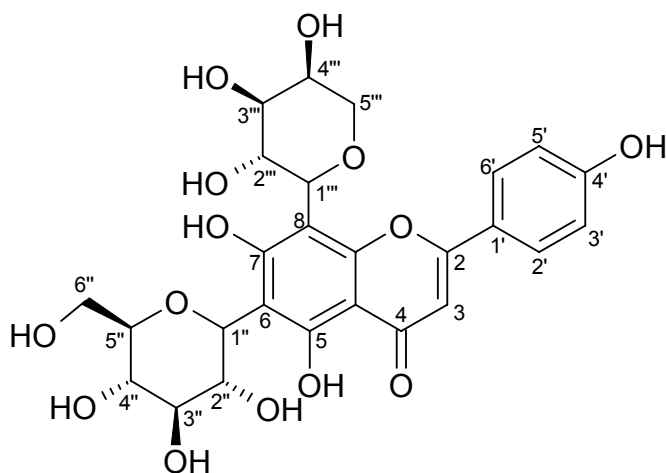
182.0 (C-4)	163.9 (C-2)	162.5 (C-9)
161.1 (C-4')	160.3 (C-5)	155.9 (C-7)
128.9 (C-2', C-6')	121.6 (C-1')	115.7 (C-3', C-5')
104.6 (C-8)	104.0 (C-10)	102.4 (C-3)
98.1 (C-6)	81.8 (C-5'')	78.6 (C-3'')
73.3 (C-1'')	70.8 (C-2'')	70.5 (C-4'')
61.2 (C-6'')		

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

Berechnet: 433,113472 für $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gefunden: 433,113366

9.5.4 Schaftosid (4)



(Nummerierung nach Beilstein)

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-((3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yl)-8-((3R,4S,5S)-3,4,5-trihydroxytetrahydropyran-2-yl)-chromen-4-on (Benennung nach Beilstein)

Braune Kristalle

Identifiziert in: Fraktion 07/14/U12 aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Passiflorae herba*

Schmelzpunkt: 190 - 192 °C (unter Zersetzung)

UV: λ_{max} : 215, 270, 340 nm (Acetonitril-Wasser-TFA = 10:90:0,1)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz, 80 °C), δ (ppm):

13.74 (1H, <i>brs</i> , C-5-OH)	10.02 (1H, <i>brs</i> , OH)
9.21 (1H, <i>s</i> , OH)	8.06 (2H, <i>d</i> , ³ J = 6.85 Hz, C-2'-H, C-6'-H)
6.92 (2H, <i>d</i> , ³ J = 8.7 Hz, C-3'-H, C-5'-H)	6.72 (1H, <i>s</i> , C-3-H)
4.80 (1H, <i>d</i> , ³ J = 9.6 Hz, C-1''-H)	4.75 (1H, <i>d</i> , ³ J = 9.85 Hz, C-1''-H)
4.08 (1H, <i>m</i> , C-2'''-H)	3.94 (1H, <i>m</i> , C-5'''-Ha)
3.91 (1H, <i>m</i> , C-2''-H)	3.88 (1H, <i>m</i> , C-4'''-H)
3.71 (1H, <i>m</i> , C-6''-Ha)	3.68 (1H, <i>m</i> , C-5'''-Hb)
3.54 (1H, <i>m</i> , C-6''-Hb)	3.52 (1H, <i>dd</i> , ³ J = 8.94, 2.98 Hz, C-3'''-H)
3.29 (3H, <i>m</i> , C-3''-H, C-4''-H, C-5''-H)	

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 125 MHz, 80 °C), δ (ppm):

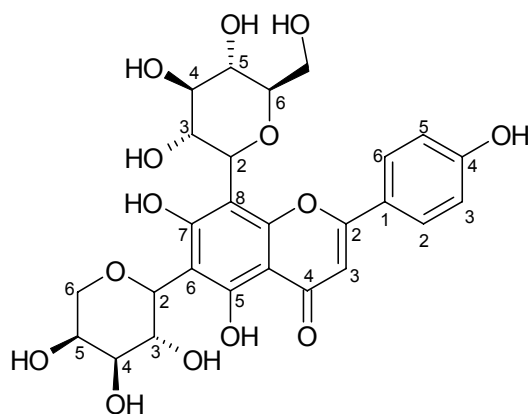
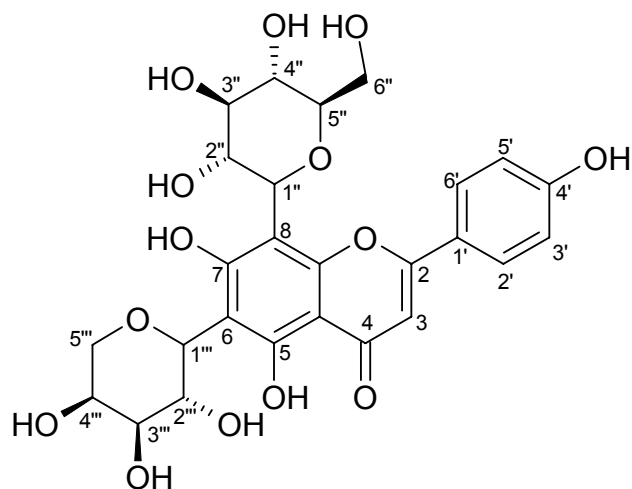
181.9 (C-4)	163.7 (C-2)	161.2 (C-7)
160.8 (C-5)	159.2 (C-4')	154.1 (C-9)
128.6 (C-2', C-6')	121.1 (C-1')	115.7 (C-3', C-5')
108.1 (C-6)	103.9 (C-8)	103.3 (C-10)
102.1 (C-3)	81.0 (C-5'')	78.4 (C-3''')
74.8 (C-1''')	74.2 (C-3''')	73.3 (C-1'')
70.7 (C-2'')	70.5 (C-5''')	70.0 (C-4'')
68.9 (C-2''')	68.5 (C-4''')	60.7 (C-6'')

