

**Analyse von Biotransformationen und  
Naturstoffsynthesen in pflanzlichen  
Zellkulturen unter Anwendung der *in vivo*  
NMR-Spektroskopie ohne Markierung**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Christiane Hinse  
geboren in Frankfurt am Main

Mainz 2003

Tag der mündlichen Prüfung:

04.07.2003

**INHALTSVERZEICHNIS****INHALTSVERZEICHNIS..... I****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... V****ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... VII****TABELLENVERZEICHNIS ..... X****I EINLEITUNG..... 1****1 Pflanzenzellkulturen ..... 1****2 Biotransformationen..... 3****3 Ajmalin-Biosynthese ..... 5****4 *In vivo* NMR ..... 9****5 Zielsetzung der Arbeit ..... 12****II MATERIAL UND METHODEN..... 13****1 Pflanzliches Material..... 13**1.1 Zellsuspensionskulturen ..... 131.2 Hairy-Root-Kulturen ..... 14**2 Geräte ..... 15****3 Chemikalien und Zubehör..... 17****4 Syntheseverfahren..... 18**4.1 Synthese von Vellosimin aus Vinorin..... 184.2 Reduktion von Vellosimin zu Vellosimol..... 184.3 Synthese von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin ..... 19

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>5</b>   | <b>Chromatographische Methoden</b> .....   | <b>21</b> |
| 5.1        | Dünnschichtchromatographie .....   | 21        |
| 5.2        | Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....   | 22        |
| 5.2.1      | Biotransformation von Isatin und Isatin-3-oxim.....  | 22        |
| 5.2.2      | Metabolismus von Vellosimol und Vellosimin .....   | 23        |
| 5.2.3      | Metabolismus von Vinorin und Vomilenin .....   | 23        |
| 5.2.4      | Metabolismus von Ajmalin, N <sub>β</sub> -Methyl-dihydrochano-ajmalin<br>und Perakin.....  | 24        |
| 5.3        | Flash-Chromatographie .....  | 25        |
| <b>6</b>   | <b>Spektroskopische Methoden</b> .....   | <b>26</b> |
| 6.1        | Massenspektrometrie.....   | 26        |
| 6.2        | NMR-Spektroskopie.....   | 26        |
| 6.3        | <i>In vivo</i> NMR-Spektroskopie .....   | 27        |
| 6.3.1      | Probenvorbereitung .....   | 27        |
| 6.3.2      | Invers korrelierte <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie.....  | 27        |
| <b>7</b>   | <b>Biotransformationen mit Pflanzenzellen</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>8</b>   | <b>Alkaloidisolierungen</b> .....  | <b>29</b> |
| 8.1        | Isolierung von Vellosimin und Vinorin aus Wurzelkulturen.....  | 29        |
| 8.2        | Isolierung von Vinorin und Vomilenin aus Wurzelkulturen .....  | 30        |
| <b>III</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>1</b>   | <b>Biotransformationen mit pflanzlichen Suspensionskulturen</b> .....  | <b>32</b> |
| 1.1        | Biotransformationsversuche mit Isatin-3-oxim .....   | 32        |
| 1.1.1      | Charakterisierung und Isolierung des<br>Biotransformationsproduktes aus pflanzlichen Zellen von <i>R.</i><br><i>serpentina</i> nach Applikation von Isatin-3-oxim..... | 32        |
| 1.1.2      | Beobachtung der Biotransformation von Isatin-3-oxim mit Hilfe<br>der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie .....  | 37        |
| 1.2        | Biotransformationsversuche mit Isatin .....  | 40        |
| 1.2.1      | Identifizierung und Charakterisierung der<br>Biotransformationsprodukte aus einer <i>R. serpentina</i> -<br>Zellsuspensionskultur nach Applikation von Isatin.....     | 41        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 1.2.2    | Untersuchung der Biotransformation von Isatin mit Hilfe der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie .....  | 48        |
| <b>2</b> | <b>Aufklärung von Sequenzen des Ajmalin-Biosyntheseweges .....</b>  | <b>54</b> |
| 2.1      | Metabolismus von Vellosimol und Vellosimin .....  | 54        |
| 2.1.1    | Biotransformationsversuche mit Vellosimol .....   | 55        |
| 2.1.2    | Aufnahme eines <i>in vivo</i> NMR-Spektrums nach Zugabe von Vellosimol zu einer Zellkultur von <i>R. serpentina</i> .....   | 56        |
| 2.1.3    | Biotransformationsversuche mit Vellosimin .....   | 58        |
| 2.1.4    | Beobachtung des Metabolismus von Vellosimin in einer Zellkultur von <i>R. serpentina</i> mit Hilfe der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie .....   | 58        |
| 2.1.5    | Anlegen von D <sub>2</sub> O-Kulturen.....  | 62        |
| 2.2      | Metabolismus von Vinorin und Vomilenin .....  | 63        |
| 2.2.1    | Biotransformationsversuche mit Vinorin.....   | 63        |
| 2.2.2    | Biotransformationsversuche mit Vomilenin .....  | 67        |
| 2.2.3    | Testen einzelner Zelllinien von <i>R. serpentina</i> auf die Umsetzung der Alkaloide Vinorin und Vomilenin .....  | 68        |
| 2.2.4    | Aufzeichnung der Biotransformation von Vomilenin und Vinorin mittels der invers korrelierten 2D NMR-Spektroskopie unter Anwendung der Cryogenic Probe Technologie.....                                  | 70        |
| 2.2.5    | Anlegen von "zuckerfreien" Kulturen.....  | 81        |
| 2.2.6    | Versuch des Nachweises von endogenem Raucaffricin .....   | 84        |
| 2.3      | Metabolismus von Ajmalin .....  | 86        |
| 2.4.1    | Biotransformationsversuche mit Ajmalin .....  | 87        |
| 2.4.2    | <i>In vivo</i> Beobachtung des Metabolismus von Ajmalin in einer Hybridkultur von <i>R. serpentina</i> x <i>Rhazya stricta</i> .....  | 90        |
| 2.4.3    | Biotransformationsversuche mit N <sub>β</sub> -Methyl-dihydrochano-ajmalin .....  | 96        |
| 2.4.4    | Beobachtung des Metabolismus von N <sub>β</sub> -Methyl-dihydrochano-ajmalin in einer Hybridkultur von <i>R. serpentina</i> x <i>Rhazya stricta</i> mit Hilfe der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie..... | 99        |
| 2.4      | Metabolismus von Perakin.....   | 103       |
| 2.4.1    | Biotransformationsversuche mit Perakin.....   | 104       |

---

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 2.4.2       | <i>In vivo</i> Verfolgung der Metabolisierung des Perakins .....  | 104        |
| 2.4.3       | Bestimmung der <i>in vivo</i> Nachweisgrenze für Perakin .....  | 110        |
| <b>IV</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>112</b> |
| <b>1</b>    | <b>Biotransformation von Isatin-3-oxim in <i>Rauvolfia serpentina</i>-<br/>Zellsuspensionskulturen.....</b>     | <b>112</b> |
| 1.1         | Biotransformationsversuche mit Isatin-3-oxim .....  | 112        |
| 1.2         | Anwendung der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie zur Beobachtung der<br>Biotransformation des Isatin-3-oxims..... | 114        |
| <b>2</b>    | <b>Biotransformation von Isatin in <i>Rauvolfia serpentina</i>-<br/>Zellsuspensionskulturen.....</b>            | <b>117</b> |
| 2.1         | Biotransformationsversuche mit Isatin .....   | 117        |
| 2.2         | Anwendung der <i>in vivo</i> NMR-Spektroskopie zur Beobachtung der<br>Biotransformation des Isatins.....        | 121        |
| <b>3</b>    | <b>Metabolismus von Vellostimol und Vellostimin .....</b>   | <b>122</b> |
| <b>4</b>    | <b>Metabolismus von Vinorin und Vomilenin.....</b>  | <b>125</b> |
| <b>5</b>    | <b>Metabolismus von Ajmalin und N<sub>B</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin</b>                                   | <b>131</b> |
| <b>6</b>    | <b>Metabolismus von Perakin.....</b>  | <b>137</b> |
| <b>7</b>    | <b>Schlußfolgerung und Ausblick.....</b>  | <b>140</b> |
| <b>V</b>    | <b>SPEKTROSKOPISCHE DATEN .....</b>   | <b>144</b> |
| <b>VI</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>167</b> |
| <b>VII</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>169</b> |
| <b>VIII</b> | <b>SPEKTROSKOPISCHER ANHANG .....</b>   | <b>186</b> |

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                |   |
|----------------|---|
| A              | Ajmalin   |
| a              | axial   |
| ACN            | Acetonitril   |
| CAS            | Cer(IV)ammoniumsulfat-Sprühreagenz                  |
| COSY           | Correlated Spectroscopy                             |
| D              | Dioxindol   |
| DA             | N <sub>β</sub> -Methyl-dihydrochano-ajmalin         |
| DC             | Dünnschichtchromatographie                          |
| DCM            | Dichlormethan                                       |
| DEA            | Diethylamin   |
| DEPT           | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| DG             | Dioxindol-O-β-D-glucopyranosid                      |
| DIMBOA         | 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on         |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                    |
| e              | equatorial  |
| EI             | Elektronenstoß-Ionisation                           |
| EtOAc          | Ethylacetat   |
| EtOH           | Ethanol   |
| FM             | Fließmittelsystem                                   |
| h              | Stunde  |
| HETCOR         | Heteronuclear Correlated Spectroscopy               |
| HMBC           | Heteronuclear Multiple Bond Correlation             |
| HMQC           | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence            |
| HPLC           | High Performance Liquid Chromatography              |
| HSQC           | Heteronuclear Single Quantum Coherence              |
| IO             | Isatin-3-oxim                                       |
| IOG            | Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosid                  |
| IS             | Isatin  |
| LS             | Medium nach Linsmaier und Skoog                     |
| M <sup>+</sup> | Molekül-Ionenpeak                                   |
| MAO            | Monoaminoxidase                                     |
| MeOH           | Methanol  |

---

|            |  |
|------------|--|
| min        | Minute                                       |
| MS         | Massenspektrometrie                          |
| NMR        | Nuclear Magnetic Resonance                   |
| NOE        | Nuclear Overhauser Effekt                    |
| PE         | Petrolether                                  |
| R          | Raumaclin                                    |
| <i>R</i>   | <i>Rauwolfia serpentina</i>                  |
| Ra         | Raucaffricin                                 |
| Rf         | Relative Laufstrecke                         |
| RP         | Reversed Phase                               |
| Rt         | Retentionszeit                               |
| <i>RxR</i> | <i>Rauwolfia serpentina x Rhazya stricta</i> |
| s          | Sekunde                                      |
| S          | Sarpagin                                     |
| SR         | Sprühreagenz                                 |
| T          | Tesla  |
| TOCSY      | Total Correlation Spectroscopy               |
| UV         | Ultraviolett                                 |
| V, Ve      | Vellosimin, Vellosimol                       |
| Vi         | Vinorin                                      |
| Vo         | Vomilenin                                    |



**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Hauptweg der Ajmalin-Biosynthese .....  | 7  |
| Abbildung 2: Bisher bekannte Seitenwege der Ajmalin-Biosynthese in <i>Rauvolfia</i> .....  | 8  |
| Abbildung 3: Synthese von Vellosoimin aus Vinorin .....  | 18 |
| Abbildung 4: Synthese von Vellosoimol aus Vellosoimin .....  | 18 |
| Abbildung 5: Synthese von N <sub>β</sub> -Methyl-dihydrochano-ajmalin aus Ajmalin ..   | 19 |
| Abbildung 6: HPLC-Beweis des Vorliegens eines Glucosids .....  | 34 |
| Abbildung 7: Protonenspektrum des Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosids  | 36 |
| Abbildung 8: DEPT-Spektrum des Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosids ..  | 36 |
| Abbildung 9: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>R. serpentina</i> -Zellkultur nach Applikation von Isatin-3-oxim .....                                  | 39 |
| Abbildung 10: Mögliche Produkte der Biotransformation von Isatin in <i>Rauvolfia serpentina</i> -Zellkulturen .....  | 41 |
| Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Zellextrakts einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur eine Woche (168 h) nach Zugabe von Isatin ..... | 43 |
| Abbildung 12: Auszug aus dem Protonenspektrum des Gemisches der Biotransformationsprodukte 2 und 3 .....   | 47 |
| Abbildung 13: Auszug aus dem Protonenspektrum des Gemisches der Biotransformationsprodukte 4 und 5 .....   | 48 |
| Abbildung 14: <sup>1</sup> H <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur nach Applikation von Isatin .....                       | 50 |
| Abbildung 15: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur nach Zugabe von Isatin .....  | 52 |
| Abbildung 16: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur nach Zugabe von Isatin .....  | 53 |
| Abbildung 17: Biosynthesesequenz eines Seitenweges der Ajmalin-Biosynthese von Vellosoimin über Vellosoimol zu Sarpagin .....                                | 54 |
| Abbildung 18: <i>In vivo</i> NMR-Spektrum einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur fünf Tage (120 h) nach Zugabe von Vellosoimol .....                    | 57 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 19: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur nach Fütterung von Vellosimin.....  | 61  |
| Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes einer <i>R. serpentina</i> (T30)-Zellkultur 48 h nach Zugabe von Vinorin.....                              | 64  |
| Abbildung 21: Biotransformationsprodukte des Vinorins bei Applikation an einer <i>R. serpentina</i> (T 30)-Zellsuspensionskultur .....                                   | 67  |
| Abbildung 22: <i>In vivo</i> NMR-Spektrum von Zellen einer <i>RxR</i> -Hybridkultur unmittelbar nach Zugabe von Vinorin .....  | 72  |
| Abbildung 23: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren der Zellen einer <i>RxR</i> -Hybridkultur 7, 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin .....                                      | 74  |
| Abbildung 24: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren der Zellen einer <i>RxR</i> -Hybridkultur 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin .....   | 76  |
| Abbildung 25: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>RxR</i> -Hybridkultur 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin .....  | 77  |
| Abbildung 26: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektrum einer <i>RxR</i> -Hybridkultur 72 h nach Zugabe von Vinorin.....  | 79  |
| Abbildung 27: <i>In vivo</i> NMR-Spektren zweier <i>RxR</i> Kulturen .....   | 83  |
| Abbildung 28: Biosynthesesequenz der Alkaloide des Raumaclin-Typs, nachgewiesen durch Fütterung von Ajmalin an <i>R. serpentina</i> -Zellsuspensionskulturen [137] ..... | 86  |
| Abbildung 29: <i>In vivo</i> Spektren einer <i>RxR</i> -Zellkultur nach Zugabe von Ajmalin .....   | 92  |
| Abbildung 30: <i>In vivo</i> Spektren zweier <i>RxR</i> -Zellkulturen .....  | 95  |
| Abbildung 31: Biotransformationsprodukte des N $\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalins nach Applikation an <i>Rauvolfia serpentina</i> -Zellsuspensionskulturen [122]..... | 97  |
| Abbildung 32: 2D <i>in vivo</i> NMR-Spektren einer <i>RxR</i> -Zellkultur nach Zugabe von N $\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin .....                                   | 101 |
| Abbildung 33: Vermutete Umsetzung von Perakin nach Fütterung zu <i>R. serpentina</i> -Zellkulturen .....   | 103 |
| Abbildung 34: 2D <i>in vivo</i> Spektren einer <i>RxR</i> -Zellkultur nach Applikation von Perakin .....   | 107 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 35: Aus Wurzelkulturen von <i>Rauvolfia serpentina</i> isolierte Alkaloide des Sarpagin-Typs .....                       | 109 |
| Abbildung 36: <i>In vivo</i> NMR-Spektren einer <i>RxR</i> -Kultur nach Zugabe von Perakin .....                                   | 111 |
| Abbildung 37: Mögliche Enantiomere des Dioxindolglucosids.....   | 120 |
| Abbildung 38: Mögliche Zwischen- und Endprodukte bei der Verstoffwechslung von Perakin in <i>RxR</i> -Zellsuspensionskulturen..... | 139 |

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 1: NMR-Parameter zur <i>in vivo</i> Verfolgung der Biotransformation des Isatin-3-oxims .....  | 38  |
| Tabelle 2: Eigenschaften der Biotransformationsprodukte 1, 2 und 3 der Isatin-Metabolisierung.....   | 44  |
| Tabelle 3: NMR-Parameter bei Aufnahme des <i>in vivo</i> Spektrums einer <i>R. serpentina</i> -Zellkultur fünf Tage nach Zugabe von Vellosimol .....       | 56  |
| Tabelle 4: NMR-Parameter der <i>in vivo</i> Verfolgung des Vellosimin-Metabolismus.....  | 59  |
| Tabelle 5: Eigenschaften der Produkte 1 und 3 der Vinorin-Metabolisierung in Zellen von <i>R. serpentina</i> .....   | 66  |
| Tabelle 6: NMR-Parameter der <i>in vivo</i> Verfolgung des Vinorin-Metabolismus .....  | 71  |
| Tabelle 7: Parameter der <i>in vivo</i> NMR-Messungen an Zellkulturen.....   | 82  |
| Tabelle 8: Eigenschaften der unbekanntenen Biotransformationsprodukte des Ajmalins .....   | 88  |
| Tabelle 9: NMR-Parameter der <i>in vivo</i> Verfolgung der Ajmalin-Metabolisierung in <i>RxR</i> -Zellen.....  | 90  |
| Tabelle 10: NMR-Parameter der <i>in vivo</i> Verfolgung des N <sub>β</sub> -Methyldihydrochano-ajmalin-Stoffwechsels in einer <i>RxR</i> -Zellkultur ..... | 99  |
| Tabelle 11: NMR-Parameter der <i>in vivo</i> Verfolgung der Perakin-Metabolisierung in <i>RxR</i> -Zellkulturen .....                                      | 105 |

## I EINLEITUNG

### 1 Pflanzenzellkulturen

Pflanzen, ihre Extrakte und Tinkturen spielen schon seit mehr als 2500 Jahren in allen Regionen der Welt eine große Rolle, u.a. in der Behandlung von Krankheiten, als Gewürze, Duftstoffe und Pigmente. Heute sind sie eine industrielle Quelle für die Gewinnung von Ölen, Harzen, Tanninen, Farb- und Geschmacksstoffen, Wachsen und vielen Pharmazeutika [1].

Pflanzliche Inhaltsstoffe lassen sich in Primär- und Sekundärstoffwechselprodukte einteilen. Der Primärstoffwechsel faßt alle Reaktionen in der Pflanze zusammen, die für die Energiegewinnung, den Anabolismus sowie den Katabolismus von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Lipiden und Nukleotiden verantwortlich sind. Während der Primärstoffwechsel und damit auch seine End- und Zwischenprodukte in allen Pflanzen sehr ähnlich ist, unterscheidet sich der Sekundärstoffwechsel von Pflanzenart zu Pflanzenart zum Teil erheblich. So gibt es Sekundärstoffwechselwege, die nur in bestimmten Pflanzenfamilien oder sogar nur in einer Pflanzengattung zu finden sind. Die Produkte des Sekundärstoffwechsels werden aus Intermediaten des Primärstoffwechsels aufgebaut und dienen den Pflanzen u.a. als Fraßschutz, Schutz gegen Mikroorganismen oder Lockmittel für bestäubende Insekten. Zudem werden diese Verbindungen gebildet, um sich an veränderte Umwelteinflüsse zu adaptieren. Für den Menschen können viele dieser Inhaltsstoffe als Pestizide, Pharmazeutika oder Farb- und Geschmacksstoffe dienen [1], [2]. Der Erforschung und vor allem der anschließenden Nutzung stehen häufig die geringen Konzentrationen der Sekundärstoffwechselprodukte in den Pflanzen, sowie oft auch die schwierige Kultivierbarkeit und das langsame Wachstum der Pflanzen entgegen. So kann häufig nur mit großem zeitlichen und finanziellen Aufwand genügend Pflanzenmaterial bereitgestellt werden, um Sekundärstoffwechselprodukte bzw. die an der Bildung beteiligten Enzyme zu isolieren und zu erforschen.

Im letzten Jahrhundert kam man zu der Erkenntnis, daß einzelne, aus dem Zellverband herausgelöste Zellen in künstlichen Nährmedien, bestehend aus Kohlenhydraten, Phytohormonen, Vitaminen, Mineralsalzen und Spurenelementen, unter sterilen Bedingungen lebensfähig sind und sich auch vermehren. So erhielt man Zellkulturen, die aus entdifferenzierten totipotenten Zellen bestehen [3-5].

Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen dieser Systeme rückte zusehends auch die Isolierung der pharmakologisch nutzbaren Substanzen in den Mittelpunkt [6]. Diese Verbindungen, deren Gehalt in der Pflanze oft sehr niedrig ist, sind aufgrund ihrer chemischen Komplexität nicht oder nur mit sehr hohem Zeit- und Kostenaufwand zu synthetisieren. Durch Variation der Nährmedien, der Temperatur, des pH-Wertes oder durch Elicitierung kann teilweise die Bildung eines gewünschten Stoffes in der Zellkultur gefördert werden. Beispiele für Verbindungen, die in Zellkulturen in einem weit höheren Maßstab gebildet werden als in den differenzierten Pflanzen, sind Ginsenoside in *Panax ginseng* [7], Rosmarinsäure in *Coleus blumei* [8], Berberin in *Coptis japonica* [9] oder Sanguinarin in elicitierten *Papaver somniferum*-Zellkulturen [10]. Von großem Interesse ist die Gewinnung von Taxol<sup>®</sup> (Paclitaxel), einem seit einigen Jahren zugelassenem Zytostatikum. Die Verbindung kommt natürlich in der Rinde der kalifornischen Eibe (*Taxus brevifolia*) vor. Die Isolierung aus der Pflanze liefert jedoch für eine kommerzielle Nutzung zu geringe Ausbeuten [11]. Die chemische Synthese ist aufwendig und liefert Ausbeuten von unter einem Prozent [12], [13]. Eine Möglichkeit zur Gewinnung bietet eine Partialsynthese aus Baccatin III und Deacetylbaccatin III. Diese Präkursoren können bis zu 0.02 % aus den Nadeln einer europäischen Eibenart (*Taxus baccata*) isoliert und dann chemisch zu Paclitaxel umgesetzt werden [14], [15]. Eine weitere Quelle für Paclitaxel ist die Isolierung aus Zellkulturen. Durch die Hybridisierung von *Taxus baccata* und *Taxus cuspidata* gelang es, eine Zellkultur, *Taxus media*, zu generieren, die innerhalb von 2 Wochen bis zu 150 mg/l Paclitaxel produzieren kann [16]. Mittlerweile wird in Korea und Australien die benötigte Menge an Taxol<sup>®</sup> auf diesem Wege gewonnen.

Als weiteres Beispiel sei die intensive Forschung an der Gewinnung des Lignans Podophyllotoxin und dessen Derivaten, die eine zytotoxische und antivirale Wirkung haben, aus Zellkulturen von *Linum ssp.* genannt. Die partialsynthetischen Derivate des Podophyllotoxin, Etoposid und Teniposid, werden, wie auch Taxol, in der Klinik als Chemotherapeutikum bei Behandlung maligner Tumore eingesetzt [17].

Der breiten industriellen Anwendung von Zellkulturen steht jedoch im Wege, daß sich die Inhaltstoffspektren der Kulturen häufig stark von denen der intakten Pflanze unterscheiden und sich auch im Laufe der Jahre verändern können [18]. Häufig ist es sogar möglich, daß die Zellkulturen die Hauptprodukte des Sekundärstoffwechsels gar nicht oder in einem noch geringeren Maße enthalten als die Ursprungspflanze. Jedoch bieten die unterschiedlichen Inhaltstoffspektren auch Vorteile. Bis 1999 konnten 322 bis dahin unbekannte Naturstoffverbindungen aus Zell- und Kalluskulturen isoliert werden. Damit bieten Zellkulturen auch die Möglichkeit, neue pharmazeutisch wertvolle Verbindungen zu entdecken [19].

Ein Ziel der Forschung ist die Biosynthese der Sekundärstoffe auf metabolischer, enzymatischer und genetischer Ebene aufzuklären, um durch genauere Kenntnisse der Stoffwechselregulation, gezielten Einfluß auf die Bildung gewünschter Verbindungen zu nehmen.

## 2 Biotransformationen

Nicht nur die Entdeckung neuer Inhaltsstoffe bzw. deren Isolierung, sondern auch die Umsetzung von exogenen Substraten in Zellkulturen und die Aufklärung zugrunde liegender Reaktionsmechanismen sind von Interesse. Durch Zugabe von geeigneten Präkursoren, dies können entweder für die Pflanze untypische Verbindungen, aber auch natürliche Intermediate und chemisch verwandte Analoga sein, ist die Möglichkeit gegeben Substanzen von hohem wissenschaftlichen und kommerziellen Wert zu erhalten. Pflanzliche Enzyme können eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren. Ein großer Vorteil dieser Reaktionen ist, daß sie zum Großteil regioselektiv und auch stereospezifisch ablaufen.

Beispiele für die in Pflanzen und Zellkulturen ablaufende Reaktionen sind Oxidationen z.B. von Alkoholen [20], Epoxidierungen [21], [22] und Hydroxylierungen [23], [24]. Eine regiospezifische Hydroxylierung ist z.B. die Umsetzung von Digitoxin zu Digoxin durch Zellkulturen von *Digitalis lanata* [25-27]. Beide Stoffe haben in geringer Dosierung eine positiv inotrope Wirkung und können deswegen bei Herzinsuffizienz verabreicht werden [28]. Digoxin ist jedoch aufgrund seiner günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften zu bevorzugen. Aber auch Reduktionen z.B. von Doppelbindungen [29] oder von Carbonylverbindungen [30], [31] und Glykosylierungen werden von Pflanzenzellen katalysiert. Bei Glykosylierungsreaktionen von exogenen Substraten handelt es sich zumeist um eine Entgiftungsreaktion der Pflanze [32-34]. Diesen Reaktionen kann auch eine Reduktion einer Carbonylverbindung zum Alkohol vorausgehen [35], [36]. Die verbreitetste Verknüpfungsform ist die Verknüpfung von Glucose mit einer alkoholischen oder phenolischen OH-Gruppe zu einem O-β-D-Glucosid. Hierzu wurde bis heute in der Literatur eine Reihe von Beispielen beschrieben wie z.B. die Glucosylierung von Hydrochinon zu Arbutin durch *Catharanthus roseus* [37] oder *Rauvolfia serpentina* [38]. Arbutin hat eine hautbleichende Wirkung und findet Anwendung in kosmetischen Cremes der Firma Shiseido aus Japan [39]. Neben den Monoglucoseverbindungen wurden z.B. auch Diglucose- [40] und Triglucoseverbindungen [41], wie auch Rhamnoside [42], [43], Gentiobioside [44], [45], Galactoside [46] und Glucoseester [47] gefunden.

Aber nicht nur durch Pflanzenzellen katalysierte Reaktionen von exogenen Stoffen sind von Interesse. Durch die Fütterung von Intermediaten ist zudem die Möglichkeit gegeben, natürliche Stoffwechselwege zu untersuchen und aufzuklären. Durch Zugabe von radioaktiv markierten biosynthetischen Vorläufern können Rückschlüsse auf einzelne Reaktionen in Biosynthesewegen gezogen werden, indem die Einbauraten dieser Präkursoren in den entstehenden Verbindungen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Fütterung von biosynthetischen Vorläufern, die mit stabilen Isotopen (z.B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) markiert sind. Die entstehenden Verbindungen können dann *in vivo* oder nach Extraktion *in vitro* NMR-spektroskopisch untersucht werden [48-51].



Um aber den Biosyntheseweg eines Naturstoffes und die zugrunde liegenden Reaktionsschritte und Regulationsmechanismen genau zu verstehen, muß der Weg auf enzymatischer bzw. genetischer Ebene untersucht werden. Daher besteht ein großes Interesse an der Isolierung der Enzyme, die für einzelne Teilschritte in den meist komplexen Reaktionsschemata verantwortlich sind. Durch die Isolierung der beteiligten Enzyme ist es möglich, bestimmte Teilschritte der Biosynthesekette *in vitro* durchzuführen, die Aminosäuresequenz der Enzyme zu bestimmen und dann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden den Reaktionsmechanismus der katalysierten Reaktion zu erkennen.

Beispiele für detailliert untersuchte Biosynthesewege sind die der Flavonoide [52], Isoflavonoide [53], [54] Herzglykoside vom Digitalis-Typ [55], aber auch einiger Alkaloide, wie z.B. der Pyrrolizidin- [56] und der Chinolidin-Alkaloide [57].

### 3 Ajmalin-Biosynthese

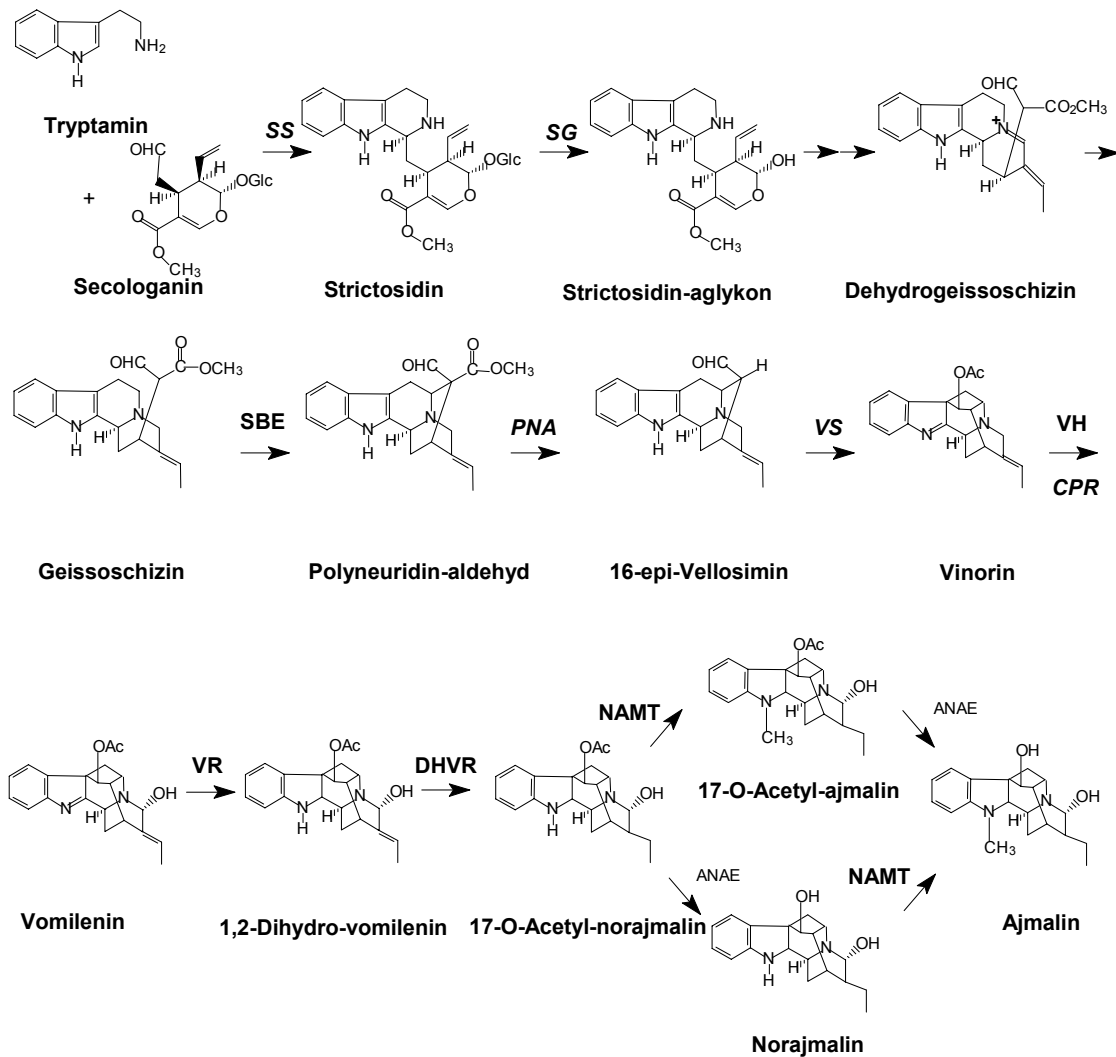
Das Indolalkaloid Ajmalin ist neben Reserpin, Raubasin (beide blutdrucksenkend) und Yohimbin ( $\alpha_2$ -Rezeptor-Antagonist) einer der therapeutisch genutzten Inhaltsstoffe der indischen Medizinalpflanze *Rauvolfia serpentina*. Es wurde 1931 erstmals isoliert [58] und 1959 in die klinische Therapie als Antiarrhythmikum eingeführt [59]. Erste Strukturaufklärungen wurden ab 1955 durchgeführt [60], [61]. Die vollständige Konfiguration der komplexen Verbindung wurde schließlich 1962 ermittelt [62]. Bald darauf folgten erste Versuche zur Totalsynthese des Alkaloids. Es sind bis heute drei Syntheseverfahren bekannt, die jedoch nur sehr niedrige Ausbeuten liefern [63-65]. Eine bezüglich der Ausbeute verbesserte Synthese wurde zwar entwickelt, jedoch sind die einzelnen Reaktionsschritte immer noch sehr aufwendig [66]. Bei der Aufklärung des Biosyntheseweges des Ajmalins half besonders der Einsatz pflanzlicher Zellkulturen. Denn die tropischen *Rauvolfia*-Arten sind in Gewächshäusern nur sehr schwierig zu kultivieren und aufgrund des äußerst langsamen Wachstums, sieben Jahre bis zur Ernte der Wurzelrinde, könnte nur mit sehr großem Aufwand

genügend Pflanzenmaterial für die Forschung bereitgestellt werden, da die Sekundärstoffwechselprodukte und die beteiligten Enzyme nur in geringsten Konzentrationen vorkommen (siehe I.1).

Nach ersten phytochemischen Untersuchungen der Zellkultur von *Rauvolfia serpentina*, die zur Isolierung von 12 Hauptalkaloiden führte [67], war das nächste Ziel den Biosyntheseweg auch enzymatisch zu charakterisieren. Abbildung 1 faßt die bisherigen Kenntnisse des Ajmalin-Biosyntheseweges und Abbildung 2 die bisher bekannten Seitenwege zusammen.

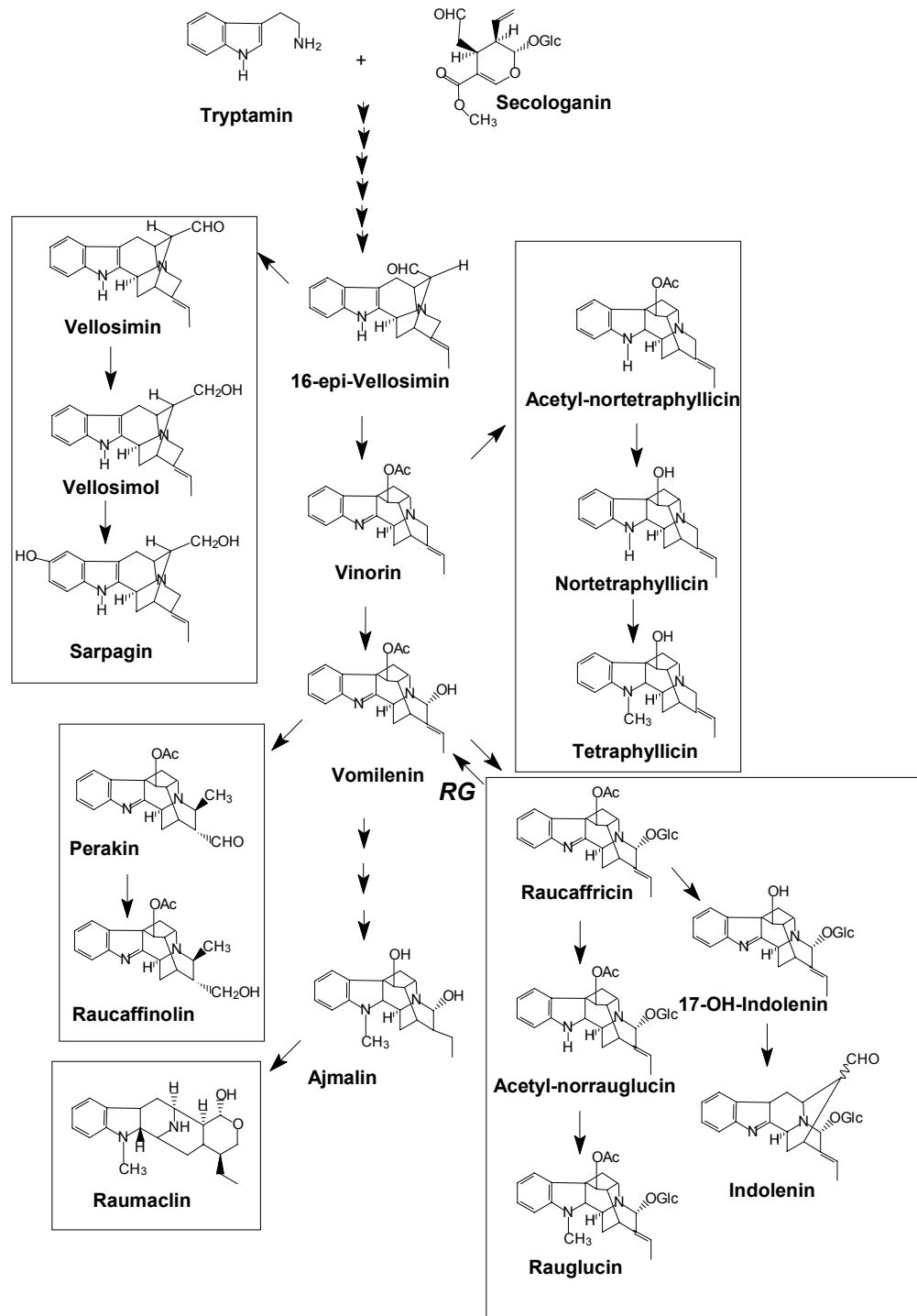
Auf den in Abbildung 2 dargestellten Seitenwegen können wichtige Intermediate für die Ajmalin-Bildung entzogen werden. So werden in der Zellkultur von *R. serpentina* verstärkt Enzyme exprimiert, die an der Bildung von Raucaffricin beteiligt sind. Die Zellkultur liefert das in der Pflanze nur als Spurenalkaloid vorkommende Raucaffricin in einer Menge von bis zu 1.6 g/l [68], das Hauptalkaloid Ajmalin und seine Acetylierungsprodukte jedoch werden nur bis zu 0.3 g/l gebildet [69]. Bisher sind 16 Enzyme aus *Rauvolfia* bekannt, von denen zehn Reaktionen im Haupt- und sechs Reaktionen im Seitenweg katalysieren [70-78]. Sechs dieser Enzyme sind mittlerweile heterolog exprimiert und weiter charakterisiert [79-88] (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2).

Die Aufklärung des Stoffwechsels durch Enzymreinigung und anschließende molekularbiologische Charakterisierung ist jedoch mit außerordentlich hohem zeitlichen Aufwand verbunden. Fütterungsexperimente mit markierten Verbindungen können aufgrund der Schwierigkeit, markierte Präkursoren zu erhalten, scheitern. Die häufig komplexe Struktur der geeigneten Substrate macht die Synthese und Markierung, falls überhaupt möglich, äußerst aufwendig und kostspielig. Somit muß versucht werden eine weitere alternative Methode zur Untersuchung von Stoffwechselvorgängen zu etablieren. Eine attraktive Möglichkeit könnte die *in vivo* NMR-Spektroskopie bieten.



**Abbildung 1: Hauptweg der Ajmalin-Biosynthese**

Die Abbildung zeigt ausgehend von den Vorstufen Tryptamin und Secologanin die Bildung des Ajmalins. Die Abkürzungen über den Reaktionspfeilen stehen für folgende Enzyme: **SS** *Strictosidin-Synthase*, **SG** *Stricosidin-Glucosidase*, **SBE** *Sarpagan-Brückenzym*, **PNAE** *Polyneuridinaldehyd-Esterase*, **VS** *Vinorin-Synthase*, **VH** *Vinorin-Hydroxylase*, **CPR** *Cytochrom P450-Reduktase*, **VR** *Vomilenin-Reduktase*, **DHVR** *Dihydro-vomilenin-Reduktase*, **ANAE** *Acetyl-ajmalin-Estrase*, **NAMT** *Norajmalin-Methyltransferase*. *Kursiv* geschriebene Enzyme sind heterolog exprimiert.



**Abbildung 2: Bisher bekannte Seitenwege der Ajmalin-Biosynthese in *Rauvolfia***

Alle dargestellten Nebenwege der Ajmalin-Biosynthese, die von dem Hauptweg abgehen, sind umrandet dargestellt. *RG*: Raucaffricin-Glucosidase; isoliert und in *E. coli* heterolog exprimiert.

## 4 *In vivo* NMR

Die NMR-Spektroskopie bietet seit ihrer Entwicklung eine hervorragende Möglichkeit zur Strukturaufklärung unbekannter chemischer Verbindungen und seit über 20 Jahren aufgrund des Einsatzes supraleitender Magnete und somit immer leistungsstärkerer Geräte sogar die Option, Messungen an lebenden Systemen durchzuführen [89], [90]. Damit ist ein alternativer Weg zu den sonst benutzten Radiotracer-Methoden und Enzymisolierungen gegeben, um *nicht-invasiv*, Transformations-, Abbau- und Biosynthesewege von Biomolekülen zu beobachten.

Zu Beginn der Anwendung dieser Methoden standen hauptsächlich Arbeiten über Primärstoffwechselforgänge an tierischen und pflanzlichen Zellen im Mittelpunkt [91], [92], welche bevorzugt mittels der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie untersucht wurden, da sehr viele Biomoleküle und Intermediate der verschiedenen Primärstoffwechselforgänge gebundene Phosphat-Gruppen enthalten und  $^{31}\text{P}$  das fast ausschließlich natürlich vorkommende Isotop ist.

Im Gegensatz zur  $^{31}\text{P}$ -NMR-Methode sind auch, jedoch in einem wesentlich geringeren Umfang,  $^1\text{H}$  *in vivo* Messungen durchgeführt worden [93-95]. Zwar ist die hohe Empfindlichkeit der Protonenspektroskopie von Vorteil, jedoch können die Spektren aufgrund der Vielzahl der vorkommenden Verbindungen durch Überlagerung von Signalen äußerst komplex werden. Zudem bedarf es einer effektiven Unterdrückung des Wassersignals, da *in vivo* Messungen an lebenden Systemen im wässrigen Milieu stattfinden.

Im Zuge der Weiterentwicklung der *in vivo* NMR-Spektroskopie wurden auch  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen unternommen, die vor allem zur Beobachtung des Stoffwechsels in pflanzlichen Zellen dienen. Jedoch ist die natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  (1.11 %) und  $^{15}\text{N}$  (0.37 %) gering, so daß die ersten Messungen erst nach dem Einbringen von markierten Substraten gelangen [96-99]. Auch heute noch wird diese Methode, wie auch die  $^{31}\text{P}$ -Spektroskopie, angewandt, um vor allem die Dynamik von Primärstoffwechselforgängen aber auch Sekundärstoffwechselforgängen sowohl in Mikroorganismen als auch in Pflanzenzellkulturen und Hairy-Root-Kulturen zu untersuchen [100-105]. Mit Verbesserung der Methodik reichte aber auch die

natürliche Häufigkeit des  $^{13}\text{C}$ -Isotopes im Falle hoher Transformations- und Akkumulationsraten der betreffenden Stoffe aus, um zum ersten Mal unter diesen Bedingungen mit nicht markierten Naturstoffen die *in vivo* NMR durchzuführen. Im Falle der eindimensionalen NMR-Spektroskopie hat diese Methode den Vorteil, daß nicht nur ein Signal bzw. eine chemische Gruppe, z.B. eine Methylgruppe, zu detektieren ist, sondern mehrere Signale. Beispiele hierfür sind die Aufklärung des Saccharose-Metabolismus und die Glucosylierung verschiedener Substrate wie z.B. Hydrochinon [106], 4-Methoxyphenol [107] und p-Hydroxyacetophenon [108] in lebenden Zellen von *Rauvolfia serpentina*.