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

Berechnet: 587,137676 für [M+Na]⁺

Gefunden: 587,137302

9.5.5 Isoschaftosid (5)



(Nummerierung nach Beilstein)

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-((3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yl)-6-((3R,4S,5S)-3,4,5-trihydroxytetrahydropyran-2-yl)-chromen-4-on (Benennung nach Beilstein)

Dunkelgelbe bis hellbraune Kristalle

Identifiziert in: Fraktion 06/14 aus dem methanolischen Trockenextrakt aus *Pasiflora herba* nach Umkristallisation

Schmelzpunkt: 195 – 200 °C (unter Zersetzung)

UV: λ_{max} : 215, 270, 335 nm (Methanol-Wasser-Ameisensäure = 15:85:0,15)

¹H-NMR (DMSO-D6, 500 MHz, 30 °C), δ (ppm):

13.66 (1H, <i>s</i> , C-5-OH)	10.31 (1H, <i>brs</i> , OH)
9.17 (1H, <i>brs</i> , OH)	8.02 (2H, <i>d</i> , ³ J = 8.7 Hz, C-2'-H, C-6'-H)
6.89 (2H, <i>d</i> , ³ J = 8.7 Hz, C-3'-H, C-5'-H)	6.80 (1H, <i>s</i> , C-3-H)
4.98 (2H, <i>m</i> , C-4''-OH, OH)	4.83 (1H, <i>d</i> , ³ J = 5.05 Hz, C-3'''-OH)
4.75 (1H, <i>d</i> , ³ J = 10.1 Hz, C-1''-H)	4.71 (1H, <i>d</i> , ³ J = 9.6 Hz, C-1'''-H)
4.55 (1H, <i>t</i> , ³ J = 5,6 Hz, C-6''-OH)	3.89 (1H, <i>t</i> , ³ J = 9.4 Hz, C-2''-H)
3.83 (2H, <i>m</i> , C-5'''-Ha, C-2'''-H)	3.75 (1H, <i>dd</i> , ³ J = 11.9, 5.7 Hz, C-6''-H)
3.64 (1H, <i>d</i> , ³ J = 11.45 Hz, C-5'''Hb)	
3.52 (1H, <i>ddd</i> , ³ J = 11.9 Hz, ² J = 5.7 Hz, C-6''-H)	
3.46 (1H, <i>d</i> , ³ J = 8.0 Hz, C-3'''-H)	
3.40 (1H, <i>ddd</i> , ³ J = 13.3, 4.6 Hz, ² J = 4.8, 4.12, 5.04 Hz, C-4''-H)	
3.29 (2H, <i>m</i> , C-3''-H, C-4'''-H)	3.25 (1H, <i>dd</i> , ³ J = 13.5, 8.9 Hz, C-5''-H)

¹³C-NMR (DMSO-D6, 125 MHz, 30 °C), δ (ppm):

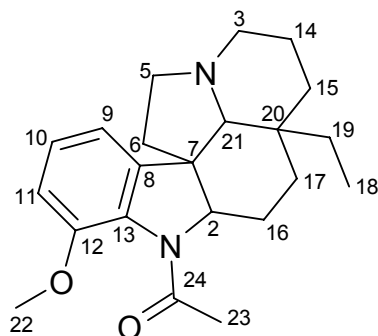
182.2 (C-4)	164.0 (C-2)	161.1 (C-7)
160.9 (C-5)	158.1 (C-4')	155.0 (C-9)
128.9 (C-2', C-6')	121.5 (C-1')	115.7 (C-3', C-5')
108.0 (C-6)	105.0 (C-8)	103.6 (C-10)
102.5 (C-3)	81.8 (C-5''')	78.8 (C-3''')
74.1 (C-1'')	73.8 (C-3'')	73.2 (C-1''')
70.9 (C-2''')	70.5 (C-4''')	70.1 (C-5'')
69.5 (C-2'')	68.4 (C-4'')	61.2 (C-6''')

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

Berechnet: 587,137676 für [M+Na]⁺

Gefunden: 587,135609

9.5.6 Aspidospermin (6)



$C_{22}H_{30}N_2O_2$ (MG = 354.491)

Hellbeige Nadeln

Identifiziert in: Extrographiefractionen 14 – 16 des selektiven Dichlormethan-extraktes aus Quebracho cortex

Schmelzpunkt: 195 – 196 °C

UV: λ_{max} : 218, 254, 308 nm (Acetonitril-Wasser-TFA = 39,5:60,5:0,05)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 25 °C), δ (ppm):

7.00 (1H, <i>dd</i> , $^3J = 7.9, 8.0$ Hz, C-10-H)	6.76 (1H, <i>d</i> , $^3J = 9.4$ Hz, C-9-H)
6.74 (1H, <i>d</i> , $^3J = 8.5$ Hz, C-11-H)	4.58 (1H, <i>brs</i> , C-2-H)
3.81 (3H, <i>brs</i> , C-12-OCH ₃)	3.05 (1H, <i>t</i> , $^3J = 7.9$ Hz, C-5-Ha)
2.96 (1H, <i>d</i> , $^3J = 8.5$ Hz, C-3-Ha)	2.17 (1H, <i>m</i> , C-5-Hb)
2.14 (1H, <i>m</i> , C-21-H)	2.12 (1H, <i>m</i> , C-22-H)
1.96 (2H, <i>m</i> , C-6-Ha, C-17-Ha)	1.87 (2H, <i>m</i> , C-3-Hb, C-16-Ha)
1.66 (1H, <i>q</i> , $^3J = 12.8$ Hz, C-14-Ha)	1.53 (1H, <i>d</i> , $^3J = 14.0$, C-15-Ha)
1.48 (1H, <i>d</i> , $^3J = 12.4$ Hz, C-6-Hb)	1.42 (1H, <i>d</i> , $^3J = 12.4$ Hz, C-14-Hb)
1.29 (1H, <i>m</i> , C-16-Hb)	1.12 (1H, <i>sext</i> , $^3J = 6.9, 7.1, 7.6$ Hz, C-19-Ha)
0.99 (2H, <i>m</i> , C-15-Hb, C-17-Hb)	0.71 (1H, <i>sext</i> , $^3J = 6.4, 7.1, 5.7$ Hz, C-19-Hb)
0.54 (3H, <i>t</i> , $^3J = 7.6$ Hz, C-19-CH ₃)	