Es gelang 1996 mit Hilfe der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie den Metabolismus  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose in Maiswurzeln zu beobachten [109]. Diese Methodik brachte deutlich kürzere Meßzeiten und hat gegenüber der Protonenspektroskopie den Vorteil, daß aufgrund der zweiten Dimension Signale unterschieden werden können, die im Protonenspektrum überlagern. Durch Anwendung dieser Meßmethode kann theoretisch ein Empfindlichkeitsgewinn im Vergleich zur  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie von einem Faktor 32 und ein Empfindlichkeitsgewinn von einem Faktor 8 im Vergleich zur normalen 2D Spektroskopie erreicht werden, der jedoch durch die Multiplettaufspaltung halbiert sein kann [110].

Durch Fütterungsversuche mit Vanillin ist bekannt, daß es nach der Fütterung zur Bildung einer Vielzahl von Biotransformationsprodukten, hauptsächlich von Glucosiden, kommt [35]. Bei der Untersuchung der Metabolisierung des unmarkierten Vanillins mit der *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie brauchte man bei einer Startkonzentration von 8.2 mM an Vanillin eine Meßzeit von 120 min, um die Metabolisierung beobachten zu können [111]. Bei Einsatz der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie an einem 600 MHz NMR-Gerät reichten bei einer Startkonzentration von 6.0 mM Meßzeiten von 20 - 40 min aus, um Signale der Transformationsprodukte des Vanillins zu identifizieren [112].

In den letzten Jahren kam es zur Einführung von Hochfeld NMR-Geräten (800 und 900 MHz) und die Cryogenic NMR Probe Technologie wurde entwickelt. Während sich bei dieser Technologie die Probe bei Raumtemperatur befindet, wird durch starkes Herunterkühlen des Preamplifiers auf ca. 70 K und der Spule auf 20 K das thermische Rauschen drastisch reduziert und so ein

---

deutlicher Empfindlichkeitsgewinn erzielt [113-115]. Diese neue Technologie konnte schon auf dem Gebiet der NMR-spektroskopischen Proteinstruktur-  
aufklärung erfolgreich angewendet werden [116] und bietet außerdem die  
Möglichkeit, Beiträge zur Aufklärung von Biosynthesewegen von Sekundär-  
stoffen zu leisten [117].

Durch Fütterung geeigneter Intermediate kann versucht werden, Teil-  
sequenzen von Biosynthesewegen *in vivo* zu verfolgen. Mit den oben be-  
schriebenen Fortschritten im Bereich der NMR-Spektroskopie könnte auch die  
Chance gegeben sein, den Metabolismus dieser Vorstufen, möglicherweise  
sogar in dem natürlichen Konzentrationsbereich dieser Verbindungen, erfolg-  
reich zu beobachten.

## 5 Zielsetzung der Arbeit

Neben der Aufklärung von Biotransformationen und Metabolismen mit Hilfe *invasiver* analytischer Methoden war das Ziel dieser Arbeit, die bereits durchgeführten Experimente auf dem Gebiet der *in vivo* NMR-Spektroskopie zur Untersuchung des pflanzlichen Stoffwechsels weiterzuführen und wenn möglich auf Naturstoffbiosynthesen zu übertragen. Bisher konnten erfolgreich die Biotransformation von exogen applizierten und unmarkierten Substanzen mit der  $^{13}\text{C}$  *in vivo* NMR-Spektroskopie beobachtet werden.

Letzter Stand der früheren Untersuchungen war die Beobachtung der Biotransformation von Vanillin in Zellkulturen von *Nicotiana plumbaginifolia* an einem 600 MHz Gerät mit der invers korrelierten NMR-Spektroskopie [112].

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Experimente zur Biotransformation von exogenen, unmarkierten Substanzen an einem 800 MHz Gerät mit Hilfe der invers korrelierten NMR-Spektroskopie durchzuführen, um die praktische Anwendung und den Empfindlichkeitsgewinn bei dieser Frequenz zu untersuchen.

Nach einer erfolgreichen Durchführung bestand Interesse, durch Fütterungsversuche mit Intermediaten des Ajmalin-Biosyntheseweges, den Verlauf der Nebenwege der Ajmalin-Biosynthese zu beobachten. Zum einen sollten diese Fütterungsversuche analytisch untersucht werden, zum anderen sollte versucht werden, die Metabolisierung dieser Intermediate *in vivo* zu verfolgen. Durch die Möglichkeit der Nutzung eines CryoProbe<sup>TM</sup>-Spektrometers konnte im Laufe der Arbeit auch die Cryogenic Probe Technologie zur Untersuchung von Metabolismen herangezogen und als bisher empfindlichste *in vivo* Meßmethode an lebenden Pflanzenzellen eingesetzt werden.



## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Pflanzliches Material

#### 1.1 Zellsuspensionskulturen

Die Kultivierung der Zellsuspensionskulturen erfolgte in mit sterilen Schaumgummistopfen verschlossenen 1 l oder 300 ml Erlenmeyerkolben bei  $24 \pm 2$  °C auf Rotationsschüttlern (100 U/min) unter diffusem Dauerlicht (600 Lux). Zur Erhaltung wurden die Kulturen im 7- bzw. 9-Tagerhythmus unter keimfreien Bedingungen überimpft. Dafür wurden etwa 150 bis 200 ml bzw. 70 bis 80 ml Zellsuspension in einen 1 l bzw. 300 ml Erlenmeyerkolben mit 250 ml bzw. 70 ml frischer Nährlösung überführt. Verwendung fand LS-Medium [118], welches gemäß Vorschrift unter Zusatz von  $1 \times 10^{-6}$  mol/l Naphthylessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure hergestellt und mit 1M NaOH auf pH 5.7 eingestellt wurde.

Alle eingesetzten Suspensionskulturen waren bereits zu Beginn der Arbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vorhanden. Es kamen folgende Zellkulturen bzw. Zelllinien zum Einsatz:

- *Rauwolfia serpentina*
- *Rauwolfia serpentina* (München)
- *Rauwolfia serpentina* (Mutter)
- *Rauwolfia serpentina* (T30)
- *Rauwolfia serpentina* x *Rhazya stricta* (Mainz)

## 1.2 Hairy-Root-Kulturen

Die verwendeten Wurzelkulturen von *Rauvolfia serpentina* stammen vom Moskauer Timirjazev Institut für Pflanzenphysiologie und wurden von Frau Dr. Kuzovkina hergestellt.

Die Kultivierung dieser Wurzelkulturen erfolgte bei  $24 \pm 2$  °C und 100 U/min unter Lichtausschluss. Als Medium wurde B5-Medium [119] eingesetzt. Das Wachstum der Wurzelkulturen war wesentlich langsamer als das der Suspensionskulturen. Frisches Nährmedium wurde im Abstand von zwei Wochen hinzugefügt, die Ernte erfolgte nach 12 Wochen. Danach wurden die Wurzeln mit einem Tuch leicht getrocknet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren, gefriergetrocknet und bis zur Isolierung der Alkaloide bei -25 °C gelagert.

## 2 Geräte

| Methode            | Geräte  |
|--------------------|---|
| NMR                | Bruker (Karlsruhe) AM 400<br>ARX 400<br>AC 300 UltraShield™<br>AVANCE 700 UltraShield™<br>AVANCE 800<br><sup>1</sup> H { <sup>13</sup> C/ <sup>15</sup> N} Tripelresonanz-Gradienten-Probenkopf (5 mm)<br>AVANCE 500 UltraShield™ mit CryoProbe™<br>AVANCE 800 mit CryoProbe™ |
| HPLC               | Merck Hitachi-System (Darmstadt) bestehend aus:<br>Integrator D 2500<br>Autosampler AS 2000<br>UV/VIS Detektor L 4250<br>Pumpe L 6200   |
| Massenspektrometer | EI-Bedingungen (70 eV) MAT 44S von Finnigan (Bremen)  |
| Zentrifugen        | a) Biofuge 15 von Heraeus/Sepatech (Osterode)<br>b) Biofuge A von Heraeus/Sepatech (Osterode)<br>c) Kühlzentrifuge Z 320 von Hermle (Gosheim)<br>d) Kühlzentrifuge Sorvall von Du-Pont (Bad Homburg)  |
| Gefriertrocknung   | Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6 der Firma Christ (Osterode)   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| Seralwasseranlage   | Reinstwasser zur Bereitung von HPLC-Puffern:<br>Seralpur PRO 90CN Anlage von Seral (Ransbach-<br>Baumbach) |
| pH Messung          | pH-Meter 761 Calimatic der Firma Bacherhofer<br>(Reutlingen)   |
| Schüttler           | Pilot Shake RC SR Braun (Melsungen)  |
| Autoklaven          | a) TEC 120 Federagi Autoclavi SpA<br>(Albuzzano, Italien)<br>b) Typ FV Tecnomara (Fernwald)                |
| Thermomixer         | Thermomixer 5437, Thermomixer comfort Thermo-<br>stat 5320 von Eppendorf (Hamburg)                         |
| Mühlen              | IKA-Universalmühle IKA (Staufen)   |
| Sterilarbeitsplätze | a) Laminar-Flow Box Fröbel (Lindau)<br>b) NU 440-400E Zapp (Darmstadt)                                     |
| Ultraschallbad      | Sonorex RK510S, RK102H Badelin (Berlin)  |

### 3 Chemikalien und Zubehör

| Lieferant/Hersteller                         | Produkt   |
|--|---|
| Merck (Darmstadt)                            | Acetonitril gradient grade<br>Methanol gradient grade<br>Chloroform pro analysis<br>Dichlormethan pro analysis<br>Trennsäule LiChrospher® 60 RP select B<br>Kieselgel DC-Fertigfolien Si 60 F <sub>254</sub> 0.2 cm<br>Kieselgel DC-Glasplatten Si 60 F <sub>254</sub> 0.2 cm<br>Kieselgel DC-Glasplatten Si 60 F <sub>254</sub> 0.5 cm<br>Kieselgel F 60 |
| Sartorius (Göttingen)                        | Celluloseacetat-Filter 0.2 µm   |
| Roth (Karlsruhe)                             | Acetonitril gradient grade<br>Methanol gradient grade<br>Dichlormethan pro analysis<br>Ajmalin<br>Sarpagin  |
| Deutero (Kastellaun)                         | DMSO-d <sub>6</sub><br>D <sub>2</sub> O<br>CD <sub>3</sub> OD<br>NMR-Röhrchen (5 mm)  |
| Schott (Mainz)                               | Scientific NMR-Röhrchen (5 mm)  |
| Macherey-Nagel (Düren)                       | 250×4 mm CC 100-5 C18   |
| Labotec (Wiesbaden)                          | Silikon-Schlauch  |
| Sigma (München)                              | β-Glucosidase   |
| Lancaster (Morecambe<br>Lancashire, England) | Isatin-3-oxim   |

## 4 Syntheseverfahren

Für Fütterungsversuche mit Alkaloiden mußten diese teilweise partialsynthetisch hergestellt werden.

### 4.1 Synthese von Vellosimin aus Vinorin

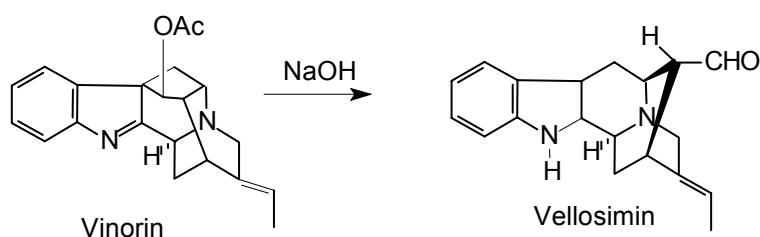


Abbildung 3: Synthese von Vellosimin aus Vinorin

Für die Synthese von Vellosimin (Syntheschema siehe Abbildung 3) wurden 5 mg (15  $\mu\text{mol}$ ) Vinorin in ca. 300  $\mu\text{l}$  MeOH gelöst und mit 100  $\mu\text{l}$  5 M NaOH versetzt. Die Lösung wurde für ca. 1 h bei 30  $^{\circ}\text{C}$  im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet, der Rückstand in DCM aufgenommen und Vellosimin über eine präparative DC-Platte mit dem Laufmittelsystem FM 1 (siehe II.5.1) gereinigt. Die Elution vom Kieselgel erfolgte mit DCM/MeOH (3/7).

Ausbeute: 4 mg Vellosimin (14  $\mu\text{mol}$ ; 91 % der theoretischen Ausbeute)

### 4.2 Reduktion von Vellosimin zu Vellosimol

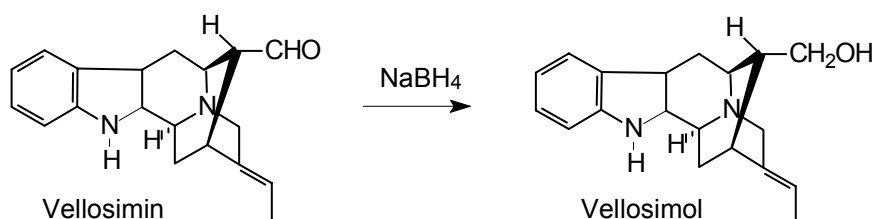


Abbildung 4: Synthese von Vellosimol aus Vellosimin

Zur Gewinnung von Vellosimol (siehe Abbildung 4) wurden 8 mg (27  $\mu\text{mol}$ ) Vellosimin in 1 ml MeOH und 500  $\mu\text{l}$  Citratpuffer (1 M/pH 5.5) gelöst, mit einem Überschuß  $\text{NaBH}_4$  versetzt und für ca. 2 h bei Raumtemperatur in einem Thermomixer geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde mit DCM ausgeschüttelt, die organische Fraktion eingeeengt bzw. alternativ dazu der Reaktionsansatz gefriergetrocknet und der Rückstand in DCM aufgenommen. Der erhaltene DCM Extrakt wurde über eine präparative DC-Platte mit dem Laufmittelsystem FM 6 (siehe II.5.1) gereinigt. Die Elution vom Kieselgel erfolgte mit DCM/MeOH (3/7).

Ausbeute: 7.52 mg (26  $\mu\text{mol}$ ; 82 % der theoretischen Ausbeute)

#### 4.3 Synthese von $\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin

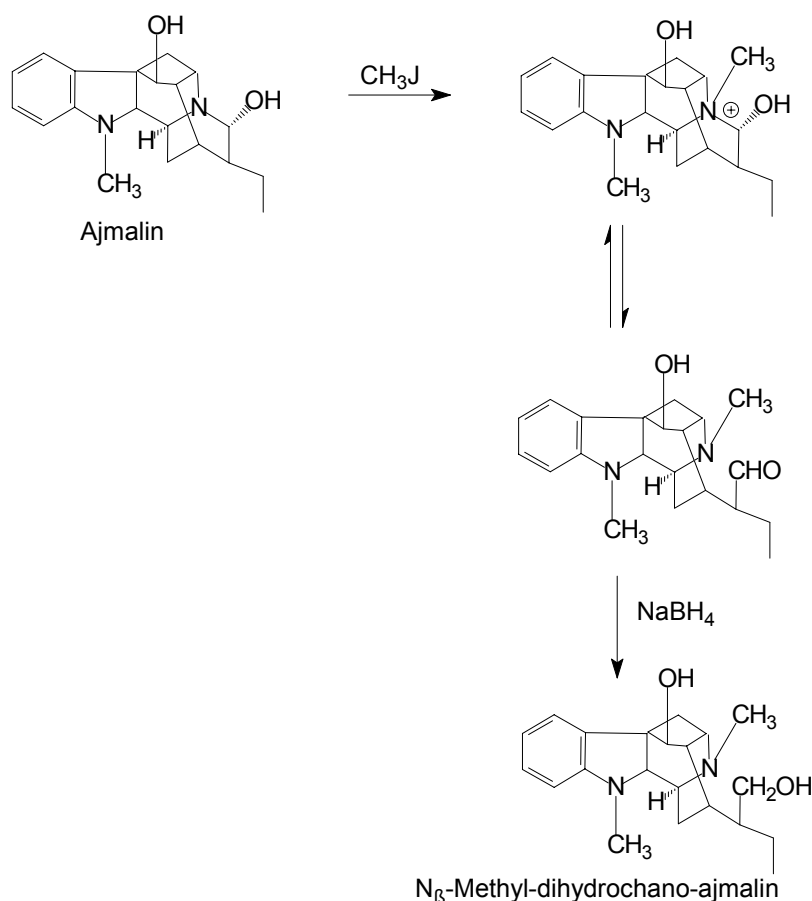


Abbildung 5: Synthese von  $\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin aus Ajmalin

Für die Synthese von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin (siehe Abbildung 5) wurden 300 mg (920 μmol) Ajmalin in 10 ml Chloroform gelöst, mit 1.4 g (9.8 mmol) 1-Methyljodid versetzt und etwa 5 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 8 ml NaOH und anschließendem Rühren für 30 min wurde bis zur Trockne eingeengt.

Der Rückstand wurde in 10 ml MeOH aufgenommen und portionsweise unter Rühren mit 420 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt. Nach Rühren über Nacht (ca. 16 h, lichtgeschützt) wurde die Reaktionsmischung mit 10 ml Wasser verdünnt und nach etwa 30 min Rühren zweimal mit je 15 ml EtOAc ausgeschüttelt. Das organische Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand gefriergetrocknet.

Ausbeute: 300 mg (874 μmol; 95% der theoretischen Ausbeute)



## 5 Chromatographische Methoden

### 5.1 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Trennung von Substanzgemischen im analytischen Maßstab erfolgte mit Kieselgel DC-Aluminium-Fertigplatten Si 60 F<sub>254</sub> 0.2 cm.

Für die Auftrennung und Reinigung im präparativen Maßstab wurden Kieselgel DC-Glas-Fertigplatten Si 60 F<sub>254</sub> 0.5 oder 0.2 cm verwendet.

Es kamen folgende Fließmittel zum Einsatz:

|             |   |          |
|-------------|---|----------|
| <b>FM 1</b> | CHCl <sub>3</sub> /MeOH/NH <sub>3</sub> | 9/1/0.02 |
| <b>FM 2</b> | CHCl <sub>3</sub> /Cyclohexan/DEA       | 6/3/1    |
| <b>FM 3</b> | Aceton/PE/DEA                           | 2/7/1    |
| <b>FM 4</b> | EtOAc/MeOH/H <sub>2</sub> O             | 7/2/1    |
| <b>FM 5</b> | CHCl <sub>3</sub> /MeOH                 | 7/3      |
| <b>FM 6</b> | CHCl <sub>3</sub> /MeOH/NH <sub>3</sub> | 8/2/0.2  |
| <b>FM 7</b> | DCM/MeOH/NH <sub>3</sub>                | 9/1/0.01 |

Die Substanzen wurden nach der Entwicklung der DC mit folgenden Sprühreagenzien detektiert:

- SR 1** Ammoniumcer(IV)sulfat-Sprühreagenz (CAS)  
Herstellung einer 5 %igen Ammoniumcer(IV)sulfatlösung in 85 %iger Phosphorsäure.  
Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht und 365 nm.
- SR 2** Thymol-Schwefelsäure-Sprühreagenz  
0.5 g Thymol, 10 g Eisessig, 85 ml MeOH und 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (konz.) wurden langsam in der angegebenen Reihenfolge gemischt.  
Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht.

## 5.2 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde eingesetzt zur Analyse von Biotransformationsprodukten (5.2.1 -5.2.4). Verwendet wurde eine 250×4 mm LiChrospher® 60 RP select B (5 µm) Säule der Firma Merck mit einer entsprechenden Vorsäule (4×4 mm). Im folgenden werden die chromatographischen Bedingungen der einzelnen Trennungen aufgeführt.

Die Retentionszeiten identifizierter Metabolisierungsprodukte wurden im allgemeinen nochmals durch Coinjektion mit den entsprechenden Referenzsubstanzen überprüft.

### 5.2.1 Biotransformation von Isatin und Isatin-3-oxim

**Eluenten:** A: Acetonitril

B: Reinstwasser, pH 2.3 (eingestellt mit ortho-Phosphorsäure)

**Detektion:** 244 nm

**Flußrate:** 1 ml/min

**Gradient I:**

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0          | 5            | 95           |
| 20         | 40           | 60           |
| 20.5       | 5            | 95           |
| 25         | 5            | 95           |

**Gradient II:**

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0          | 4            | 96           |
| 20         | 15           | 85           |
| 20.5       | 4            | 96           |
| 25         | 4            | 96           |

### 5.2.2 Metabolismus von Vellosimol und Vellosimin

**Eluenten:** A: Acetonitril

B: Reinstwasser, pH 2.3 (eingestellt mit ortho-Phosphorsäure)

**Detektion:** 254 oder 280 nm

**Flußrate:** 1 ml/min

Isokratische Zusammensetzung der Eluenten: 25 % A, 75 % B

### 5.2.3 Metabolismus von Vinorin und Vomilenin

**Eluenten:** A: Acetonitril

B: Reinstwasser, pH 2.3 (eingestellt mit ortho-Phosphorsäure)

**Detektion:** 280 nm

**Gradient I:**

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|-------------------|
| 0          | 5            | 95           | 1.0               |
| 10         | 40           | 60           | 1.0               |
| 20         | 5            | 95           | 1.0               |
| 25         | 5            | 95           | 1.0               |

**Gradient II:**

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|-------------------|
| 0          | 15           | 85           | 1.0               |
| 30         | 85           | 15           | 1.0               |
| 31         | 100          | 0            | 2.0               |
| 31.5       | 15           | 85           | 1.0               |
| 35         | 15           | 85           | 1.0               |

**Eluenten:** A: Acetonitril

B: Ammoniumcarbonat-Puffer 10 mM

**Detektion:** 284 nm

**Gradient III:**

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] | Flußrate [ml/min] |
|------------|--------------|--------------|-------------------|
| 0          | 32           | 68           | 1.25              |
| 6          | 32           | 68           | 1.25              |
| 6.1        | 60           | 40           | 1.50              |
| 12         | 60           | 40           | 1.50              |
| 12.1       | 32           | 68           | 1.50              |
| 20         | 32           | 68           | 1.50              |

**5.2.4 Metabolismus von Ajmalin, N<sub>8</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin und Perakin****Eluente:** A: Acetonitril

B: Puffer pH 2.3 (eingestellt mit ortho-Phosphorsäure)

**Detektion:** 284 nm**Flußrate:** 1 ml/min

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0          | 10           | 90           |
| 30         | 45           | 55           |
| 31         | 10           | 90           |
| 37         | 10           | 90           |

### 5.3 Flash-Chromatographie

Die Flash-Chromatographie nach STILL [120] wurde modifiziert zur Isolierung von Alkaloiden im präparativen Maßstab. Eingesetzt wurde bei der Auftrennung von Mengen bis zu 2 g Rohextrakt (siehe II.8) eine Säule mit einem Durchmesser von 4 cm, die mit ca. 140 g Kieselgel F 60 gepackt wurde (Packhöhe ca. 20 cm). Bei geringeren Mengen an Ausgangsmaterial (bis zu 300 mg Rohextrakt) wurde eine Säule von 2.5 cm Durchmesser mit ca. 50 g Kieselgel F 60 (Packhöhe ca. 10 cm) verwendet. Es wurde eine ca. 1 cm dicke Sandschicht auf das Kieselgel gefüllt, um das Gelbett beim Auftragen der Probe nicht aufzuwirbeln. Zur Equilibrierung dienten ca. 800 ml (große Säule) bzw. 350 ml (kleine Säule) des jeweiligen Fließmittelgemisches. Der über eine Preßluftgasflasche angelegte Druck wurde so reguliert, daß die Flußrate etwa 2 ml/min betrug. Nach dem Equilibrieren der Säule wurde eine bestimmte Menge an Rohextrakt im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und vorsichtig auf die gepackte Flash-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit dem für das Alkaloid entsprechenden Laufmittelsystem bei oben genannter Fließgeschwindigkeit.

Es wurden folgende Fließmittelsysteme eingesetzt:

|             |   |          |
|-------------|---|----------|
| <b>FM 1</b> | CHCl <sub>3</sub> /MeOH/NH <sub>3</sub> | 9/1/0.02 |
| <b>FM 2</b> | CHCl <sub>3</sub> /Cyclohexan/DEA       | 6/3/1    |
| <b>FM 3</b> | Aceton/PE/DEA                           | 2/7/1    |

Zudem wurden unterschiedliche Konzentrationen von MeOH in DCM verwendet.

Zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in den einzelnen gesammelten Fraktionen diente eine DC mit Referenzsubstanzen, die mit dem jeweiligen Fließmittelsystem entwickelt wurde.

Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 und 365 nm und nach Besprühen mit SR 1 bei Tageslicht und 365 nm (siehe II.5.1).

## 6 Spektroskopische Methoden

### 6.1 Massenspektrometrie

Da viele Alkaloide unter EI-Bedingungen ein ausgesprochen charakteristisches Fragmentierungsmuster zeigen, diente dieses Verfahren zur Identifizierung unbekannter Verbindungen. Die Substanzen wurden in einem Tiegel mittels einer Schubstange direkt in die Ionenquelle eingeführt und durch Erhitzen verdampft.

Glykoside wurden vor der Messung mit einem Gemisch aus Acetanhydrid und Pyridin (1:1) bei Raumtemperatur acetyliert.

### 6.2 NMR-Spektroskopie

Eindimensionale  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden routinemäßig in  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O/D}_2\text{O}$  oder  $\text{MeOD-d}_4$  aufgenommen.

HSQC- oder HMQC-Aufnahmen ermöglichten die Zuordnung von  $^1\text{H}$ -Resonanzsignalen zu den  $^{13}\text{C}$ -Signalen einer Verbindung. Die Aufnahme von DEPT-Spektren ließ die leichte Identifizierung von Methyl-, Methylen-, Methin-Gruppen und quartären C-Atomen zu.

Zur Auswertung der Spektren ist folgendes zu bemerken:

Die Angabe der verwendeten Lösungsmittel und Frequenzen erfolgt in Klammern, die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt nach der  $\delta$ -Skala in ppm und bezieht sich auf das jeweils verwendete Lösungsmittel.

Abkürzungen:

|      |           |            |   |
|------|-----------|------------|---|
| s:   | Singulett | dd:        | Dublett vom Dublett                       |
| d:   | Dublett   | ddd:       | Dublett vom Dublett vom Dublett           |
| t:   | Triplet   | td:        | Triplet vom Dublett                       |
| q:   | Quartett  | m:         | Multiplet                                 |
| sep: | Septett   | <i>J</i> : | Kopplungskonstante als   <i>J</i>   in Hz |

### 6.3 *In vivo* NMR-Spektroskopie

#### 6.3.1 Probenvorbereitung

Zur Beobachtung von Biotransformationsprozessen wurden die üblichen Erhaltungskulturen (siehe II.1 und II.7) eingesetzt.

Für die *in vivo* Messungen wurde mit Hilfe eines Silikonschlauchs (mit Isopropylalkohol oder 70%igen EtOH sterilisiert; Innendurchmesser ca. 4 mm) eine Probe der Zellsuspension in ein NMR-Röhrchen überführt. Erfolgte die vorherige Substratzugabe (siehe II.7) nicht in einem deuterierten Lösungsmittel, so wurde der Zellprobe D<sub>2</sub>O hinzugefügt (Endkonzentration ca. 10 %), um ein Locksignal zu erzeugen. Nach dem Absetzen der Zellen (ca. 20 min) konnte mit den NMR-Messungen begonnen werden. Die Füllhöhe der abgesetzten Zellen betrug mindestens 2 cm, dadurch resultierte eine Gesamtfüllhöhe (Medium und Zellen) von mindestens 4 cm. Alle *in vivo* Messungen wurden bei Raumtemperatur und ohne Rotation der Probe durchgeführt.

Für die Messungen des wäßrigen Überstandes wurden die Zellen abfiltriert und etwa 500 µl des Filtrats mittels einer sterilen Pipette in ein NMR-Röhrchen überführt, zur Erzeugung des Locksignals wurden ca. 50 µl D<sub>2</sub>O hinzugefügt.

#### 6.3.2 Invers korrelierte <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie

Die invers korrelierte <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie wurde entweder mit einem <sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N} Tripelresonanz-Gradienten-Probenkopf (5 mm) an einem Bruker AVANCE 800 oder an einem Bruker AVANCE 700 UltraShield™ Gerät durchgeführt. Alternativ wurde ein <sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N} Tripelresonanz 5 mm CryoProbe™ mit einem Bruker AVANCE 500 UltraShield™ Gerät oder einem AVANCE 800 Spektrometer eingesetzt.

Für die Messungen wurden die HSQC-Pulsprogramme *invietgpsi*, *invietgpsisp* oder *invietgpsisp.ric* verwendet. Die Parameter wurden je nach Experiment variiert und optimiert. Zur Wasserunterdrückung der zusätzlich aufgenommenen Protonenspektren diente in den meisten Experimenten die Sculpt-Sequenz. Ausnahmen waren die unter III.1.1.2 und III.2.1.2 beschriebenen

NMR-Messungen. Hier wurde zur Wasserunterdrückung die Watergate-Sequenz verwendet.

## 7 Biotransformationen mit Pflanzenzellen

Als Substrate bei den Biotransformationen wurden sowohl exogene Indol-Derivate als auch endogene Intermediate des Ajmalin-Biosyntheseweges verwendet. Die Biotransformationsversuche wurden entweder mit den unter II.1 beschriebenen Zellsuspensionskulturen durchgeführt oder mit Zellkulturen in 50 oder 100 ml Erlenmeyerkolben. Da für die Metabolismusstudien der Alkaloide häufig nur wenige Milligramm Substrat zur Verfügung standen, mußten die Erhaltungskulturen in kleinere Mengen aufgeteilt werden, um eine noch meßbare Konzentration der Biotransformationsprodukte zu erhalten. Hierzu wurden einen Tag vor Fütterung 5 - 15 ml einer 4 - 6 Tage alten Zellkultur in einen autoklavierten 50 bzw. 100 ml Erlenmeyerkolben unter sterilen Bedingungen überführt.

Die Zugabe der Substanzen erfolgte dann je nach deren Löslichkeit entweder in LS-Medium (keimfrei), MeOH bzw. MeOD-d<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (keimfrei) oder D<sub>2</sub>O (keimfrei).

In definierten Zeitabständen wurden dann mittels einer sterilen Pipette bzw. Kunststoffkanüle Zell- und Mediumproben entnommen, die dann HPLC-analytisch oder mit Hilfe der *in vivo* NMR Spektroskopie untersucht wurden. Für die HPLC Analyse wurde die entnommene Zellsuspension 10 min zentrifugiert (10000 x g), der Überstand abgenommen und nach nochmaliger Zentrifugation (10 min bei 10000 x g) direkt oder mit MeOH verdünnt in die HPLC injiziert. Die Zellen wurden mit MeOH für 20 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, die entstandene Suspension zentrifugiert (10 min bei 10000 x g), der methanolischer Überstand abgenommen, zentrifugiert und anschließend direkt oder mit MeOH verdünnt mittels HPLC analysiert.

Zur Isolierung der Biotransformationsprodukte im präparativen Maßstab wurde wie folgt vorgegangen. Die Zellen wurden einige Tage nach Zugabe des jeweiligen Substrates durch Vakuumfiltration über einen Büchnertrichter mit Filterpapier vom Medium abgetrennt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren



und gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Zellen wurden, wenn sie nicht direkt zum Einsatz kamen, bei - 20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Nach der Gefriertrocknung wurden die Zellen mit MeOH für ca. 30 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, die entstandene Suspension wurde filtriert und anschließend das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die in dem Rohextrakt enthaltenen Transformationsprodukte wurden dann mit Hilfe der Flash-Chromatographie oder der präparativen Dünnschichtchromatographie isoliert.

## 8 Alkaloidisolierungen

Zur Isolierung der Alkaloide dienten Hairy-Root-Kulturen, die unter den in II.1.2 angegebenen Bedingungen kultiviert und geerntet wurden.

### 8.1 Isolierung von Vellosimin und Vinorin aus Wurzelkulturen

Für die Isolierung von Vellosimin und Vinorin wurden gefriergetrocknete Hairy-Roots (50 g) in einem Mörser pulverisiert und mit 5 l MeOH 30 min bei 35 °C im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 500 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 9.8) gelöst. Die wässrige Lösung wurde zweimal mit jeweils 500 ml EtOAc ausgeschüttelt und anschließend verworfen. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und gefriergetrocknet. So konnten 4.1 g Rohextrakt erhalten werden.

Der Rohextrakt wurde in 2 g Portionen mittels Flash-Chromatographie aufgetrennt (siehe II.5.3). Als Lösungsmittel für den Extrakt diente CHCl<sub>3</sub>. Die Elution erfolgte zunächst mit 1000 ml des Fließmittelgemisches FM 2 (siehe II.5.3). Es wurden Fraktionen á 10 ml gesammelt. Mit dem unter II.5.3 beschriebenen Nachweis konnte Vinorin in einigen Fraktionen nachgewiesen werden. Als zweites Elutionsmittel diente FM 1 (siehe II.5.3). Es wurden Fraktionen á 20 ml gesammelt, die Fraktionen wurden auf das Vorhandensein von Vellosimin getestet (siehe II.5.3). Da die Konzentration des Alkaloids sehr gering war, wurde auf die weitere Aufarbeitung zunächst verzichtet und

versucht, das in wesentlich größeren Mengen enthaltene Alkaloid Vinorin zu isolieren. Die gesammelten Vinorin-Fractionen wurden eingengt und nochmals dünn-schichtchromatographisch untersucht. Nach diesem Reinigungsschritt und anschließender Gefriertrocknung konnten 900 mg des Alkaloids erhalten werden.

Aufgrund der großen Extraktmenge schloß sich zur weiteren Reinigung eine zweite Flash-Chromatographie (siehe II.5.3) an. In 200 mg Portionen wurde der Extrakt in ca. 10 ml des Fließmittels gelöst, die Elution erfolgte mit 250 ml FM 3 (siehe II.5.3). Es wurden Fractionen á 10 ml gesammelt. Die Detektion erfolgte analog II.5.3. Die Fractionen, die Vinorin enthielten, wurden vereinigt und zur Trockne unter Vakuum eingengt. Beim Entfernen des Lösungsmittels mit einem Rotationsverdampfer kam es zu einer spontanen Umwandlung von Vinorin zu Vello-simin, wie die angefertigte DC nach dem Einengen der Fractionen zeigte. Die spontane Deacetylierung kam wahrscheinlich durch zu starkes Erhitzen der Probe oder durch das sehr basische Elutionsmittel zustande. Nach der Gefriertrocknung wurden ca. 80 mg des Alkaloidgemisches erhalten.

Die Trennung von Vinorin und Vello-simin erfolgte mittels präparativer DC (Schichtdicke 0.5 cm, mit FM 3 (siehe II.5.1)). Die R<sub>f</sub>-Werte betragen 0.80 für Vinorin und 0.46 für Vello-simin. Die zugehörigen Banden wurden ausgekratzt und die Alkaloide mit einem DCM/MeOH-Gemisch (7/3) vom Kieselgel eluiert. Zur Feinreinigung von Vello-simin wurde eine zweite Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu dienten DC-Glas-Fertigplatten mit einer Schichtdicke von 0.2 cm. Es wurde FM 6 (siehe II.5.1) verwendet. Detektion und Isolierung erfolgten wie oben beschrieben. Der R<sub>f</sub>-Wert des Vello-simins betrug 0.61. Es wurden 35 mg Vello-simin und 40 mg Vinorin erhalten.

## 8.2 Isolierung von Vinorin und Vomilenin aus Wurzelkulturen

Da es bei der ersten Isolierung von Vinorin zu einer spontanen Umwandlung zu Vello-simin kam, wurde zur Isolierung von Vinorin und Vomilenin ein anderes Reinigungsschema benutzt. Etwa 57 g gefriergetrocknete Wurzeln wurden mit flüssigem Stickstoff versetzt und mit einer IKA-Universalmühle fein gemahlen und anschließend in einem Mörser pulverisiert. Das erhaltene

Pulver wurde dann in 2.5 l MeOH suspendiert und 1 h im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde über einen Papierfilter getrennt. Der Rückstand wurde in 1 l MeOH nochmals für 1 h im Ultraschallbad extrahiert und anschließend erneut filtriert. Der MeOH der beiden Filtrate wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt und der Rückstand (700 mg) in 1 l Bicarbonat-Puffer aufgenommen und mit 1 l EtOAc ausgeschüttelt. Nach dem Trennen der beiden Phasen wurde die wäßrige Phase zusätzlich zweimal mit 0.5 l EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und bis auf 600 ml eingengt und anschließend dreimal mit 600 ml Wasser, welches mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2 eingestellt wurde, ausgeschüttelt. Die erhaltenen wäßrigen Extrakte wurden mit 5 M NaOH auf pH 9 eingestellt und einmal mit 2 l und zweimal mit 1 l Toluol ausgeschüttelt. Die erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt und das Toluol vollständig abgedampft. Das Gewicht des so erhaltenen Rohextraktes betrug 580 mg.

Jeder einzelne Schritt wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Jeweils 10 µl jeder Fraktion wurde auf eine DC-Platte aufgetragen und diese mit Laufmittel FM 1 entwickelt. Die Detektion der Alkaloide erfolgte nach II.5.3. Zur weiteren Reinigung wurde die Flash-Chromatographie genutzt. Verwendet wurde eine kleine Säule (siehe II.5.3). Der erhaltene Rohextrakt wurde in 4 Portionen von 140 - 150 mg aufgeteilt. Diese wurden jeweils in 14 ml DCM und MeOH (6/1) gelöst und auf die Flash-Säule aufgebracht. Nach Einsickern der Probe in das Gelbett wurde die Säule mit 250 ml reinem DCM gewaschen. Die Alkaloide wurden dann erst mit 660 ml 3.5 %igem MeOH in DCM und anschließend mit 110 ml 4.1%igem MeOH in DCM von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen á 10 ml aufgefangen, die entsprechend II.5.3 chromatographisch getestet wurden. Als Standard dienten Vomilenin und Vinorin. Die Fraktionen, die Vinorin und Vomilenin enthielten, wurden vereinigt. Dieses Alkaloidgemisch wurde dann nochmals mittels Flash-Chromatographie aufgetrennt. Sämtliche Fraktionen, in denen Vinorin und Vomilenin getrennt vorlagen, wurden jeweils vereinigt und das Lösungsmittel abgedampft. Zur Identifizierung diente ein MS-Spektrum der Substanzen und zur Reinheitsprüfung die HPLC. Es konnten so ca. 90 mg Vinorin und 150 mg Vomilenin erhalten werden.

### III ERGEBNISSE

#### 1 Biotransformationen mit pflanzlichen Suspensionskulturen

Pflanzliche Zellkulturen können exogen applizierte Substrate auf unterschiedliche Art und Weise umsetzen (siehe I.2). Ein Beispiel für eine solche Biotransformation ist die Umsetzung von alkoholischen OH-Gruppen oder Phenolen mit Glucose zu einem O- $\beta$ -D-Glucosid und der relativ häufigen nachfolgenden Bildung eines Primverosids [107, 108, 121]. Im folgenden werden die Transformationen zweier Indol-Derivate beschrieben.

##### 1.1 Biotransformationsversuche mit Isatin-3-oxim

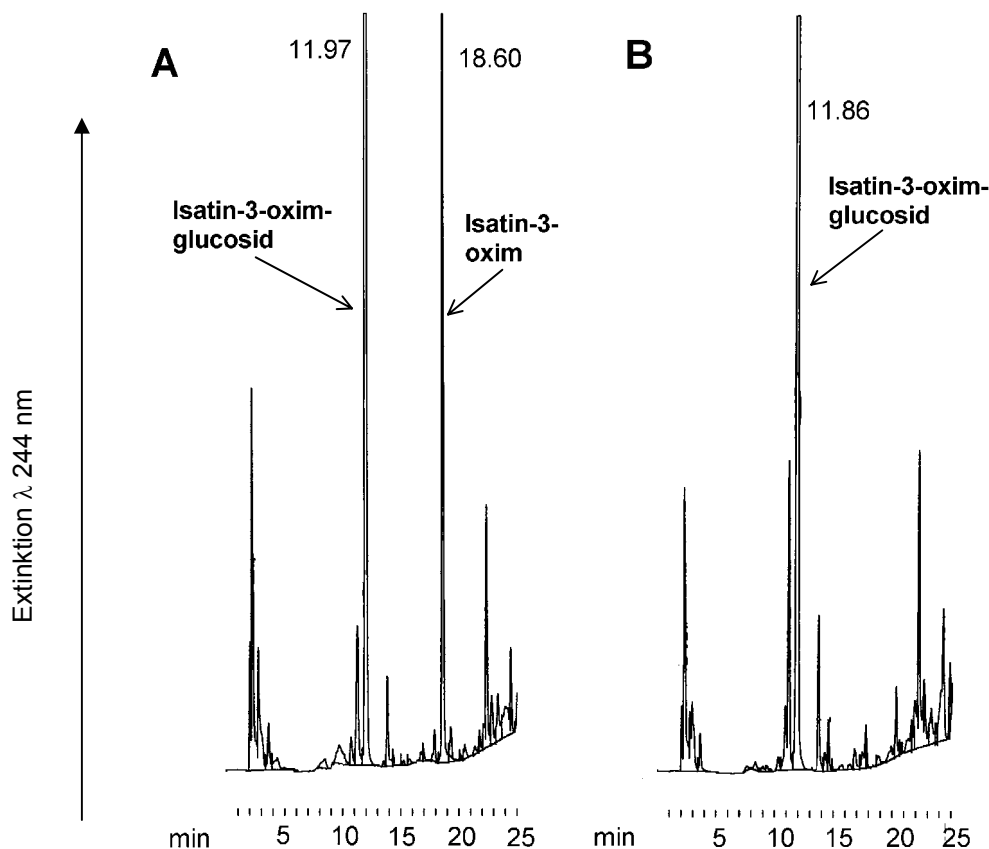
Nachdem in der Literatur bisher nur die Glucosidbildungen von Alkoholen und Phenolen beschrieben wurden, war es von Interesse, zu untersuchen, ob auch die OH-Gruppierung eines Oxims glucosyliert werden kann. Des weiteren sollte diese Umsetzung, falls möglich, auch mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie untersucht werden. Für diese Fragestellung bot sich Isatin-3-oxim an, ein Molekül dessen chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome und der dazugehörigen Protonen hauptsächlich im Aromatenbereich zwischen 6 und 8 ppm bzw. 100 und 135 ppm liegen. In diesem Bereich sind so gut wie keine Hintergrundsignale der Zellkultur von Zuckern und Aminosäuren vorhanden. Zudem wird diese Region des Spektrums auch nicht durch das Wassersignal beeinträchtigt [122].

##### 1.1.1 Charakterisierung und Isolierung des Biotransformationsproduktes aus pflanzlichen Zellen von *R. serpentina* nach Applikation von Isatin-3-oxim

Um die zeitliche Umsetzung des Oxims zu beobachten, wurden 200 mg Isatin-3-oxim in 80 ml LS-Medium suspendiert, anschließend autoklaviert und die erhaltene Suspension unter keimfreien Bedingungen zu einer 5 Tage alten *R. serpentina* (T30)-Zellsuspensionskultur in einen 1 l Erlenmeyerkolben gegeben (siehe II.1). Es wurden dann in bestimmten Zeitabständen (1, 24, 48,

72, 96, 168 h und 11 Tage nach Applikation des Substrates) Proben unter sterilen Bedingungen entnommen (siehe II.7). Analog wurde mit einer Zellkultur verfahren der kein Isatin-3-oxim zugesetzt wurde. Das Medium wurde von den Zellen durch Filtration abgetrennt, für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und anschließend mittels HPLC analysiert (Chromatographiebedingungen siehe II.5.2). Pro Probe wurden 1.4 g Zellen mit 10 ml MeOH im Ultraschallbad extrahiert (siehe II.7) und anschließend zentrifugiert (10 min bei 10000 x g). Der methanolische Extrakt wurde 1:3, das abgetrennte Medium 1:10 mit MeOH verdünnt und anschließend mit Hilfe der HPLC untersucht (siehe II.5.2.1, Gradient I). Die Chromatogramme der Proben zeigen, daß 1 h nach Zugabe des Substrates sowohl im Medium als auch in dem methanolischen Extrakt der Zellen Isatin-3-oxim vorhanden war. Dies wurde durch Coinjektion mit reinem Isatin-3-oxim ( $R_t \sim 18.6$  min) überprüft. In der 24 h nach Substratzugabe untersuchten Probe, ist in der Nährlösung keine Isatin-3-oxim mehr zu detektieren, d.h. das Substrat wurde vollständig von den Zellen aufgenommen. Im Chromatogramm des Zellextraktes der 24 h nach Substratzugabe erhaltenen Probe ist die Bildung einer neuen Substanz mit einer Retentionszeit von  $\sim 11.9$  min zu erkennen. Die Verbindung konnte in allen weiteren Proben (48, 72, 96, 168 h und 11 Tage nach Fütterung) der Extrakte detektiert werden. Da auch 11 Tage nach Substratzugabe kein weiteres neues Signal entstand, konnte angenommen werden, daß die Zellkultur das gebildete Produkt nicht weiter umsetzt.