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 25 °C), δ (ppm):

171.7 (C-24)	149.3 (C-12)	143.5 (C-8)
129.3 (C-13)	126.0 (C-10)	115.5 (C-9)
110.9 (C-11)	71.1 (C-21)	69.5 (C-2)
55.4 (C-23)	53.6 (C-3)	53.1 (C-7)
52.5 (C-5)	38.0 (C-6)	35.5 (C-20)
34.2 (C-15)	30.0 (C-19)	24.9 (C-16)
23.1 (C-22)	23.0 (C-17)	21.5 (C-14)
6.8 (C-18)		

Massenfeinbestimmung (ESI-HR-MS, MeOH):

Berechnet: 355,238554 für [M+H]⁺

Gefunden: 355,237846

Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] COLLINS, F. S., MORGAN, M., PATRINOS, A.: The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology, *Science* 300, 286 – 290 (2003)
- [2] DEAN, M.: Approaches to Identify Genes for Complex Human Diseases: Lessons From Mendelian Disorders, *Human Mutation* 22, 261 – 274 (2003)
- [3] DREWS, J.: Drug Discovery: A Historical Perspective, *Science* 287, 1960 – 1964 (2000)
- [4] COHEN, M. L.: Changing patterns of infectious disease, *Nature* 406, 762 – 767 (2000)
- [5] SIMONSEN, G. S., TAPSALL, J. W., ALLEGRANZI, B., TALBOT, E. A., LAZZARI, S.: The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool, *Bulletin of the World Health Organisation* 82 (12), 928 – 934 (2004)
- [6] SACK, D. A., LYKE, C., MCLAUGHLIN, C., SUWANVANICHKIJ, V.: Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis, Geneva: World Health Organisation: WHO-Dokument WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8 (2001)
- [7] LAHANA, R.: How many leads from HTS?, *Drug Discov. Today* 4 (10), 447 – 448 (1999)
- [8] OPREA, T. I.: Current trends in leads discovery: Are we looking for the appropriate properties?, *Mol. Divers.* 5, 199 – 208 (2000; veröffentlicht 2002)
- [9] BÖHM, H. J., KLEBE, G., KUBINYI, H.: *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- [10] LENZ, J.: “Fischen” von Liganden – Ein supramolekularer Ansatz zum Auffinden biologisch aktiver Verbindungen aus komplexen Gemischen, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1999)
- [11] PIGGOTT, A. M., KARUSO, P.: Quality, not Quantity: The Role of Natural Products and Chemical Proteomics in Modern Drug Discovery, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7, 607 – 630 (2004)
- [12] GRABLEY, S., SATTLER, I.: Natural products for lead identification: Nature is a valuable resource for providing tools, *EXS (Modern Methods of Drug Discovery)* 93, 87 – 107 (2003)

- [13] BREINBAUER, R., VETTER, I. R., WALDMANN, H.: Von Proteindomänen zu Wirkstoffkandidaten – Naturstoffe als Leitstrukturen für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken, *Angew. Chem.* 114, 3002 – 3015 (2002)
- [14] NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M.: Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 – 2002, *J. Nat. Prod.* 66, 1022 – 1037 (2003)
- [15] BUTLER, M. S.: The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, *J. Nat. Prod.* 67, 2141 – 2153 (2004)
- [16] VERPOORTE, R.: Exploration of nature`s chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development, *Drug Discov. Today* 3, 232 – 238 (1998)
- [17] HENKEL, T., BRUNNE, R. M., MÜLLER, H., REICHEL, F.: Statistische Untersuchungen zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen, *Angew. Chem.* 111 (5), 688 – 691 (1999)
- [18] NOGUCHI, S., NISHIMURA, Y., HIROTA, Y., NISHIMURA, S.: Isolation and Characterization of an *Escherichia coli* Mutant Lacking tRNA-Guanine Transglycosylase, *J. Biol. Chem.* 257 (11), 6544 – 6550 (1982)
- [19] DURAND, J. M., OKADA, N., TOBE, T., WATARAI, M., FUKUDA, I., SUZUKI, T., NAKATA, N., KOMATSU, K., YOSHIKAWA, M., SASAKAWA, C.: vacC, a Virulence-Associated Chromosomal Locus of *Shigella flexneri*, Is Homologous to tgt, a Gene Encoding tRNA-Guanine Transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 176 (15), 4627 – 4634 (1994)
- [20] STEWART, B. W., KLEIHUES, P. (EDS.): WHO World Cancer Report, IARC Press, Lyon (2003)
- [21] Psychrembel, klinisches Wörterbuch, 259. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York (2002)
- [22] CLEMENS, J., KOTLOFF, K., KAY, B.: Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality, WHO/V&B/99.26 (1999)
- [23] WHO: Weekly epidemiological record No.39, 79, 349 – 356 (2004)
- [24] GERLOFF, T.: Nalidixic Acid, *Der Arzneimittelbrief*, Berlin, Oktober 2004
- [25] WHO: Weekly epidemiological record No. 11, 72, 73 – 80 (1997)
- [26] MOUNIER, J., VASSELON, T., HELLIO, R., LESOURD, M., SANSONETTI, P. J.: *Shigella flexneri* Enters Human Colonic Caco-2 Epithelial Cells through the Basolateral Pole, *Infect. Immun.* 60 (1), 237 – 248 (1992)