Aufgrund der Vermutung, daß es sich bei dem Transformationsprodukt um ein Glucosid handelt, wurden 100  $\mu$ l des methanolischen Extraktes mit 200  $\mu$ l Citratpuffer (0.1 M, pH 5.3) und 100  $\mu$ l einer  $\beta$ -GlucosidaseLösung (0.2 U Glucosidase in 100  $\mu$ l Citratpuffer (0.1 M, pH 5.3)) versetzt, bei 37 °C für 1.5 h im Thermomixer inkubiert und diese Probe wurde anschließend nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g) nochmals mittels HPLC analysiert (siehe II.5.2.1, Gradient I). Analog wurde mit einer Kontrollprobe ohne Zusatz von  $\beta$ -Glucosidase verfahren. Aus den in Abbildung 6 dargestellten Chromatogrammen ist ersichtlich, daß die Glucosidase das entstandene Produkt zu einem Teil wieder zu Isatin-3-oxim umsetzte.



**Abbildung 6: HPLC-Beweis des Vorliegens eines Glucosids**

Die Chromatogramme (Bedingungen siehe II.5.2.1) dienen zur Identifizierung des Biotransformationsproduktes, das durch Fütterung von Isatin-3-oxim zu einer *R. serpentina*-Zellkultur gebildet wurde. **A:** Methanolischer Extrakt (nach 168 h Versuchszeit) versetzt mit 200 µl Citratpuffer und einer β-Glucosidase-Lösung, inkubiert bei 37 °C für 1.5 h; **B:** Kontrollansatz analog **A** nur ohne Zusatz von einer β-Glucosidase-Lösung. Die leichte Schwankung der Retentionszeit liegt im durchschnittlichen Fehlerbereich und kann darauf zurückgeführt werden, daß die Säule nicht konstant temperiert ist.

Zur Strukturbestimmung des Produktes wurde eine erneute Fütterung durchgeführt. Zu 400 ml einer 5 Tage alten *R. serpentina* (T30)-Zellkultur in einem 1 l Erlenmeyerkolben wurden 400 mg Isatin-3-oxim in 50 ml LS-Medium (keimfrei) gegeben. Die Zellen wurden 5 Tage nach Zugabe des Substrates vom Medium abgetrennt, gefriergetrocknet und schließlich mit 200 ml MeOH für 30 min im Ultraschallbad extrahiert (siehe II.7). Der methanolische Extrakt wurde eingeeengt und das Transformationsprodukt mit Hilfe einer präparativen DC mit dem Fließmittelgemisch FM 4 (siehe II.5.1) isoliert. Die Identifizierung

erfolgte über EI-MS,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Das isolierte Produkt wurde nach Acetylieren der OH-Gruppen mit einem Acetanhydrid/Pyridin Gemisch (siehe II.6.1) massenspektrometrisch untersucht und mit einem MS-Spektrum des Aglykons verglichen. Die für die acetylierten Glucoseresste charakteristischen Fragmente bei  $m/z$  109, 127, 169, 211, 271 und 331 waren im Spektrum eindeutig zu erkennen. Auch die Fragmente des Aglykons bei  $m/z$  144 und 118 konnten im Produktspektrum nachgewiesen werden.

Sowohl das in Abbildung 7 abgebildete Protonenspektrum als auch das DEPT-Spektrum des Produktes, dargestellt in Abbildung 8, zeigen eindeutig, daß es sich bei dieser Verbindung um das  $\beta$ -Glucosid des Isatin-3-oxims handelt. Die Signale zwischen 3.5 - 4.2 ppm im Protonen- und 60 - 80 ppm im DEPT-Spektrum können dem Glucoseresst zugeordnet werden. Wichtig für die Identifizierung sind vor allem die Verschiebungen des anomeren Kohlenstoffes bei 5.4/107 ppm. Diese Tieffeldverschiebung gegenüber der Glucose weist sehr eindeutig auf eine glucosidische Bindung hin. Aufgrund der ppm-Werte kann die Bildung eines  $\beta$ -Glucosids angenommen werden. Untermuert wird diese Aussage noch durch die Kopplungskonstante  $J_{\text{H}1'/\text{H}2'}$  von 7.3 Hz. Diese Größe ist typisch für  $\beta$ -Glucoside; die beiden koppelnden Protonen stehen axial/axial zueinander. Daraus resultiert aufgrund der Karplusbeziehung eine größere Kopplungskonstante als bei  $\alpha$ -Glucosiden. Diese Kopplung ist wegen der axial/equatorial Stellung der Protonen H1' und H2' und dem daraus resultierenden kleineren Diederwinkel geringer und liegt im Bereich von nur 3 - 4 Hz [123].

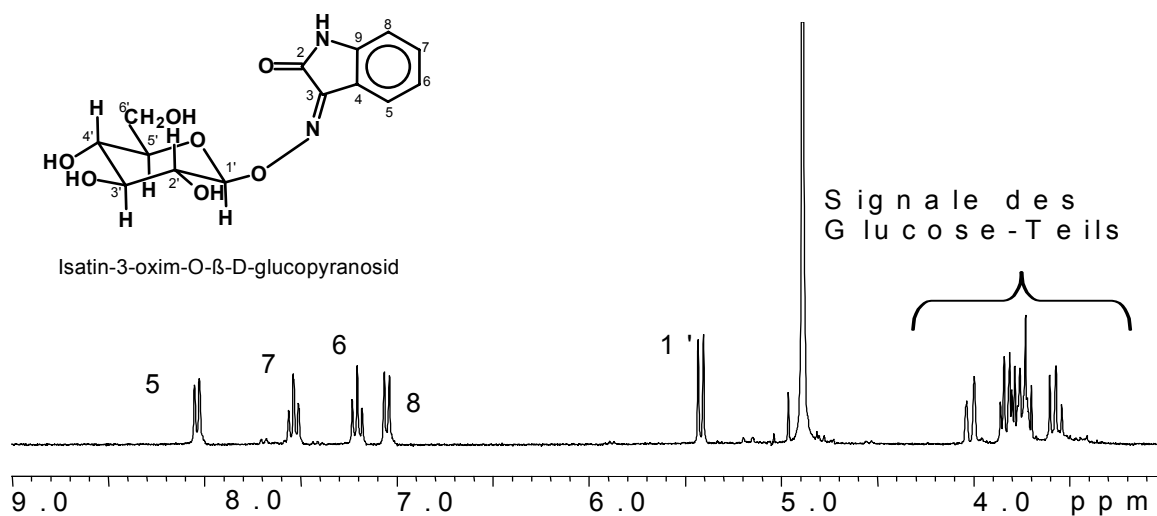


Abbildung 7: Protonenspektrum des Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosids

Das Biotransformationsprodukt wurde aus einer *R. serpentina*-Zellsuspensionskultur nach Fütterung mit Isatin-3-oxim isoliert. Das Spektrum wurde bei 300 MHz in D<sub>2</sub>O aufgenommen.

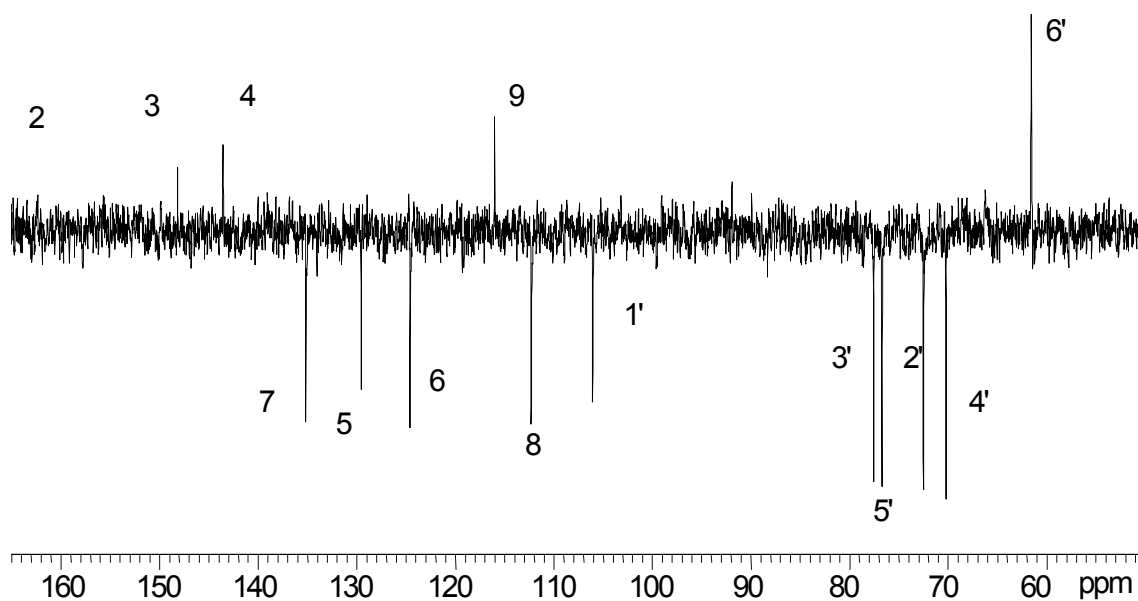


Abbildung 8: DEPT-Spektrum des Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosids

Das Biotransformationsprodukt wurde nach Fütterung von Isatin-3-oxim zu einer *R. serpentina*-Zellsuspensionskultur isoliert. Das Spektrum wurde bei 75 MHz in D<sub>2</sub>O aufgenommen.



### 1.1.2 Beobachtung der Biotransformation von Isatin-3-oxim mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie

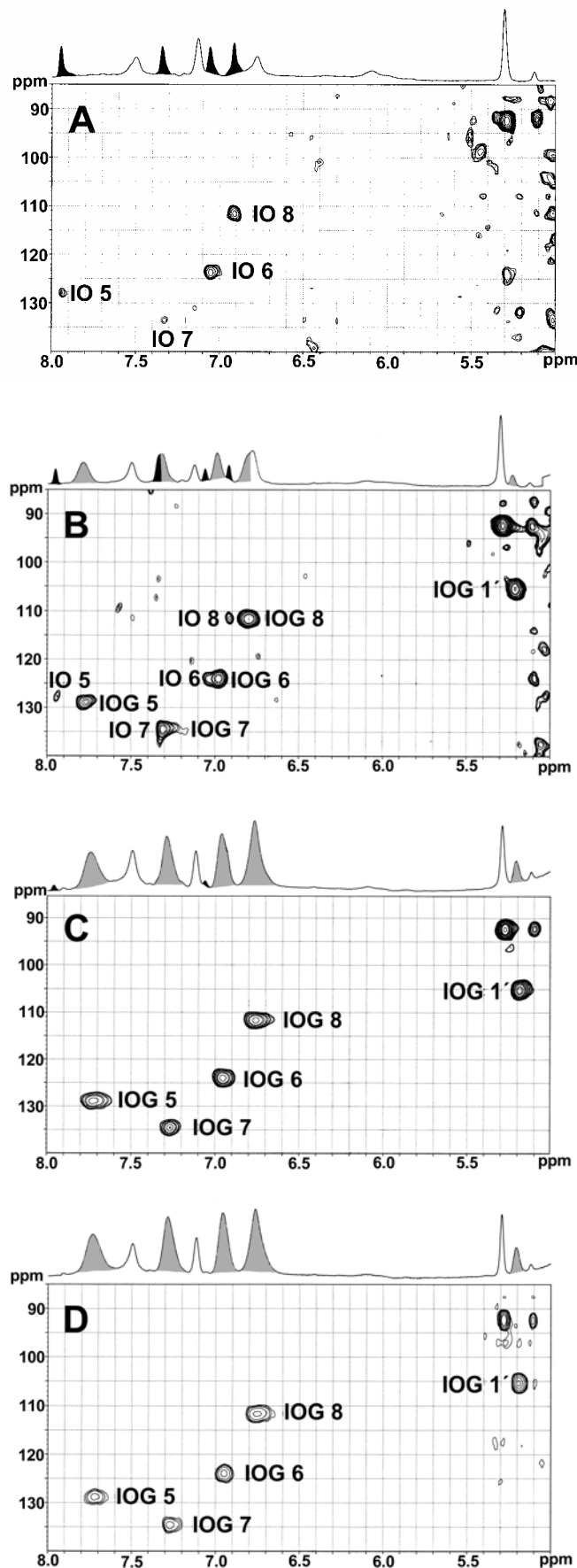
Die Beobachtung des Metabolismus von Vanillin in einer Zellsuspensionskultur von *Nicotiana plumbaginifolia* mit Hilfe der invers korrelierten *in vivo* NMR-Spektroskopie an einem 600 MHz Gerät hat gezeigt, daß diese Methode gegenüber der  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie einen deutlichen Empfindlichkeitsgewinn mit sich bringt [112].

Da mittlerweile auch die Möglichkeit bestand, Messungen an einem 800 MHz Gerät durchzuführen, wurde versucht, den Metabolismus des Isatin-3-oxims bei dieser Feldstärke *in vivo* zu beobachten. Es sollte zunächst geprüft werden, ob diese Methodik an diesem noch nie für *in vivo* Experimente eingesetzten Gerät so hoher Feldstärke überhaupt möglich ist. Da die NMR-Messungen am CERM (Florenz, Italien) stattfanden, mußten die Zellen im Flugzeug transportiert werden. Aus Platzgründen bei dem Transport wurden ausschließlich 5 Tage alte Kulturen von *Rauvolfia serpentina* (T30) in 300 ml Erlenmeyerkolben (150 ml Suspensionskultur) verwendet. Nach dem Transport wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen, wie in I.1 beschrieben, kultiviert. Es wurden 100 mg Isatin-3-oxim in 80 ml LS-Medium (keimfrei) zu 5 Tage alten Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia serpentina* (T30) gegeben, so daß eine Startkonzentration des Oxims von 5.7 mM erreicht wurde. Anschließend wurden nach ca. 10 min, 24, 48 und 72 h Proben entnommen, in ein 5 mm NMR-Röhrchen transferiert (siehe II.7 und II.8) und an einem 800 MHz Gerät vermessen. Es wurde die HSQC-Pulssequenz "invietgpsi" mit den in Tabelle 1 aufgeführten Parametern verwendet.

**Tabelle 1: NMR-Parameter zur *in vivo* Verfolgung der Biotransformation des Isatin-3-oxims**

| CPD                     | GARP      |
|-------------------------|-----------|
| Linear Prediction in f1 | 128       |
| Scans                   | 4         |
| Dummy Scans             | 32        |
| Acquisition time        | 0.05125 s |
| Relaxation delay        | 2 s       |
| Gradient ratio          | 80:20.1   |
| Recycle time            | 2.05125 s |

Der zeitliche Verlauf der Biotransformation wurde anhand der vier aromatischen Signale des Isatinoxims verfolgt. Wie Abbildung 9A zeigt, sind ca. 10 min nach dem Substratzusatz alle vier aromatischen Signale des Isatinoxims bei 7.93/128.0 (IO 5), 7.33/133.5 (IO 7), 7.06/123.5 (IO 6) und 6.91/111.5 ppm (IO 8) vorhanden. Nach 24 h (siehe Abbildung 9B) ist der Metabolismus des Isatinoxims fast abgeschlossen. Neben den drei schwachen Signalen des Oxims sind drei weitere Signale im Aromatenbereich zu erkennen bei 7.78/128.7 (IOG 5), 6.98/123.8 (IOG 6) und 6.80/111.5 ppm (IOG 8), sowie die starke Verbreiterung des Crosspeaks von IO 7. Diese Signalverbreiterung mag darauf zurückzuführen sein, daß zwei Signale nicht vollständig aufgelöst sind und überlappen, in diesem Fall die Signale von IO 7 und IOG 7. Alle vier neuen Signale können dem Glucosid zugeordnet werden. Zur weiteren Identifizierung des Transformationsproduktes dient ein zusätzliches, neues Signal bei 5.2/105 ppm, welches dem anomeren C1'-Proton bzw. Kohlenstoff zuzuschreiben und für Glucoside charakteristisch ist. Die Probe nach 48 h (siehe Abbildung 9C) zeigt in der zweidimensionalen Darstellung nur noch die Crosspeaks des Isatin-3-oxim-O- $\beta$ -D-glucopyranosids. Lediglich im darüber dargestellten Protonenspektrum sind Reste der Ausgangsverbindung (ca. 5 %) zu erkennen. Die Biotransformation ist 72 h (siehe Abbildung 9D) nach Zugabe des Substrates abgeschlossen.



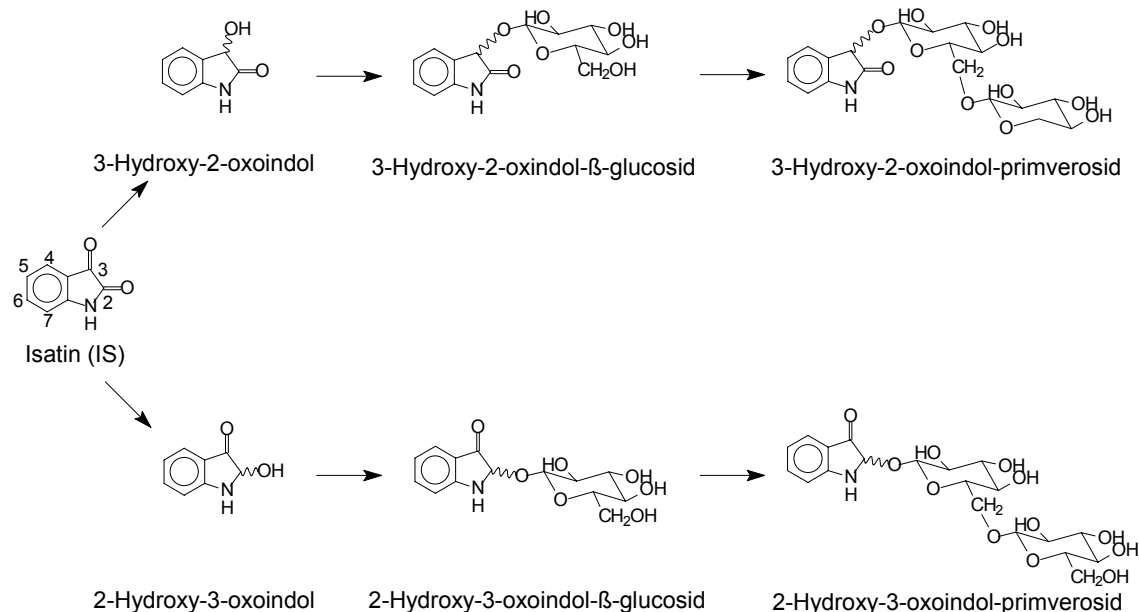
**Abbildung 9:** 2D *in vivo* NMR-Spektren einer *R. serpentina*-Zellkultur nach Applikation von Isatin-3-oxim

Zeitlicher Verlauf der Biotransformation des Isatin-3-oxims in einer *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskultur aufgenommen mit Hilfe der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Die Spektrenaufnahme erfolgte an einem Bruker AVANCE 800 Spkretrometer **A:** 10 min, **B:** 24 h, **C:** 48 h und **D:** 72 h nach Zusatz des Substrates. Die Meßzeit jedes Spektrums betrug 19 min bzw. 4 Scans. Alle Proben enthielten ca. 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: IO 5, IO 6, IO 7 und IO 8 für die aromatischen Signale des Isatin-3-oxims. IOG 5, IOG 6, IOG 7 und IOG 8 für die aromatischen Signale des Isatin-3-oxim-O- $\beta$ -D-glucopyranosids und IOG 1' für das Signal des anomeren Kohlenstoffes (vergleiche Abbildung 7).

## 1.2 Biotransformationsversuche mit Isatin

Isatin (Indol-2,3-dion) ist ein Oxidationsprodukt des Farbstoffes Indigo und ein endogenes Indolderivat in vielen Organismen. In pharmakologischen Studien zeigte es *in vitro* und *in vivo* eine Monoaminoxidase B hemmende Wirkung [124], als auch die Inhibierung weiterer Enzyme u.a. der Acetylcholinesterase [125] oder der durch das atrial natriuretischen Peptid stimulierten Guanylat Zykklase [126]. In Tierversuchen zeigt Isatin eine Reihe von weiteren pharmakologischen Aktivitäten wie z.B. dosisabhängige sedative und auch anxiogene Effekte [126], [127]. Vielen Derivaten des Isatins, vor allem einigen Mannich-Basen oder Thiosemicarbaziden, konnten antivirale [128-131], antifungale [130], [131], antibakterielle [130], [131], antikonvulsive [132], anti-inflammatorische [133] und antitumorale [134] Aktivitäten nachgewiesen werden.

Somit war es von Interesse, die Biotransformation des Isatins in *R. serpentina*-Zellsuspensionskulturen zu untersuchen. Durch frühere Biotransformationsversuche mit *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen war bekannt, daß es nach einer vorausgegangenen Reduktion einer Carbonylgruppe zum Alkohol zur Bildung eines  $\beta$ -Glucosids (-O- $\beta$ -D-glucopyranosid) mit nachfolgender Primverosidbildung, d.h. der Bildung eines -6-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranosids, kommen kann [111]. Da nicht bekannt war, welche der beiden Carbonylgruppen des Isatins reduziert wird, konnten durch die Reduktion theoretisch zwei Konstitutionsisomere, d.h. 2-Hydroxy-3-oxoindol oder 3-Hydroxy-2-oxoindol, entstehen, die durch Glucosylierung zu den jeweiligen Glucosiden umgesetzt werden und aus denen dann schließlich zwei Primveroside hervorgehen können. Abbildung 10 faßt die möglichen Biotransformationsprodukte zusammen.



**Abbildung 10: Mögliche Produkte der Biotransformation von Isatin in *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen**

Die Bezeichnung Glucosid steht für ein -O-β-D-glucopyranosid, die Bezeichnung Primverosid für ein -6-O-(β-D-xylopyranosyl)-O-β-D-glucopyranosid. Die geschlängelte Bindung soll zum Ausdruck bringen, daß durch die Reduktion des Isatins theoretisch zwei unterschiedliche Enantiomere erhalten werden können.

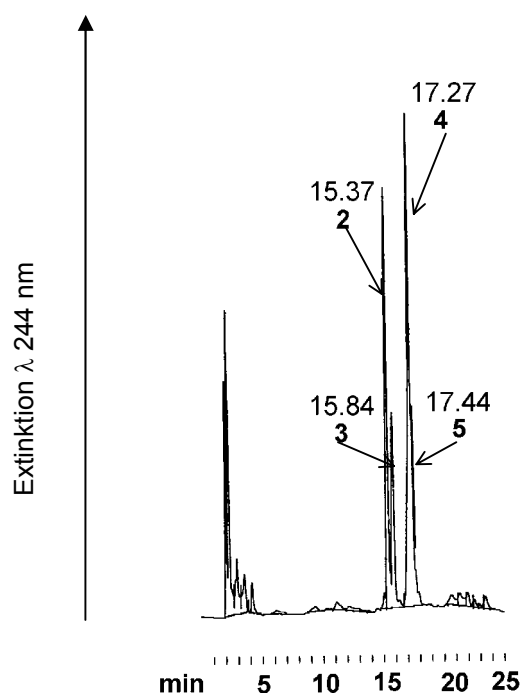
### 1.2.1 Identifizierung und Charakterisierung der Biotransformationsprodukte aus einer *R. serpentina*-Zellsuspensionskultur nach Applikation von Isatin

Aus Vorversuchen war bekannt, daß Isatin in Konzentrationen höher als 1 mg/ml toxisch für *R. serpentina*-Zellkulturen ist. Diese Konzentration wurde von der Zellkultur nur akzeptiert, wenn das Substrat bei Zugabe in MeOH/LS-Medium (1:1) gelöst vorlag. Auch das Lösungsmittel hat einen Einfluß auf die Verträglichkeit. Beim Lösen in einem EtOH/LS-Medium (1:1) Gemisch war die Akzeptanz des Substrates wesentlich geringer als beim Lösen in MeOH und LS-Medium (1:1).

Nach Zugabe von Isatin zu einer Zellkultur von *R. serpentina* kam es zu einer unmittelbaren Orangefärbung der Kultur durch das Substrat. Diese Färbung verschwand innerhalb kurzer Zeit wieder, was auf eine schnelle Bio-

transformation des Isatins schließen ließ. Der weitere Verlauf der Biotransformation und die Anzahl der entstehenden Produkte wurde mit Hilfe der HPLC analysiert. Hierfür wurden 200 mg Isatin in 30 ml einer MeOH/LS-Medium Lösung (1:1) gelöst und zu einer 5 Tage alten *R. serpentina* (T30)-Zellkultur in einen 1 l Erlenmeyerkolben gegeben (siehe II.7). Nach ca. 3, 24, 48, 72, 96, 168 h und 11 Tagen wurden Proben unter keimfreien Bedingungen entnommen und HPLC-analytisch untersucht. Dafür wurden jeweils 1.4 g Zellgewebe durch Filtration vom Medium getrennt. Das Medium wurde 1:10 verdünnt und nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g) mittels HPLC untersucht (siehe II.5.2, Gradient II). Das Zellgewebe wurde mit MeOH im Ultraschallbad für 20 min extrahiert, der methanolische Extrakt wurde zentrifugiert (10 min, 10000 x g) und nach verdünnen mit MeOH 1:3 in die HPLC injiziert. Zum Vergleich der HPLC-Chromatogramme wurde zusätzlich eine Zellkultur, analog wie oben beschrieben, nur ohne Isatin Zugabe behandelt, um in der Zellkultur natürlich vorkommende Inhaltsstoffe zu identifizieren. Schon drei Stunden nach Fütterung ist zu erkennen, daß das zugegebene Isatin nahezu vollständig zu einem Produkt (**1**) mit einer Retentionszeit von ~ 16.7 min umgesetzt wurde. Zu diesem Zeitpunkt befand sich das Produkt (**1**) hauptsächlich im Medium. In den zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Proben der Nährlösung nahm die Konzentration dieses Produktes ab. In den Chromatogrammen der Zellextrakte ist neben dem Produkt **1** die Bildung zweier neuer Transformationsprodukte zu beobachten. In der Probe 48 h nach Substratzugabe sind zwei neue Signale (Produkte **2** und **3**) mit den Retentionszeiten ~ 15.4 und ~ 15.8 min zu beobachten, weitere 24 h später beginnt die Bildung von zwei weiteren Substanzen (Produkte **4** und **5**) mit den Retentionszeiten ~ 17.3 und ~ 17.4 min unter Abnahme der Peakflächen der Produkte **2** und **3**. In Abbildung 11 ist das Chromatogramm des methanolischen Extraktes der Probe dargestellt, die 1 Woche nach Fütterung entnommen wurde. Um die methanolischen Extrakte auf  $\beta$ -Glucoside zu testen, wurden 100  $\mu$ l der Probe, die 168 h nach Substratzugabe entnommen wurde, mit 200  $\mu$ l Citratpuffer (0.1 M, pH 5.3) und 100  $\mu$ l einer  $\beta$ -Glucosidase-Lösung (0.2 U Glucosidase in 100  $\mu$ l Citratpuffer (0.1 M, pH 5.3)) versetzt. Diese Lösung wurde bei 37 °C für

1.5 h im Thermomixer inkubiert und anschließend nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g) nochmals mit Hilfe der HPLC untersucht (siehe II.5.2.1, Gradient I). Analog wurde mit einer Kontrollprobe ohne Zusatz von  $\beta$ -Glucosidase verfahren. Im Chromatogramm der Probe, inkubiert mit  $\beta$ -Glucosidase, ist zu erkennen, daß beide Signale mit den Retentionszeiten von  $\sim 15.4$  und  $\sim 15.8$  min fast vollständig verschwunden sind und ein Signal mit der Retentionszeit des Produktes **1** nachweisbar ist. Da die Retentionszeiten der Produkte sehr nahe beieinander lagen, wurde das Experiment mit einem weiteren HPLC-Gradienten (siehe II.5.2, Gradient I) wiederholt. Diese Untersuchung bestätigte das erhaltene Ergebnis.



**Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Zellextrakts einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur eine Woche (168 h) nach Zugabe von Isatin**

Zu den Chromatographiebedingungen siehe II.5.2.1 (Gradient II).

Um nun die Biotransformationsprodukte zu isolieren und sie anschließend zu identifizieren, wurden zwei weitere Fütterungen durchgeführt. Zu einer 4 Tage alten T30-Zellkultur, welche im 1 l Kolben unter Standardbedingungen (siehe II.1) kultiviert wurde, wurden jeweils 400 mg Isatin gegeben, gelöst in 30 ml 50 %igem MeOH (15 ml LS-Medium und 15 ml MeOH). Da nicht zu jedem Zeitpunkt alle fünf Produkte in gleichem Umfang gebildet wurden, wurden die Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, vier und sechs Tage nach Substratzugabe, geerntet. Die Zellgewebe wurden jeweils vom Medium getrennt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die getrockneten Zellen wurden mit MeOH im Ultraschallbad für 30 min aufgeschlossen, die Suspension wurde filtriert und der methanolische Extrakt am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingengt (vgl. II.7). Der 4-Tage nach Substratzugabe erhaltene Extrakt wurde mit der Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie (FM 4) aufgereinigt (siehe II.5.1); es wurden zwei Substanzen isoliert, die als Produkt 1 und als ein Gemisch aus den Produkten 2 und 3 identifiziert werden konnten. Die Eigenschaften der unbekanntenen Substanzen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Eigenschaften der Biotransformationsprodukte 1, 2 und 3 der Isatin-Metabolisierung**

|                                  | Produkt 1                               | Produkt 2 und 3                                       |
|----------------------------------|---|---|
| Rf-Werte<br>(FM 4, siehe II.5.1) | 0.79                                    | 0.48  |
| UV-Detektion bei<br>254 nm       | Fluoreszenzlöschung                     | Fluoreszenzlöschung                                   |
| Besprühen<br>mit SR 2            | keine Färbung                           | Rotfärbung  |
| Rt<br>(siehe II.5.2.1)           | 12.8 (Gradient I)<br>16.7 (Gradient II) | 10.7 & 10.9 (Gradient I)<br>15.4 & 15.8 (Gradient II) |

Nach längerem Stehen an der Luft war bei Produkt 1 eine Orangefärbung zu beobachten, was wahrscheinlich auf die Rückoxidation zu Isatin durch den Luftsauerstoff zurückzuführen ist. Das MS Spektrum, das Verunreinigungen durch die postulierte Rückoxidation mit Isatin aufweist, zeigt einen Molekularpeak bei  $m/z$  149. Dieser Molekularpeak ist um 2 Einheiten gegenüber dem



des Isatins ( $m/z$  147) erhöht. Dies läßt auf eine Reduktion einer der beiden Carbonylgruppen schließen. Mit einem Vergleich von MS-Daten von synthetisch hergestelltem 3-Hydroxy-2-oxoindol und Literaturdaten [135] konnte die isolierte Substanz (Produkt **1**) als Dioxindol (3-Hydroxy-2-oxoindol) identifiziert werden. Dies wurde nochmals durch HPLC-Coinjektionsexperimente mit synthetischem Dioxindol bestätigt.

Das Massenspektrum des Produktgemisches **2** und **3** entspricht dem Spektrum des Aglykons (3-Hydroxy-2-oxoindol). Das Massenspektrum der acetylierten Substanz zeigt die charakteristischen Fragmente für acetylierte Glucoseresste bei  $m/z$  109, 127, 169, 211, 271 und 331, sowie Fragmente des Aglykons. Die Rotfärbung nach Besprühen mit SR 2 (siehe II.5.1) ist neben den Massenspektren und der Inkubation mit  $\beta$ -Glucosidase ein weiterer Hinweis auf  $\beta$ -Glucoside. Da die isolierten Mengen gering und die Substanzen nicht vollständig rein waren, wurde zunächst auf die Aufnahme eines NMR-Spektrums verzichtet.

Zur Vorreinigung des 6-Tage nach Substratzugabe erhaltenen Extraktes wurde die Flash-Chromatographie (vergleiche II.5.3) benutzt. Der Extrakt wurde im Fließmittelsystem FM 4 (siehe II.5.3) gelöst und, wie unter II.5.3 beschrieben, auf die Säule aufgebracht; die Elution erfolgte mit 200 ml des Fließmittelsystems.

Die einzelnen Fraktionen wurden analog II.5.3 getestet. In den Fraktionen konnten zwei Verbindungen detektiert werden. Diese wurden jeweils vereinigt und nach Einengen unter Vakuum weiter aufgearbeitet.

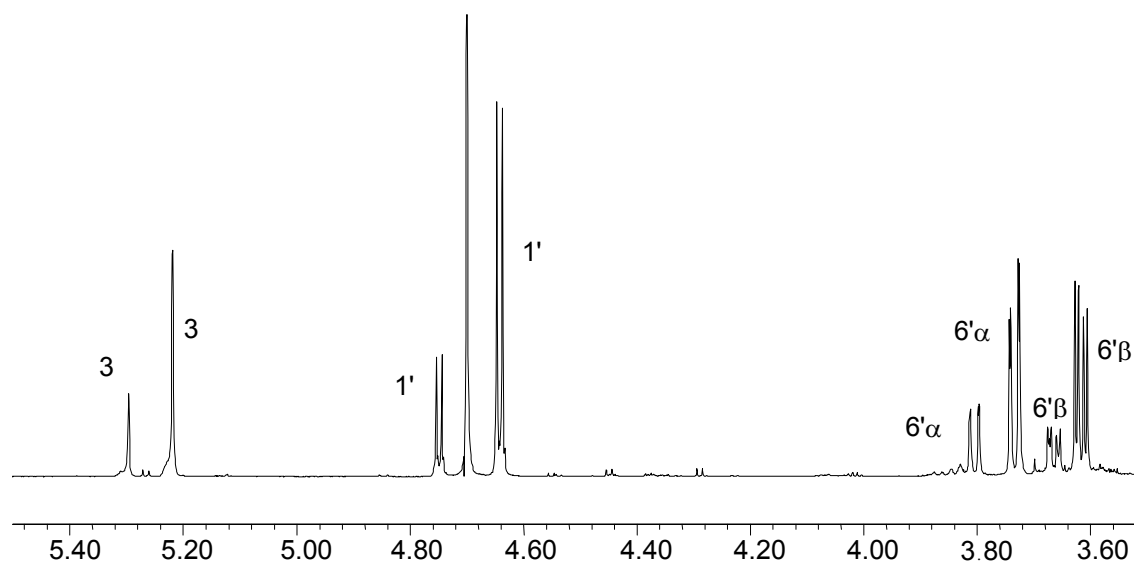
Als zweiter Reinigungsschritt diente die präparative DC. Es wurden DC-Platten mit einer Schichtdicke von 0.5 cm verwendet, als Laufmittel diente FM 4 (siehe II.5.1). Nach Elution der Substanzen wurde eine weitere präparative DC zur Feinreinigung durchgeführt. Es wurden DC-Platten mit einer Schichtdicke von 0.2 cm und das Fließmittelsystem FM 5 (siehe II.5.1) verwendet.

Zur Identifizierung wurden die isolierten Verbindungen als erstes mittels HPLC analysiert. Die Chromatogramme ergaben, daß es sich bei einer der isolierten Verbindungen um ein Gemisch, identisch mit den Produkten **2** und **3**, handelt, d.h. die beiden Produkte konnten auch nicht auf diese Weise getrennt werden. Die zweite isolierte Verbindung zeigt die Retentionszeiten der

Produkte **4** und **5** von  $\sim 17.3$  und  $\sim 17.4$  min, auch hier handelte es sich um ein Gemisch zweier Verbindungen. Zur weiteren Identifizierung diente die NMR-Spektroskopie. Dem aufgenommenen Protonenspektrum des Gemisches der Produkte **2** und **3** (siehe VIII Spektroskopischer Anhang) ist eindeutig zu entnehmen, daß es sich bei den isolierten Substanzen um zwei Glykoside des Dioxindols handelt. Ein Ausschnitt des Spektrums ist in Abbildung 12 dargestellt. Alle Signale sind doppelt vorhanden, sie überlappen zwar in den meisten Fällen, einige sind jedoch klar voneinander zu unterscheiden, wie z.B. die Signale im Teil des Spektrums von 3.5 - 5.5 ppm. Hier sind das Proton an C3, die Protonen H6' $\alpha$  und H6' $\beta$  des vermutlichen Glucoserestes und das Proton des anomeren Kohlenstoffs C1' sichtbar. Alle Signale kommen doppelt in konstanten Größenverhältnissen vor. Die Kopplungskonstante von über 7 Hz beider C-H1'-Signale ist ein Hinweis dafür, daß beide Verbindungen eine  $\beta$ -glucosidische Bindung besitzen [123]. Nach den vorausgegangenen Untersuchungen und mit Hilfe der NMR-Spektren, insbesondere den  $^{13}\text{C}$ -Daten (siehe V Spektroskopische Daten des Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosids), kann die Hauptkomponente des Gemisches (Produkt **2**) eindeutig als Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid identifiziert werden. Die Identifizierung des Nebenproduktes (Produkt **3**) erweist sich als schwieriger. Zwar können durch die Reduktion des Isatins zwei unterschiedliche Enantiomere entstehen, die durch Glucosylierung zu zwei unterschiedlichen  $\beta$ -Glucosiden umgesetzt werden können. Jedoch handelt es sich auch bei diesen um Enantiomere, die NMR-spektroskopisch und auch unter den angewandten chromatographischen Bedingungen nicht unterschieden werden können. Die ppm-Werte der Protonen H1', H3, H6' $\alpha$  und H6' $\beta$  des Produktes **3** zeigen eine Tieffeldverschiebung gegenüber den Protonen des Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosids von ca. 0.1 ppm. Die Signale weisen jedoch identische Kopplungskonstanten auf.

Die chemischen Verschiebungen für C3 und C1' und C6' des Nebenproduktes (Produkt **3**) sind nach dem HSQC-Spektrum (siehe VIII Spektroskopischer Anhang) mit denen des Hauptproduktes identisch. Auch bei den weiteren  $^{13}\text{C}$ -Werten sind keine Abweichungen der ppm Werte im Vergleich zu Dioxindol- $\beta$ -glucosid erkennbar. Wenn es sich bei Produkt **3** um ein anderes Glykosid des

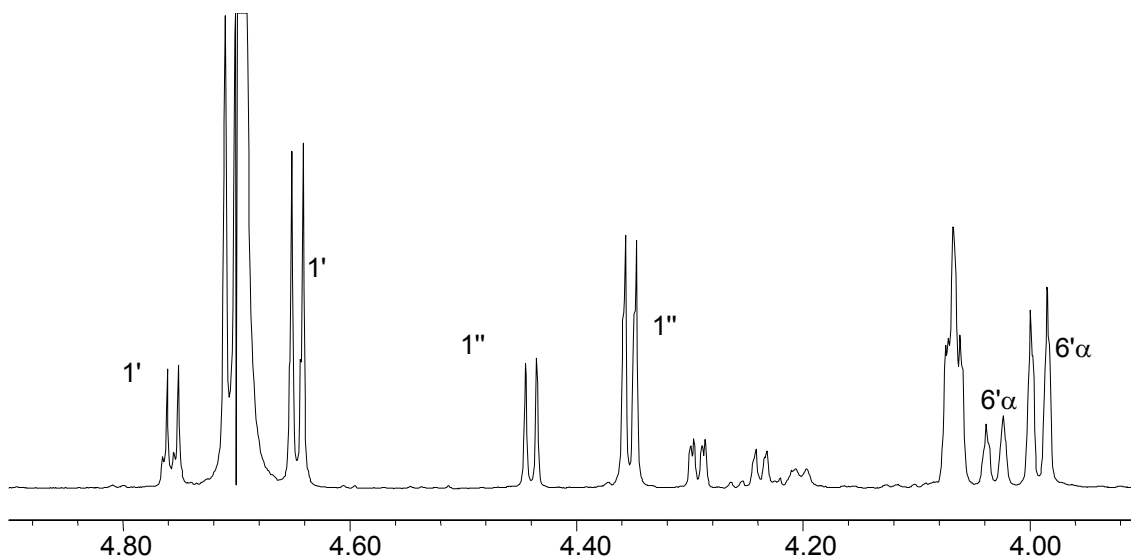
Dioxindols handeln würde, wäre eigentlich auch mit einer Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Werte zu rechnen. Aufgrund dieser Daten und der Tatsache, daß das Nebenprodukt durch  $\beta$ -Glucosidase in einem gleichen Verhältnis wie Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid abgebaut wird, kann das Auftreten zweier Rotationsisomere des Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosids vermutet werden.



**Abbildung 12: Auszug aus dem Protonenspektrum des Gemisches der Biotransformationsprodukte 2 und 3**

Die Produkte wurden aus einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur nach Fütterung von Isatin isoliert. Das Spektrum wurde bei 800 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen.

Das Protonenspektrum des zweiten Gemisches läßt erkennen, daß die beiden Glucoside wahrscheinlich weiter zu zwei Primverosiden umgesetzt wurden. Auch hier erscheint das Signal C-H1" der neuen Zuckereinheit doppelt. Die Kopplungskonstanten beider Signale liegen bei 7.8 Hz, was die  $\beta$ -Stellung der OH-Gruppe bestätigt (siehe Abbildung 13). Das Spektrum weist trotz Reinigung des Gemisches über zwei präparative DC-Platten Verunreinigungen auf, so daß die weitere Zuordnung der Zuckersignale schwierig ist. Mit Hilfe eines HSQC-Spektrums (siehe VIII Spektroskopischer Anhang) und Literaturdaten des p-Hydroxyphenyl-O- $\beta$ -D-primverosids [121] konnten einige wichtige Signale zugeordnet und die Hauptkomponente des Gemisches (Produkt 4) mit großer Sicherheit als Dioxindol-O- $\beta$ -D-primverosid identifiziert werden.