- [27] SAKAGUCHI, T., KÖHLER, H., GU, X., MCCORMICK, B. A., REINECKER, H.-C.: *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells, *Cell. Microbiol.* 4 (6), 367 – 381 (2002)
- [28] SANSONETTI, P. J., PHALIPON, A.: M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process, *Semin. Immunol.* 11, 193 – 203 (1999)
- [29] WASSEF, J. S., KEREN D. F., MAILLOUX, J. L.: Role of M Cells in Initial Antigen Uptake and in Ulcer Formation in the Rabbit Intestinal Loop Model of Shigellosis, *Infect. Immun.* 57 (3), 858 – 863 (1989)
- [30] DINARELLO, C. A.: Interleukin-1 β , Interleukin-18, and the Interleukin-1 β Converting Enzyme, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 856, 1 – 11 (1998)
- [31] BEATTY, W. L., MÉRESSE, S., GOUNON, P., DAVOUST, J., MOUNIER, J., SANSONETTI, P. J., GORVEL, J.-P.: Trafficking of *Shigella* Lipopolysaccharide in Polarized Intestinal Epithelial Cells, *J. Cell. Biol.* 145 (4), 689 – 698 (1999)
- [32] MOSS, J. E., FISHER, P. E., VICK, B., GROISMAN, E. A., ZYCHLINSKY, A.: The regulatory protein PhoP controls susceptibility to the host inflammatory response in *Shigella flexneri*, *Cell. Microbiol.* 2 (6), 443 – 452 (2000)
- [33] BEATTY, W. L., SANSONETTI, P. J.: Role of Lipopolysaccharide in Signaling to Subepithelial Polymorphonuclear Leukocytes, *Infect. Immun.* 65 (11), 4395 - 4404 (1997)
- [34] HARRINGTON, A. T., HEARN, P. D., PICKING, W. L., BARKER, J. R., WESSEL, A., PICKING, W. D.: Structural Characterization of the N Terminus of IpaC from *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.* 71 (3), 1255 – 1264 (2003)
- [35] BLOCKER, A., GOUNON, P., LARQUET, E., NIEBUHR, K., CABIAUX, V., PARSOT, C., SANSONETTI, P.: The Tripartite Type III Secretion of *Shigella flexneri* Inserts IpaB and IpaC into Host Membranes, *J. Cell. Biol.* 147 (3), 683 – 693 (1999)
- [36] PICKING, W. L., NISHIOKA, H., HEARN, P. D., BAXTER, M. A., HARRINGTON, A. T., BLOCKER, A., PICKING, W. D.: IpaD of *Shigella flexneri* Is Independently Required for Regulation of Ipa Protein Secretion and Efficient Insertion of IpaB and IpaC into Host Membranes, *Infect. Immun.* 73 (3), 1432 – 1440 (2005)
- [37] TRAN VAN NHIEU, G., CARON, E., HALL, A., SANSONETTI, P. J.: IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells, *EMBO* 18 (12), 3249 – 3262 (1999)

- [38] PARSOT, C., MÉNARD, R., GOUNON, P., SANSONETTI, P. J.: Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures, *Mol. Microbiol.* 16 (2), 291 – 300 (1995)
- [39] WEST, N. P., SANSONETTI, P., MOUNIER, J., EXLEY, R. M., PARSOT, C., GUADAGNINI, S., PRÉVOST, M.-C., PROCHNICKA-CHALUFOUR, A., DELEPIERRE, M., TANGUY, M., TANG, C. M.: Optimization of Virulence Functions Through Glucosylation of *Shigella* LPS, *Science* 307, 1313 – 1317 (2005)
- [40] BOURDET-SICARD, R., RÜDIGER, M., JOCKUSCH, B. M., GOUNON, P., SANSONETTI, P. J., TRAN VAN NHIEU, G.: Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization, *EMBO* 18 (21), 5853 – 5862 (1999)
- [41] NIEBUHR, K., GIURIATO, S., PEDRON, T., PHILPOTT, D. J., GAITS, F., SABLE, J., SHEETZ, M. P., PARSOT, C., SANSONETTI, P. J., PAYRASTRE, B.: Conversion of PtdIns(4,5)P₂ into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology, *EMBO* 21 (19), 5069 – 5078 (2002)
- [42] BERNARDINI, M. L., MOUNIER, J., D'HAUTEVILLE, H., COQUIS-RONDON, M., SANSONETTI, P. J.: Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3867 – 3871 (1989)
- [43] SUZUKI, T., MIMURO, H., SUETSUGU, S., MIKI, H., TAKENAWA, T., SASAKAWA, C.: Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for *Shigella* VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading, *Cell. Microbiol.* 4 (4), 223 – 233 (2002)
- [44] PAGE, A.-L., OHAYON, H., SANSONETTI, P. J., PARSOT, C.: The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*, *Cell. Microbiol.* 1 (2), 183 – 193 (1999)
- [45] JENNISON, A. V., VERMA, N. K.: *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development, *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 43 – 58 (2004)
- [46] DURAND, J. M. B., BJÖRK, G. R., KUWAE, A., YOSHIKAWA, M., SASAKAWA, C.: The Modified Nucleoside 2-Methylthio-N⁶-Isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* Is Required for Expression of Virulence Genes, *J. Bacteriol.* 179 (18), 5777 – 5782 (1997)
- [47] ADLER, B., SASAKAWA, C., TOBE, T., MAKINO, S., KOMATSU, K., YOSHIKAWA, M.: A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.* 3 (5), 627 – 635 (1989)