**Abbildung 13: Auszug aus dem Protonenspektrum des Gemisches der Biotransformationsprodukte 4 und 5**

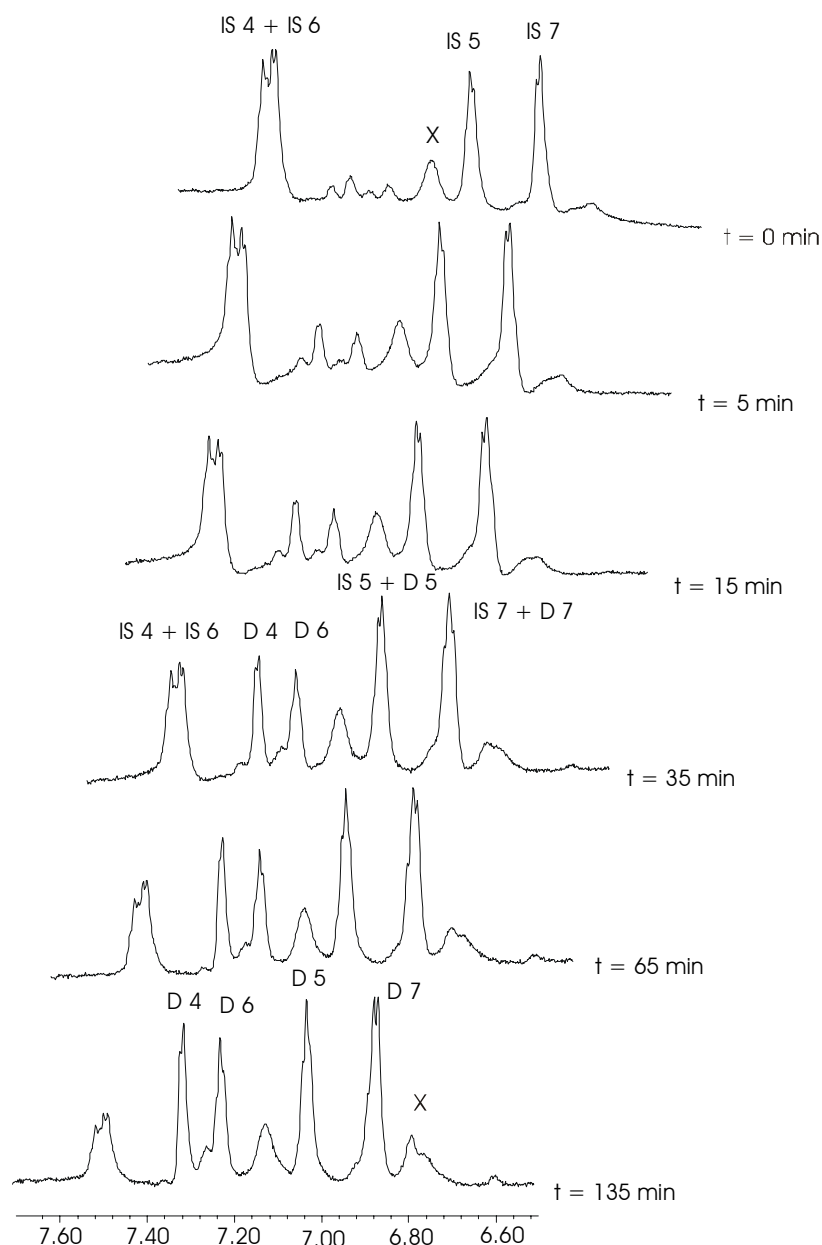
Die Produkte wurden aus einer *R. serpentina*-Zellkultur nach Zugabe von Isatin isoliert. Das Spektrum wurde bei 800 MHz in D<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 1.2.2 Untersuchung der Biotransformation von Isatin mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie

Aus den vorausgegangen Versuchen konnte geschlossen werden, daß die Reduktion des Isatins zu Dioxindol sehr schnell verläuft. Aus diesem Grund wurde versucht, diesen Reaktionsschritt mit der <sup>1</sup>H-Spektroskopie zu verfolgen. Von der Fütterung der Substanz bis zur direkten Messung kann eine Zeit (siehe II.7) von mindestens einer halben Stunde vergehen und da die Meßzeit bei der invers korrelierte NMR-Spektroskopie bisher bei mindestens 20 min lag, um ein gutes Spektrum zu erhalten, war es unwahrscheinlich, auf diesem Wege Isatin und Dioxindol gleichzeitig nachweisen zu können. Da durch die angenommene Reduktion der Carbonylgruppe zum Alkohol eine Verschiebung der aromatischen Signale zu erwarten war, bot sich eine Fütterung direkt im NMR-Röhrchen an, um die Biotransformation des Isatins dann mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie zu verfolgen. Alle nachfolgend aufgeführten Messungen in diesem Kapitel wurden am CERM (Florenz, Italien)

durchgeführt. Ungefähr 1.5 ml einer fünf Tage alten *T30*-Zellkultur wurden in ein 5 mm NMR-Röhrchen transferiert und eine Isatinlösung (in D<sub>2</sub>O und MeOH (1:1)) wurde mit Hilfe einer Spritze zu den Zellen gegeben, so daß eine Isatin-Konzentration von 4 mM erreicht wurde. In Abbildung 14 sind die NMR-Spektren dargestellt. Jedes Spektrum wurde an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mm TXI <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-D XYZ-GRD Probenkopf, mit 32 Scans in 2 min aufgenommen. Zur Wasserunterdrückung diente die Watergate-Pulssequenz.

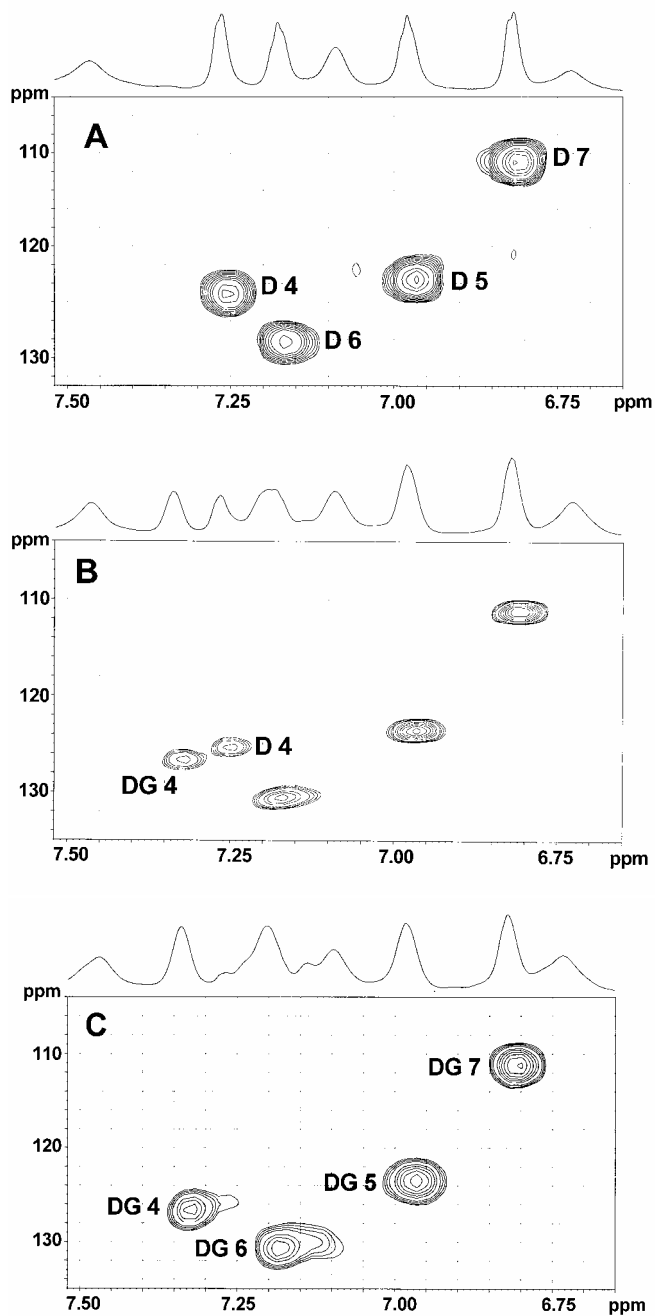
Das erste Spektrum wurde 7 min nach Applikation des Substrates ( $t = 0$ ) aufgenommen. Es folgten fünf weitere Messungen nach 5, 15, 35, 65 und 135 min. In Abbildung 14 ist nur der Aromatenbereich der Spektren dargestellt. Im ersten Spektrum mit  $t = 0$  sind drei Signale zu erkennen. Zwei Protonen des Isatins, IS 4 und IS 6, liegen bei ~7.5 ppm und überlappen, die Protonen IS 5 und IS 7 liegen bei 6.75 bzw. 6.95 ppm. Schon 5 min später sind zwei neue Signale bei 7.23 und 7.32 ppm zu erkennen, die den Dioxindolprotonen D 6 und D 4 zuzuordnen sind. Die Intensität dieser Signale nimmt in den später aufgenommenen Spektren immer weiter zu, während die Intensität der beiden überlappenden Isatin-Signale entsprechend abnimmt. Die beiden anderen aromatischen Signale der zwei Verbindungen überlappen jeweils leicht, jedoch ist bei den Signalen des Dioxindol eine leichte Tieffeldverschiebung zu erkennen. Die Reaktion zeigt keine 100 %ige Konversationsrate, was auf das fehlende Schütteln und das dadurch nicht vollständige Durchmischen der Zellen mit dem Substrat zurückzuführen ist.



**Abbildung 14:**  $^1\text{H}$  *in vivo* NMR-Spektren einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur nach Applikation von Isatin

Die Spektren zeigen den Zeitverlauf der Reduktion von Isatin (IS) zu Dioxindol (D) aufgezeichnet bei 800 MHz in einer *R. serpentina*-Zellkultur. Acquisition time 1.64 s; Recycle time 3.64 s und Recovery Delay 0.1 ms. Es wurden folgende Abkürzung verwendet: X = Hintergrundsignale; IS 4, IS 5, IS 6, IS 7 stehen für die entsprechend numerierten Protonen des Isatins und D 4, D 5, D 6, D 7 für die Protonen des Dioxindols (siehe Abbildung 10).

Die erwarteten zwei weiteren Transformationsschritte, die Bildung des Glucosids und die des Primverosids, sollten mit Hilfe der invers korrelierten NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Dafür wurden 90 mg Isatin, gelöst in MeOH und Wasser, zu 150 ml einer 5 Tage alten *R. serpentina* (T30)-Zellkultur gegeben, die in einem 300 ml Erlenmeyerkolben kultiviert wurde. Jeweils 2, 24, 48, 72 und 96 h nach der Fütterung wurde eine Probe entnommen, diese in ein NMR-Röhrchen transferiert und nach Zugabe von D<sub>2</sub>O, ca. 10 % des Gesamtvolumens, an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer vermessen. Jedes Spektrum wurde mit 4 Scans in 19 min aufgezeichnet (Parameter siehe III.1.2). Abbildung 15A verdeutlicht, daß zwei Stunden nach Fütterung alle vier C-H-Signale des Dioxindols im Aromatenbereich bei 6.81/111 (D 7); 6.87/123 (D 5); 7.17/130 (D 6) und 7.26/125 ppm (D 4) zu sehen sind. Das heißt, die vorangegangene Reduktion des Isatins zum Dioxindol war abgeschlossen, da keine Signale des Isatins mehr zu erkennen sind. In Abbildung 15B, (Spektrum der 48 h nach Zugabe entnommenen Probe), erscheint ein neuer Crosspeak bei 7.32/126 ppm (DG 4). Die drei übrigen Signale sind leicht verbreitert, was auf das Vorhandensein von zwei Verbindungen zurückzuführen ist, deren Signale nicht aufgelöst voneinander vorliegen. In Abbildung 15C ist die fast vollständige Umsetzung des Eduktes zu erkennen; der Crosspeak der Ausgangsverbindung bei 1.26/125 ppm ist kaum mehr zu sehen. In Abbildung 16 sind weitere Ausschnitte der Spektren dargestellt, die die Umsetzung des Dioxindol zum Glucosid dokumentieren. Nach 2 Stunden ist das Signal 4.93/70 ppm für den Kohlenstoff D 3 des Dioxindol zu erkennen (siehe Abbildung 16A). Dieses Signal ist in den späteren Spektren nicht mehr zu sehen, dafür erscheinen zwei neue Crosspeaks bei 5.20/76 und 5.12/76 ppm (siehe Abbildung 16B). Diese können dem C-H3 des Dioxindolglucosids zugeordnet werden. Als weiterer Hinweis für die Glucosylierung dient das Signal des anomeren Kohlenstoffes DG 1' bei 4.20/103 ppm. Dieses Signal ist sehr stark verbreitert, was auf das Verschmelzen zweier Crosspeaks zurückzuführen ist (siehe Abbildung 16C). Auch in den *in vivo* Spektren ist eine Verdopplung der Signale C-H3 und C-H1' zu erkennen, was mit den vorausgegangenen Versuchen übereinstimmt. Die Bildung des Primverosids konnte unter den aufgeführten Bedingungen nicht mit der *in vivo* Spektroskopie nachgewiesen werden.



**Abbildung 15: 2D *in vivo* NMR-Spektren einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur nach Zugabe von Isatin**

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Biotransformation des Dioxindols. Die dargestellten Spektren zeigen Ausschnitte der Aromatenregion **A**: 2 h, **B**: 48 h und **C**: 96 h nach Zugabe des Substrates. Die Messungen wurden an einem Bruker AVANCE 800-Spektrometer durchgeführt. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: D 4, D 5, D 6 und D 7 bezeichnen die Signale des Dioxindols; DG 4, DG 5, DG 6 und DG 7 bezeichnen die Signale des gebildeten Dioxindol- $\beta$ -D-glucopyranosids (vergleiche Abbildung 10).



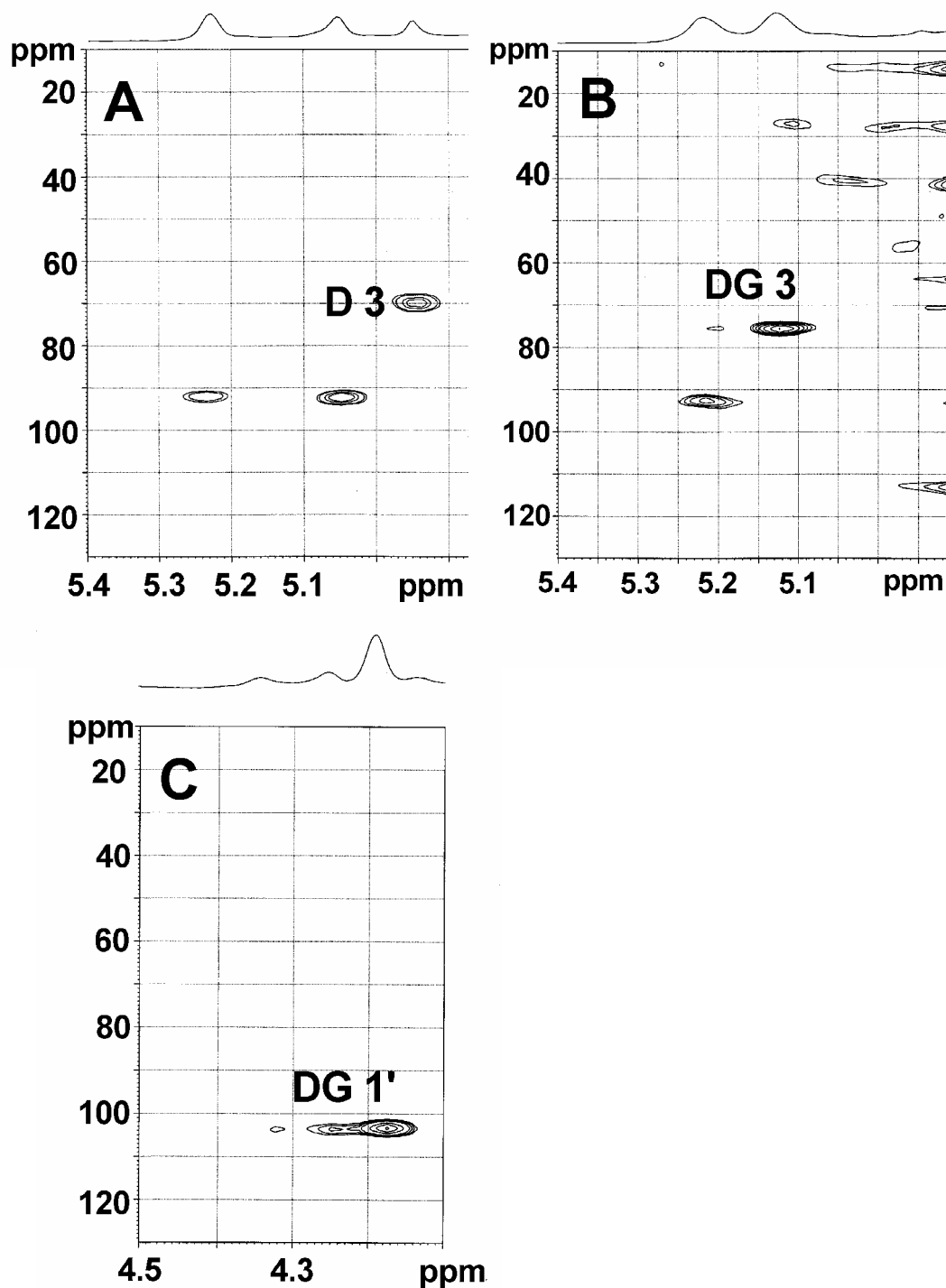


Abbildung 16: 2D *in vivo* NMR-Spektren einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur nach Zugabe von Isatin

Ausschnitte des Bereiches 5.5 - 4.0 ppm der Spektren **A**: 2 h, **B**: 72 h und **C**: 96 h nach Zugabe von Isatin zu einer *R. serpentina*-Zellkultur. Die Spektren wurden an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer aufgenommen. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: D 3 bezeichnet das Signal des Kohlenstoffs 3 des Dioxindols. DG 3 und DG 1' die entsprechenden Signale des Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosids (vergleiche Abbildung 10).

## 2 Aufklärung von Sequenzen des Ajmalin-Biosyntheseweges

Nachdem die Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie bei einer Feldstärke von 18.8 Tesla erfolgreich bei der Biotransformation der beiden Indol-Derivate Isatin und Isatin-3-oxim angewandt werden konnte, war es nun von Interesse, die Technik der *in vivo* NMR-Spektroskopie erstmals auf die Ajmalin-Biosyntheseforschung auszuweiten. Es sollte versucht werden, durch Fütterung geeigneter Intermediate des Ajmalin-Biosyntheseweges Rückschlüsse auf deren Metabolisierung zu ziehen.

### 2.1 Metabolismus von Vellosimol und Vellosimin

Als erstes sollte einer der Seitenwege der Ajmalin-Biosynthese untersucht werden (siehe I.3). Es war angenommen worden, daß Vellosimin, das durch Epimerisierung des Epi-Vellosimins entsteht, durch Reduktion und Hydroxylierung in Sarpagin übergeht (siehe Abbildung 17).

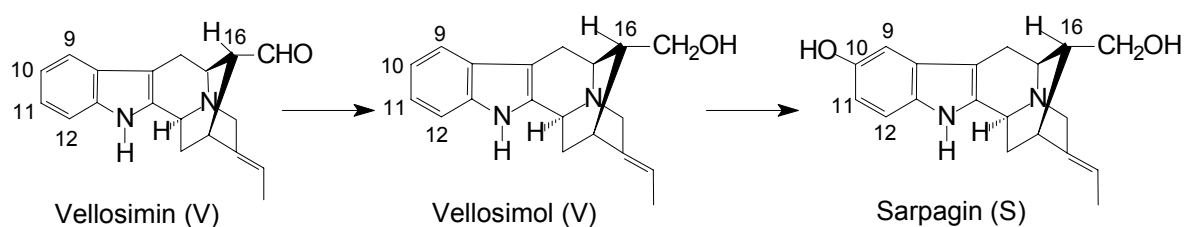


Abbildung 17: Biosynthesesequenz eines Seitenweges der Ajmalin-Biosynthese von Vellosimin über Vellosimol zu Sarpagin

### 2.1.1 Biotransformationsversuche mit Vellostimol

Als Vorversuch diente die Verfütterung von Vellostimol, das durch die in II.4 beschriebene Reduktion aus Vellostimin hergestellt wurde, um zunächst einen Reaktionsschritt des Seitenweges zu untersuchen.

Da von den Ausgangsalkaloiden nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen, wurde versucht, die Biotransformation in einem sehr kleinen Maßstab durchzuführen. Dazu wurden 0.5 mg Vellostimol, gelöst in 100 µl 30%igem EtOH, zu ca. 1 ml einer vier Tage alten *T30*-Zellsuspensionskultur gegeben, die kurz vorher in ein steriles Schnappdeckelglaschen überführt wurde. Analog wurde mit einer Kontrollprobe ohne Zusatz von Vellostimol verfahren.

Ca. 48 h nach Zugabe des Substrates wurde die Hälfte der Probe mittels HPLC untersucht. Die Zellen wurden vom Medium durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g) getrennt, das Medium wurde für weitere 10 min zentrifugiert, 1:1 mit MeOH verdünnt und dann mit Hilfe der HPLC analysiert (Bedingungen siehe II.5.2.2).

Das Zellgewebe wurde mit MeOH im Ultraschallbad für ca. 20 min aufgeschlossen, der Extrakt nach einer 10 minütigen Zentrifugation (10000 x g) 1:1 mit MeOH verdünnt und mit Hilfe der HPLC untersucht. Im Medium ist mit einer Retentionszeit von ~ 7.1 min die Ausgangssubstanz zu detektieren. Im Zellextrakt ist neben Vellostimol eine weitere Substanz, die in der Kontrollprobe nicht vorhanden ist, mit einer Retentionszeit von ~ 3.8 min zu sehen.

Fünf Tage nach der Vellostimol-Zugabe wurde der Rest der gefütterten Zellkultur aufgearbeitet und analysiert. Im Zellextrakt ist neben Vellostimol erneut das Signal bei ~ 3.8 min zu sehen. Durch Coinjektion von authentischem Sarpagin konnte diese Substanz als Sarpagin identifiziert werden.

### 2.1.2 Aufnahme eines *in vivo* NMR-Spektrums nach Zugabe von Vellosimol zu einer Zellkultur von *R. serpentina*

Es sollte nun versucht werden, ob Vellosimol und Sarpagin mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in den Zellen nachgewiesen werden können. Dafür wurden 2 mg Vellosimol in 400 µl 30 %igem EtOH gelöst und zu 2.5 ml einer fünf Tage alten Zellsuspensionskultur von *R. serpentina* (T30) gegeben, die kurz vorher in ein autoklaviertes Schnappdeckelgläschen überführt wurde. Da die HPLC-Ergebnisse zeigen (siehe III.2.1.1), daß beide Alkaloide vier bis fünf Tage nach Fütterung in den Zellen vorhanden sind, wurden die Zellen fünf Tage nach der Zugabe mit Hilfe eines autoklavierten Spatels in ein NMR-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit dem Pulsprogramm "invietgpsi" an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer am CERM (Florenz, Italien) vermessen. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Parameter verwendet.

**Tabelle 3: NMR-Parameter bei Aufnahme des *in vivo* Spektrums einer *R. serpentina*-Zellkultur fünf Tage nach Zugabe von Vellosimol**

| CPD                     | GARP      |
|-------------------------|-----------|
| Linear Prediction in f1 | 320       |
| Scans                   | 80        |
| Dummy scans             | 32        |
| Acquisition time        | 0.05125 s |
| Relaxation delay        | 2 s       |
| Gradient ratio          | 80:20.1   |
| Recycle time            | 2.05125 s |

Das erhaltene Spektrum (siehe Abbildung 18) zeigt im Aromatenbereich sieben Signale, von denen vier dem Vellosimol bei 7.10/121 (V 10), 7.17/123 (V 11), 7.42/112 (V 12) und 7.52/119 ppm (V 9) und drei dem Sarpagin bei 6.78/112 (S 11), 6.92/103 (S 9) und 7.27/123 ppm (S 12) zuzuordnen sind. Die drei Crosspeaks sind charakteristisch für Sarpagin, da es durch die Hydroxylierung am Kohlenstoff 10 zu einer Hochfeldverschiebung der weiteren aromatischen Signale kommt, besonders denen der benachbarten Kohlenstoffe 9 und 11 (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Die gleichen

chemischen Verschiebungen zeigen die in  $D_2O$  vermessen Referenzsubstanzen, wodurch die Zuordnung bestätigt werden konnte.