- [48] SAKAI, T., SASAKAWA, C., YOSHIKAWA, M.: Expression of four virulence antigens of *Shigella flexneri* is positively regulated at the transcriptional level by the 30 kiloDalton virF protein, *Mol. Microbiol.* 2 (5), 589 – 597 (1988)
- [49] DURAND, J. M. B., DAGBERG, B., UHLIN, B. E., BJÖRK, G. R.: Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the virF gene, *Mol. Microbiol.* 35 (4), 924 – 935 (2000)
- [50] VAN LANEN, S. G., READER, J. S., SWAIRJO, M. A., DE CRÉCY-LAGARD, V., LEE, B., IWATA-REUYL, D.: From cyclohydrolase to oxidoreductase: Discovery of nitrile reductase activity in a common fold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (12), 4264 – 4269 (2005)
- [51] IWATA-REUYL, D.: Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA, *Bioorg. Chem.* 31, 24 – 43 (2003)
- [52] DIAZ, I., PEDERSEN, S., KURLAND, C. G.: Effects of miaA on translation and growth rates, *Mol. Gen. Genet.* 208, 373 – 376 (1987)
- [53] GOODENOUGH-LASHUA, DA. M., GARCIA, G. A.: tRNA-guanine transglycosylase from *E. coli*: a ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis, *Bioorg. Chem.* 31, 331 – 344 (2003)
- [54] XIE, W., LIU, X., HUANG, R. H.: Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate, *Nat. Struct. Biol.* 10 (10), 781 – 788 (2003)
- [55] CORRELL, C. C.: Caught in the act of modifying tRNA, *Nat. Struct. Biol.* 10 (10), 772 – 773 (2003)
- [56] BRENK, R., STUBBS, M. T., HEINE, A., REUTER, K., KLEBE, G.: Flexible Adaptations in the Structure of the tRNA-Modifying Enzyme tRNA-Guanine Transglycosylase and Their Implications for Substrate Selectivity, Reaction Mechanism and Structure-Based Drug Design, *ChemBioChem* 4, 1066 – 1077 (2003)
- [57] ROMIER, C.: Suck group at EMBL: Modelling of the TGT-tRNA complex, *Rev. Datum: 7 October 1996*, http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt_cpl2.html, 19. Okt. 2005
- [58] ROMIER, C., MEYER, J. E. W., SUCK, D.: Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms, *FEBS Lett.* 416, 93 – 98 (1997)
- [59] ROMIER, C., REUTER, K., SUCK, D., FICNER, R.: Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange, *EMBO J.* 15 (11), 2850 – 2857 (1996)

- [60] ROMIER, C.: Suck group at EMBL: tRNA-guanine transglycosylase structure, Schematic representation of TGT structure, Rev. Datum: 7 October 1996, http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt_scheme.html, 19. Okt. 2005
- [61] ROMIER, C.: Suck group at EMBL: tRNA-guanine transglycosylase structure, Ribbon representation of TGT structure: view into the center of the barrel, Rev. Datum: 7 October 1996, http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt_rib1.html, 19. Okt. 2005
- [62] ROMIER, C.: Suck group at EMBL: PreQ1 bound to TGT, Fo-Fc electron density of the TGT substrate 7-aminomethyl-7-deazaguanine (preQ1) bound to TGT, Rev. Datum: 7 October 1996, http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt_pq1sc.html, 19. Okt. 2005
- [63] ROMIER, C.: Suck group at EMBL: PreQ1 bound to TGT, Hydrogen bonding pattern for recognition of preQ1 by TGT, Rev. Datum: 7 October 1996, http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt_hbond.html, 19. Okt. 2005
- [64] DESHPANDE, K. L., KATZE, J. R.: Characterization of cDNA encoding the human tRNA-guanine transglycosylase (TGT) catalytic subunit, *Gene* 265, 205 – 212 (2001)
- [65] DIRHEIMER, G., BARANOWSKI, W., KEITH, G.: Variations in tRNA modifications, particularly of their queuine content in higher eukaryotes. Its relation to malignancy grading, *Biochimie* 77, 99 – 103 (1995)
- [66] MORRIS, R. C., GALICIA, M. C., CLASE, K. L., ELLIOTT, M. S.: Determination of Queuosine Modification System Deficiencies in Cultured Human Cells, *Mol. Genet. Metab.* 68, 56 – 67 (1999)
- [67] ISHIWATA, S., KATAYAMA, J., SHINDO, H., OZAWA, Y., ITOH, K., MIZUGAKI, M.: Increased Expression of Queuosine Synthesizing Enzyme, tRNA-Guanine Transglycosylase, and Queuosine Levels in tRNA of Leukemic Cells, *J. Biochem.* 129, 13 – 17 (2001)
- [68] ISHIWATA, S., OZAWA, Y., KATAYAMA, J., KANEKO, S., SHINDO, H., TOMIOKA, Y., ISHIWATA, T., ASANO, G., Ikegawa, S., MIZUGAKI, M.: Elevated expression level of 60-kDa subunit of tRNA-guanine transglycosylase in colon cancer, *Cancer Lett.* 212, 113 – 119 (2004)
- [69] FERLAY, J., BRAY, F., PISANI P., PARKIN D. M.: *EUCAN 1998: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in the European Union*, IARC Press, Lyon (1999)

- [70] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1999)
- [71] Staveley, B. E.: Rev. Datum: 02.Januar 2003
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol17/1730.JPG>,
19. Okt. 2005
- [72] MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, H. K., SCHÄFER-KORTING, M.: Mutschler Arzneimittelwirkungen (Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie), 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2001)
- [73] RUBIN, R., BASERGA, R.: Biology of Disease: Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Its Role in Cell Proliferation, Apoptosis and Tumorigenicity, *Lab. Invest.* 73 (3), 311 – 331 (1995)
- [74] LEROITH, D., ROBERTS JR., C. T.: The insulin-like growth factor system and cancer, *Cancer Lett.* 195, 127 – 137 (2003)
- [75] BOK, R. A., SMALL, E. J.: Bloodborne Biomolecular Markers in Prostate Cancer Development and Progression, *Nat. Rev. Cancer* 2, 918 – 926 (2002)
- [76] MITSIADES, C. S., MITSIADES, N. S., MCMULLEN, C. J., POULAKI, V., SHRINGAR-PURE, R., AKIYAMA, M., HIDESHIMA, T., CHAUHAN, D., JOSEPH, M., LIBERMANN, T. A., GARCÍA-ECHEVERRÍA, C., PEARSON, M. A., HOFMANN, F., ANDERSON, K. C., KUNG, A. L.: Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors, *Cancer Cell* 5, 221 – 230 (2004)
- [77] HARTMANN, W., HITZLER, H., SCHLICKENRIEDER, J. H. M., ZAPF, J., HEIT, W., GAEDICKE, G., VETTER, U.: Heterogeneity of Insulin and Insulin-like Growth Factor I Binding in a Human Burkitt Type ALL Cell Line during the Cell Cycle and in Three Burkitt Type ALL Sublines, *Leukemia* 2, 241 – 244 (1988)
- [78] RESNIK, J. L., REICHART, D. B., HUEY, K., WEBSTER, N. J. G., SEELY, B. L.: Elevated Insulin-like Growth Factor I Receptor Autophosphorylation and Kinase Activity in Human Breast Cancer, *Cancer Res.* 58, 1159 – 1164 (1998)
- [79] FAVELYUKIS, S., TILL, J. H., HUBBARD, S. R., MILLER, W. T.: Structure and auto-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase, *Nat. Struct. Biol.* 8 (12), 1058 – 1063 (2001)

- [80] BELL, I. M., STIRDIVANT, S. M., AHERN, J., CULBERSON, J. C., DARKE, P. L., DINSMORE, C. J., DRAKAS, R. A., GALLICCHIO, S. N., GRAHAM, S. L., HEIMBROOK, D. C., HALL, D. L., HUA J., KETT, N. R., KIM, A. S., KORNIENKO, M., KUO, L. C., MUNSHI, S. K., QUIGLEY, A. G., REID, J. C., TROTTER, B. W., WAXMAN, L. H., WILLIAMS, T. M., ZARTMAN, C. B.: Biochemical and Structural Characterization of a Novel Class of Inhibitors of the Type 1 Insulin-like Growth Factor and Insulin Receptor Kinases, *Biochemistry* 44, 9430 – 9440 (2005)
- [81] GARCÍA-ECHEVERRÍA C., PEARSON, M. A., MARTI, A., MEYER, T., MESTAN, J., ZIMMERMANN, J., GAO, J., BRUEGGEN, J., CAPRARO, H.-G., COZENS, R., EVANS, D. B., FABBRO, D., FURET, P., GRAUS PORTA, D., LIEBETANZ, J., MARTINY-BARON, G., RUETZ, S., HOFMANN, F.: In vivo antitumor activity of NVP-AEW541 – A novel, potent and selective inhibitor of the IGF-IR kinase, *Cancer Cell* 5, 231 - 239 (2004)
- [82] BLUM, G., GAZIT, A., LEVITZKI, A.: Development of New Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Kinase Inhibitors Using Catechol Mimics, *J. Biol. Chem.* 278 (42), 40442 – 40454 (2003)
- [83] DUKE, J. A.: Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, Rev. Datum: 13. Juni 1996, <http://www.ars-grin.gov/duke/>, 20. Aug. 2005
- [84] USDA, ARS, National Genetic Resources Program: Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [On-line Datenbank]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, <http://www.ars-grin.gov2/cgi-bin/npgs/html/queries.pl>, 19. Okt. 2005
- [85] BLUM, G., GAZIT, A., LEVITZKI, A.: Substrate Competitive Inhibitors of IGF-1 Receptor Kinase, *Biochemistry*, 39, 15705 – 15712 (2000)
- [86] CACERES, A., CANO, O., SAMAYOA, B., AGUILAR, L.: Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. 1. Screening of 84 Plants against Enterobacteria, *J Ethnopharmacol* 30, 55 – 73 (1990)
- [87] BRENK, R.: Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bakterienruhr, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2002)
- [88] HARTWELL, J. L.: Plants Used Against Cancer. A Survey, *Lloydia* 30 (4), 379 – 386 (1967)
- [89] HARTWELL, J. L.: Plants Used Against Cancer. A Survey, *Lloydia* 34 (4), 427 – 438 (1971)
- [90] MEIER, B.: *Passiflora incarnata* L. – Passionsblume. Portrait einer Arzneipflanze, *Z Phytother* 16, 115 – 126 (1995)

- [91] DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A.: Passiflora: a review update, *J Ethnopharmacol* 94, 1 – 23 (2004)
- [92] UPHOF, J.C. TH.: *Dictionary of economic plants*. 2nd ed., Verlag von J. Cramer (1968)
- [93] ANAGNOSTOU, S., KRAFFT, F.: Jesuiten in Spanisch-Amerika als Heilkundige und Pharmazeuten, *PZ* 145 (31), 2511 – 2518 (2000)
- [94] HÄNSEL, R., KELLER, K., RIMPLER, H., SCHNEIDER, G. (HRSG.): *Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest (1992)
- [95] SEYFRIED, M.: Foto-Archiv, Universität Karlsruhe, Botanischer Garten, *Passiflora incarnata.jpg*, Rev. Datum: 02. August 2004, http://www.rz.uni-karlsruhe.de/~db50/FOTO_-_Archiv/, 18. Okt. 2005
- [96] *Deutsches Arzneibuch 1997*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn (1997)
- [97] KÖHLER, F. E.: *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica*, Gera-Untermhaus (1883-1914)
- [98] ABDA (HRSG.): *Deutscher Arzneimittel-Codex 1986*, 3. Liefg., GOVI-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Frankfurt/Main, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart (1988)
- [99] WICHTL, M. (HRSG.): *Teedrogen und Phytopharmaka*, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1997)
- [100] TEUSCHER, E., MELZIG, M. F., LINDEQUIST, U.: *Biogene Arzneimittel*, 6. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2004)
- [101] HÖFERT, P.: *Inhaltstoffe cytotoxischer Extrakte aus Podopyllum Peltatum L. und partialsynthetische Lignanderivate*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1993)
- [102] SCHLEICH, S.: *Nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs zur Behandlung des Prostatakarzinoms*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2005)
- [103] WACHSMUTH, O.: *Rauvolfia serpentina (L.) Bentham ex Kurz – Moderne Aspekte einer traditionellen Arzneipflanze*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2002)

- [104] WÄCHTER, E.: Leitstrukturen aus Narzissenextrakten für die target-orientierte Krebstherapie – Ein methodischer Vergleich von Hochdurchsatzscreening und Ligandenfischen, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2000)
- [105] LICHTENTHALER, F. W.: Hundert Jahre Schlüssel-Schloß-Prinzip: Was führte Emil Fischer zu dieser Analogie?, *Angew. Chem.* 106, 2456 – 2467 (1994)
- [106] KOSHLAND JR., D. E.: Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie, *Angew. Chem.* 106, 2468 – 2472 (1994)
- [107] BISSWANGER, H.: *Enzymkinetik – Theorie und Methoden*, 3. Aufl., WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2000)
- [108] Passivation of Amicon Centricon Concentrators for Improved Recovery, Millipore® Technical Publication PC1003EN00
- [109] YAMAMURA, H. I., ENNA, S. J., KUHAR, M. J.: *Neurotransmitter Receptor Binding*, Second Edition, Raven Press, New York, 61 – 102 (1985)
- [110] GRÄDLER, U.: De Novo-Design und Strukturbestimmung von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase aus *Zymomonas mobilis* als neues Target der Bakterienruhr, Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2000)
- [111] LENZ, J., MATUSCH, R., HOFFMANN, H. R. (LTS Lohmann Therapie Systeme AG): Patent DE 19945351 (1999)
- [112] LENZ, J., MATUSCH, R., HOFFMANN, H. R. (LTS Lohmann Therapie Systeme AG): Patent 2002/2396 Südafrika (2003)
- [113] LENZ, J., MATUSCH, R., HOFFMANN, H. R. (LTS Lohmann Therapie Systeme AG): Patent EP 1 214 589 B1 (2004)
- [114] LEVITZKI, A.: Ligand binding, aus: *Protein Function. A Practical Approach*, 2. Ed., Ed. by T. E. Creighton, Oxford University Press (1997)
- [115] MENGUY, T., CHENEVOIS, S., GUILLAIN, F., LE MAIRE, M., FALSON, P., CHAMPEIL, P.: Ligand Binding to Macromolecules or Micelles: Use of Centrifugal Ultrafiltration to Measure Low-Affinity Binding, *Anal. Biochem.* 264, 141 – 148 (1998)
- [116] JOHNSON, B. M., NIKOLIC, D., VAN BREEMEN, R. B.: Applications of Pulsed Ultrafiltration-Mass Spectrometry, *Mass Spectrom Rev* 21, 76 – 86 (2002)
- [117] MARKHAM, K. R., GEIGER, H.: ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide aus HARBORNE, J.: *The Flavonoids – Advances in Research since 1986*, 441 – 497, Chapman and Hall, London (1994)

- [118] GEIGER, H., MARKHAM, K. R.: The C-Glycosylflavone Pattern of *Passiflora incarnata* L., *Z. Naturforsch.* 41c, 949 – 950 (1986)
- [119] ZERIHUN, B., LOCKWOOD, G. B., WAIGH, R. D.: Flavonoids and a Diterpene from *Clutia Abyssinica*, *J. Nat. Prod.* 50 (2), 322 (1986)
- [120] PROLIAC, A., RAYNAUD, J.: O-glucosyl-2''-C-glucosyl-6 apigénine de *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae), *Pharm. Acta Helv.* 63 (6), 174 – 175 (1988)
- [121] KRAUZE-BARANOWSKA, M., CISOWSKI, W.: Isolation and Identification of C-Glycosides Flavone from *Lagenaria Siceraria* L., *Acta Pol Pharm* 52 (2), 137 - 139 (1995)
- [122] TOSUN, F., AKYÜZ, C.: Flavonoids of *Gonocytisus angulatus*, *J Pharm Sci* 3, 377 - 378 (1997)
- [123] VÁZQUEZ, E., MARTÍNEZ, E. M., COGORDÁN, J. A., DELGADO, G.: Triterpenes, Phenols, and Other Constituents from the leaves of *Ochroma pyramidale* (Balsa Wood, Bombacaceae). Preferred Conformations of 8-C-β-D-Glucopyranosyl-apigenin (vitexin), *Revista de la Sociedad Química de México*, 45 (4), 254 – 258 (2001)
- [124] ÖSTERDAHL, B.-G.: Chemical Studies on Bryophytes. 22. Flavonoid C-Glycosides of *Mnium undulatum*, *Acta Chem. Scand.*, 33, 400 – 404 (1979)
- [125] LIU, Y.-L., MABRY, T. J.: C-Glycosylflavonoids from *Artemisia Frigida*, *Rev. Latinoamer. Quim*, 13 (2), 56 – 57 (1982)
- [126] XIE, C., VEITCH, N. C., HOUGHTON, P. J., SIMMONDS, M. S. J.: Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* Makino, *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (10), 1204 – 1207 (2003)
- [127] BESSON, E., DELLAMONICA, G., CHOPIN, J., MARKHAM, K. R., KIM, M., KOH, H.-S., FUKAMI, H.: C-Glycosylflavones from *Oryza Sativa*, *Phytochemistry*, 24 (5), 1061 – 1064 (1985)
- [128] NØRBÆK, R., BRANDT, K., KONDO, T.: Identification of Flavone C-Glycosides Including a New Flavonoid Chromophore from Barley Leaves (*Hordeum vulgare* L.) by Improved NMR Techniques, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1703 – 1707 (2000)
- [129] HALÁSZ, I.: Extrographische Trennung der Erdölfraktionen diverser Herkunft, *Erdöl und Kohle* 32 (12), 571 (1979)
- [130] BOGDOLL, B., HALÁSZ, I.: Präparative Gruppentrennung komplexer Gemische – Extrographie der Erdöl-Vakuumrückstände, *Erdöl und Kohle* 34 (12), 549 – 556 (1981)

- [131] CAMPBELL, W. E., JACKSON, G. E., RAVENSCROFT, N.: Two Dimensional NMR Study of Aspidospermine, *Spectroscopy Letters* 26 (4), 707 – 719 (1993)
- [132] DIXON, M., WEBB, E.: *Enzymes*, 3. Aufl., Academic Press, New York (1979)
- [133] HOOPS, G. C., TOWNSEND, L. B., GARCIA, G. A.: tRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*: Structure-Activity Studies Investigating the Role of the Aminomethyl Substituent of the Heterocyclic Substrate PreQ₁, *Biochemistry*, 34 (46), 15381 – 15387 (1995)
- [134] MCGOVERN, S. L., CASELLI, E., GRIGORIEFF, N., SHOICHET, B. K.: A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening, *J. Med. Chem.* 45, 1712 – 1722 (2002)
- [135] MCGOVERN, S. L., HELFAND, B. T., FENG, B., SHOICHET, B. K.: A Specific Mechanism of Nonspecific Inhibition, *J. Med. Chem.* 46, 4265 – 4272 (2003)
- [136] RYAN, A. J., GRAY, N. M., LOWE, P. N., CHUNG, C-w.: Effect of Detergent on “Promiscuous” Inhibitors, *J. Med. Chem.* 46, 3448 – 3451 (2003)
- [137] SEIDLER, J., MCGOVERN, S. L., DOMAN, T. N., SHOICHET, B. K.: Identification and Prediction of Promiscuous Aggregating Inhibitors among Known Drugs, *J. Med. Chem.* 46, 4477 – 4486 (2003)
- [138] MCGOVERN, S. L., SHOICHET, B. K.: Kinase Inhibitors: Not Just for Kinases Anymore, *J. Med. Chem.* 46, 1478 – 1483 (2003)
- [139] ROMIER, C., FICNER, R., REUTER, K., SUCK, D.: Purification, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of tRNA-Guanine Transglycosylase From *Zymomonas mobilis*, *Proteins* 24 (4), 516 – 519 (1996)
- [140] SINGER, F. C., HUDELIST, G., LAMM, W., MUELLER, R., CZERWENKA, K., KUBISTA, E.: Expression of tyrosine kinases in human malignancies as potential targets for kinase-specific inhibitors, *Endocr Relat Cancer* 11, 861 – 869 (2004)
- [141] COELHO, R. M., CONCEIÇÃO DE SOUZA, M., SARRAGIOTTO, M. H.: Steroidal Alkaloid Glycosides from *Solanum orbignianum*, *Phytochemistry* 49 (3), 893 – 897 (1998)

Abbildungen Umschlag:

FAVELYUKIS, S., TILL, J. H., HUBBARD, S. R., MILLER, W. T.: Structure and auto-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase, Nat. Struct. Biol. 8 (12), 1058 – 1063 (2001)

HÖRTNER, SIMONE: C. Romier et al. EMBO J. 1996, 15, 2850. TGT with substrate preQ1 (2,2Å),
<http://www.diederich.chem.ethz.ch/group/people/hoertner.html> , 18. Jan. 2006

Lebenslauf

05.11.1974	geboren in Hildburghausen
1981 – 1990	Besuch der 10. Polytechnischen Oberschule „Tamara Bunke“ in Berlin
1990 – 1991	Besuch der Leistungsstufe der 2. Oberschule „Ernst Wild-angel“ in Berlin
1991 – 1994	Besuch des „Max-Planck-Gymnasiums“, 1. Gymnasium Berlin-Mitte
06/1994	Abitur
10/1994 – 03/1995	Volontariat bei der Nitschke-Zahntechnik GmbH in Berlin
03/1995 – 05/1999	Studium der Pharmazie an der Humboldt-Universität zu Berlin
09/1995	Famulatur in der „Theresen-Apotheke“ in Hildburghausen
09/1996	Famulatur in der Apotheke des Universitätsklinikums der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité
08/1997	Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
05/1999	Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
06/1999 – 12/1999	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité
01/2000 – 06/2000	Pharmaziepraktikum in der „Apotheke am Markt“ in Hildburghausen
11/2000	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
12/2000	Erteilung der Approbation als Apothekerin
01/2001 – 08/2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“
01/2001	Beginn der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Matusch