Im Anschluß an die *in vivo* Messungen wurden die vermessenen Zellen mit MeOH aufgeschlossen und der methanolische Extrakt massenspektrometrisch und mit Hilfe der HPLC analysiert (Bedingungen siehe II.5.2.2). Das Chromatogramm des Totalionenstroms zeigt, daß im Massenspektrometer aus der Probe zwei unterschiedliche Substanzen verdampfen. Die beiden erhaltenen Spektren konnten aufgrund von vorhandenen Spektren der Reinsubstanzen eindeutig Vellosimol und Sarpagin zugeordnet werden. Das HPLC-Chromatogramm zeigt Signale bei  $\sim 3.8$  und  $\sim 7.1$  min, was den Retentionszeiten von Sarpagin und Vellosimol entspricht und mittels Coinjektion nochmals überprüft wurde.

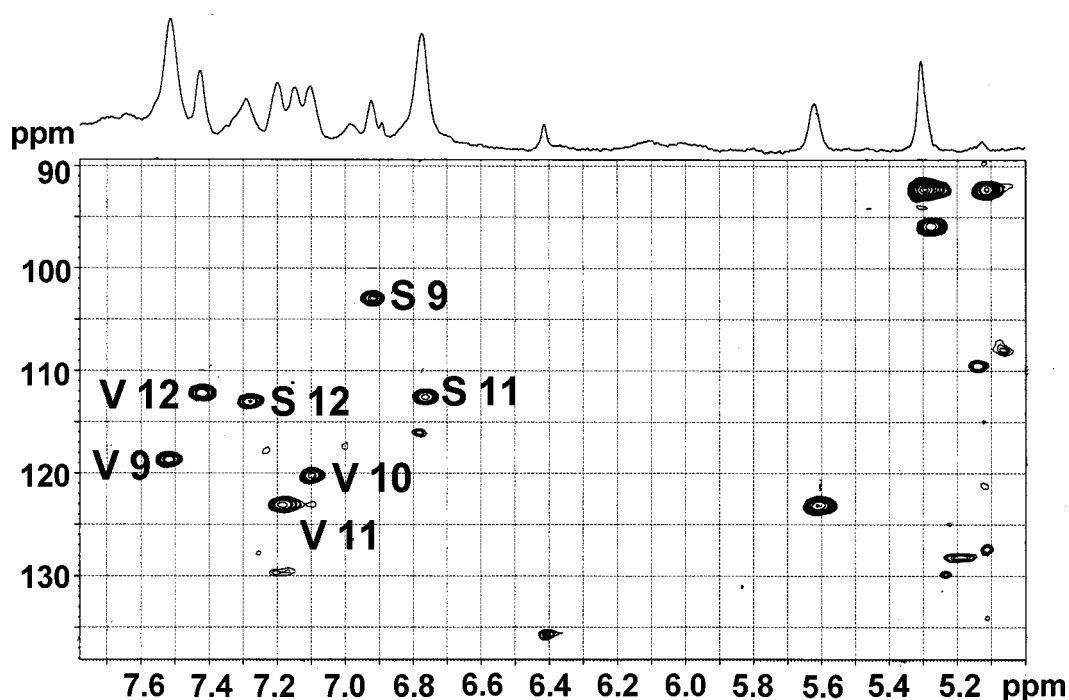


Abbildung 18: *In vivo* NMR-Spektrum einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur fünf Tage (120 h) nach Zugabe von Vellosimol

Das Spektrum wurde an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer aufgenommen. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: V 9, V 10, V 11 und V 12 bezeichnen die entsprechend nummerierten Kohlenstoffe des Vellosimols (= 10-Deoxysarpagin); S 9, S 11 und S 12 die des Sarpagins (siehe Abbildung 17).

### 2.1.3 Biotransformationsversuche mit Vellosimin

Im nächsten Schritt wurden Biotransformationsversuche mit Vellosimin in einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur durchgeführt. Dafür wurden 2.5 mg Vellosimin (isoliert aus Wurzelkulturen, siehe II.8), gelöst in 750 µl 50 %igem MeOH, zu 10 ml einer vier Tage alten Zellsuspensionskultur gegeben, die einen Tag zuvor in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt wurde. Nach 1, 48 und 120 h wurden Proben entnommen, wie unter II.7 und III.2.1 beschrieben aufgearbeitet und anschließend HPLC-analytisch (Bedingungen siehe II.5.2.2) untersucht. Analog wurde mit einem Kolben von Pflanzenzellen ohne Vellosimin Zugabe verfahren. Die Chromatogramme zeigen die Umsetzung von Vellosimin über Vellosimol zu Sarpagin. In der Probe des Nährmediums, die 1 h nach Zugabe des Substrates entnommen wurde, sind Signale des Substrates bei ~ 10.6 und ~ 11.9 min nachweisbar. Vellosimin erscheint als Doppelpeak, was möglicherweise auf die Epimerisierung der Substanz zurückzuführen ist.

Vellosimin wird in kurzer Zeit zu Vellosimol reduziert. Im Chromatogramm der zweiten Probe des Mediums (48 h nach Zugabe) ist nur noch Vellosimol zu detektieren. Da Vellosimin nicht in den Zellextrakten nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß dieses durch zellwandgebundene Enzyme reduziert wird und erst Vellosimol von den Pflanzenzellen aufgenommen wird. Im Zellextrakt ist Vellosimol mit einer Rt von ~ 7.1 min zu erkennen. Die Intensität dieses Peaks nimmt in den späteren Proben ab, während ein neues Signal mit einer Rt von ~ 3.8 min für das Sarpagin erscheint. Die Zuordnungen der Substanzen wurde nochmals mit Coinjektion der reinen Alkaloide überprüft.

### 2.1.4 Beobachtung des Metabolismus von Vellosimin in einer Zellkultur von *R. serpentina* mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie

Zur Beobachtung der Umsetzung des Vellosimins *in vivo*, wurden ca. 3 mg Vellosimin in einer Mischung von 300 µl D<sub>2</sub>O und 200 µl MeOH-d<sub>4</sub> gelöst und zu einer fünf Tage alten Zellkultur von *Rauvolfia serpentina* (T30) gegeben, die einige Tage vorher in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt wurde, so daß eine Startkonzentration von ca. 1 mM erreicht wurde. Die Proben wurden

1, 48 und 96 h nach Substratzugabe entnommen und mit einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer (vgl. II.6.2) am CERM (Florenz, Italien) vermessen. Jede der Messungen wurde mit dem Pulsprogramm "invietgpsi" und 8 Scans aufgenommen. Die weiteren Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

**Tabelle 4: NMR-Parameter der *in vivo* Verfolgung des Vellosimin-Metabolismus**

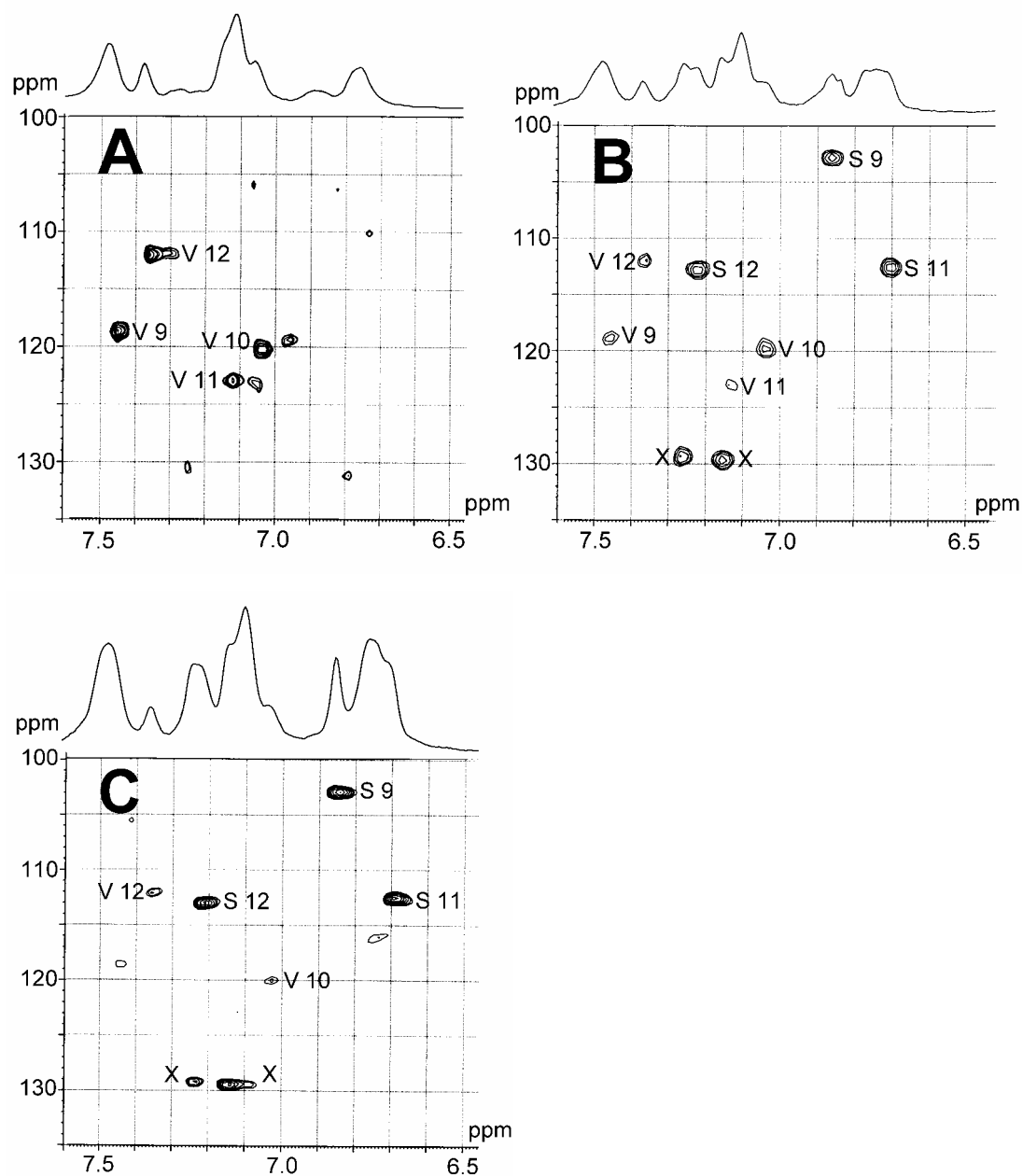
| CPD                     | GARP      |
|-------------------------|-----------|
| Linear Prediction in f1 | 256       |
| Dummy scans             | 32        |
| Acquisition time        | 0.03415 s |
| Relaxation delay        | 2 s       |
| Gradient ratio          | 80:20.1   |
| Recycle time            | 2.03415 s |

Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 19 dargestellt. In Abbildung 19A sind vier Signale des Vellosimin bzw. Vellosimol bei 7.05/120 (V 10), 7.12/123 (V 11), 7.35/112 (V 12) und 7.45/119 ppm (V 9) zu erkennen. Die Intensität der Signale nimmt in den darauffolgenden Spektren (Abbildung 19B und C) ab, wogegen drei neue Signale bei 6.77/112 (S 11), 6.85/103 (S 9) und 7.22/113 ppm (S 12) erscheinen. Diese können Sarpagin zugeordnet werden (vgl. III.2.1.2).

Aus den HPLC-Experimenten war bekannt, daß die Umsetzung des Vellosimins zu Vellosimol sehr schnell von der Zellkultur katalysiert wird. Zudem sind die chemischen Verschiebungen der beiden Substanzen im Aromatenbereich als identisch anzunehmen; was durch Vermessung der Reinsubstanzen bestätigt wurde. Deshalb wurde versucht diese Umsetzung mit der Protonenspektroskopie durch die Abnahme des Aldehydsignals bei 9.4 ppm und durch das Erscheinen der C(OH)-H<sub>2</sub>17 Signale zu verfolgen. Die Abnahme des Aldehydsignals ist erkennbar, jedoch ist die Auflösung dieses Peaks nicht sehr gut. Die Signale der neu entstanden C(OH)-H<sub>2</sub>-Gruppierung konnte nicht detektiert werden, da dieser Bereich sehr stark durch Signale der exogenen und endogenen Zucker und den Aminosäuren überlagert ist.

Als weiteren Beweis für die Umsetzung wurden die vermessenen Zellen mit MeOH im Ultraschallbad extrahiert und mittels HPLC untersucht (Bedingungen siehe II.5.2.2). Die HPLC-Läufe bestätigten die Umsetzung von Vellosimin zu Vellosimol.





**Abbildung 19: 2D *in vivo* NMR-Spektren einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur nach Fütterung von Vellosimin**

Die Spektren wurden mit der 2D invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an einem Bruker AVANCE 800 Spektrometer aufgezeichnet und zeigen die aromatische Region **A**: 1 h, **B**: 48 h und **C**: 96 h nach Zugabe von Vellosimin. Es wurden folgende Abkürzungen benutzt: V 9, V 10, V 11 und V 12 bezeichnen die Signale des Vellosimols (=10-Deoxysarpagin) bzw. des Vellosimins; S 9, S 11 und S 12 die Signale des Sarpagins (vergleiche Abbildung 17).

### 2.1.5 Anlegen von D<sub>2</sub>O-Kulturen

Um eine effektivere Wasserunterdrückung zu erreichen und die störenden OH-Signale im Bereich von 5 - 6 ppm zu eliminieren, wurde versucht, die Pflanzenzellen in D<sub>2</sub>O-haltigem Medium zu kultivieren. Zudem wurde erhofft, daß durch den Einbau von Deuterium in endogene Zellinhaltsstoffe, die Anzahl einiger C-H-Signale im Bereich von 0 bis 5.5 ppm reduziert wird und dadurch die zugesetzten Substanzen detektiert werden können.

Dafür wurde LS-Nährmedium gefriergetrocknet, anschließend in D<sub>2</sub>O rückgelöst und autoklaviert. Erste Kultivierungsversuche ergaben, daß Zellen in D<sub>2</sub>O-haltigen Medium schlecht wachsen; das Kultivieren von Zellkulturen in diesem Medium für mehrere Tage war nicht möglich.

Deshalb wurde versucht, die Zellen kurz vor Fütterung von dem üblichen LS-Nährmedium zu trennen und in ein neues D<sub>2</sub>O-haltiges Medium zu überführen. Fütterungsversuche mit Isatin und Vellosimin und eine anschließende HPLC-Analyse (durchgeführt nach III.1.2.1 und III.2.1.1) ergaben, daß die Substrate auch von diesen Kulturen in der gewohnten Weise umgesetzt wurden.

Versucht wurde im nächsten Schritt, diese Kulturen auch NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Die erhaltenen Protonenspektren weisen im Vergleich zu den Spektren einer Zellkultur, die in einem gewöhnlichen LS-Medium kultiviert wurde, eine bessere Unterdrückung des Wassersignals auf, zudem sind die Signale der endogenen OH-Gruppen durch den Austausch mit Deuterium nicht mehr sichtbar. Der Bereich zwischen 0 und 5 ppm zeigt jedoch keine weitere Reduzierung der Signale. Auch in den HSQC-Spektren ist keine Abnahme der C-H Kopplungen erkennbar. Durch die zu kurze Kultivierungsdauer im D<sub>2</sub>O-haltigen Medium wird die Einbaurate von Deuterium in Primärstoffwechselprodukte sehr gering gewesen sein. Des Weiteren ist zu bedenken, daß die meisten Hintergrundsignale in den *in vivo* NMR-Spektren von Zuckern stammen. Zellkulturen sind jedoch auf Kohlenhydratgabe angewiesen, da sie keine Photosynthese betreiben. Ein Einbau von Deuterium in Zucker (abgesehen von den OH-Gruppen) ist deswegen nicht zu erwarten.

## 2.2 Metabolismus von Vinorin und Vomilenin

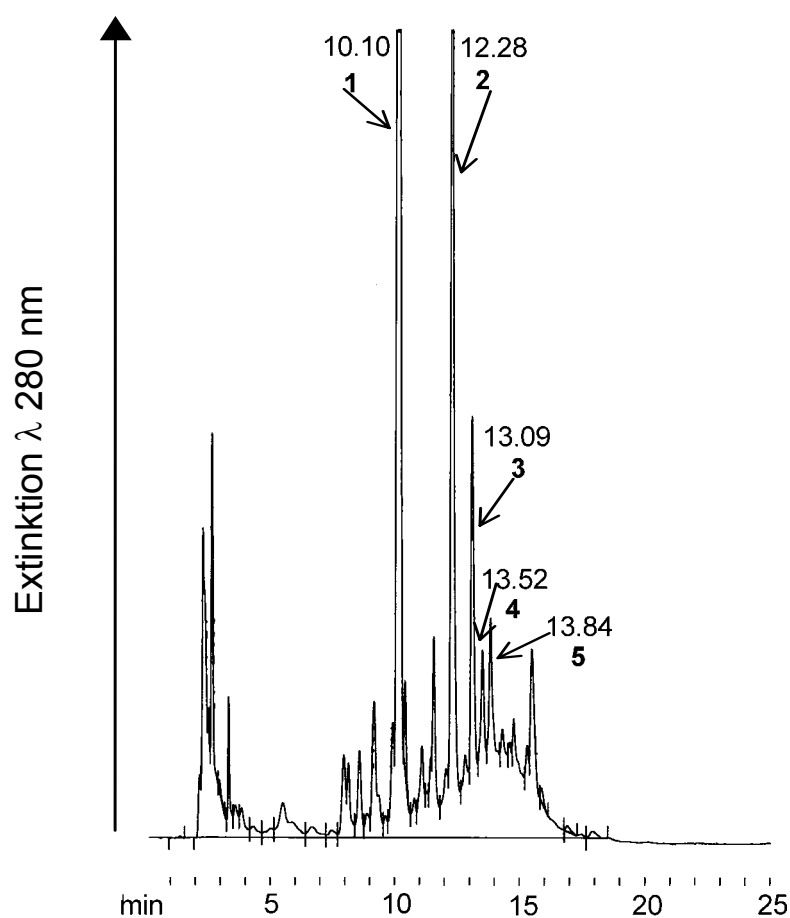
Nach dem erfolgreichen Verfolgen der Metabolisierung des Vellosimins bzw. Vellosimols mit der *in vivo* NMR-Spektroskopie sollte diese Methode auf ein zweites Beispiel in der Biosyntheseforschung des Ajmalin-Biosyntheseweges ausgeweitet werden.

Im folgenden sollte die Umsetzung von Vinorin und Vomilenin in Zellkulturen von *R. serpentina* zuerst *invasiv* untersucht werden, d.h. durch Extraktion der Inhaltsstoffe und nachfolgenden HPLC- und massenspektrometrischen Untersuchungen. Anschließend sollte der Metabolismus *nicht-invasiv* mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Entsprechend dem bisher bekannten Biosyntheseweg wird Vinorin zu Vomilenin und dieses in mehreren Schritten zu Ajmalin umgesetzt. Jedoch wurde bei Zellsuspensionskulturen von *R. serpentina* entdeckt, daß in diesen häufig ein Nebenweg der Biosynthese abläuft und aus Vomilenin durch Glucosylierung Raucaffricin gebildet wird, welches die Kultur dann akkumuliert (siehe I.3).

### 2.2.1 Biotransformationsversuche mit Vinorin

Um die Metabolisierung von Vinorin zu beobachten, wurden 13 mg Vinorin (isoliert aus Wurzelkulturen, siehe II.8) in 1 ml 50 %igem MeOH gelöst und zu 20 ml einer 5 Tage alten Zellkultur von *Rauvolfia serpentina* (T30) gegeben. Die Zellkultur, die unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen in einem 300 ml Erlenmeyerkolben kultiviert wurde, wurde einen Tag vor Fütterung in einen keimfreien 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Es wurde jeweils 1 ml Zellsuspension 2, 5, 24, 48 und 120 h nach Zugabe des Substrates entnommen (vgl. II.7) und das Zellgewebe von dem Medium durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 10000 x g). Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Nährmedium 1:10 mit MeOH verdünnt und mit Hilfe der HPLC untersucht (Bedingungen siehe II.5.2.3, Gradient I). Die Zellen wurden 20 min mit MeOH im Ultraschallbad aufgeschlossen, die erhaltene Suspension anschließend 10 min zentrifugiert und der methanolische Überstand nach Verdünnen mit MeOH (1:1) wie das Nährmedium mittels HPLC untersucht. Analog wurde mit einem Kontrollkolben ohne Zusatz von

Vinorin verfahren. Das in Abbildung 20 dargestellte HPLC-Chromatogramm des Extraktes der Probe, die 48 h nach Zugabe des Substrates entnommen wurde, zeigt die Bildung von 5 neuen Produkten mit Retentionszeiten von 10.10, 12.28, 13.09, 13.52 und 13.84 min. Im Chromatogramm der 120 h nach Substratzugabe entnommenen Probe sind nur noch die Signale der Produkte **1** und **3** zu sehen. Das Signal des Produktes **1** ( $R_t \sim 10.1$  min) hat an Intensität deutlich zugenommen und kann als Folgeprodukt der Verbindungen **3**, **4** und **5** vermutet werden.



**Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur 48 h nach Zugabe von Vinorin**

Zu den Chromatographiebedingungen siehe II.5.2.3 (Gradient I).

Da Raucaffricin als ein Metabolisierungsprodukt vermutet wurde, sollten die Extrakte auf diese Verbindung getestet werden. Aus Vorversuchen war bekannt, daß Raucaffricin nicht mittels der sonst eingesetzten  $\beta$ -Glucosidase gespalten werden kann [136]. Aus diesem Grund wurden die Extrakte mit einer Enzymfraktion, die durch eine Ammoniumsulfat-Fällung einer sechs Tage alten *RxR (Mainz)*-Kultur erhalten wurde, inkubiert. Dafür wurden 100  $\mu$ l des Extraktes der Probe, die 48 h nach Substratzugabe entnommen wurde, mit 100  $\mu$ l 1 M Citratpuffers (pH 5) und 100  $\mu$ l Enzymfraktion versehen und im Thermomixer bei 30 °C und 900 U/min inkubiert. Analog wurde mit 100  $\mu$ l einer methanolischen Raucaffricinlösung verfahren. Zudem wurde ein Ansatz bestehend aus Citratpuffer und Enzymlösung inkubiert. Die Ansätze wurden 30 min und 3.5 h nach Inkubationsbeginn mittels HPLC untersucht. Dafür wurden 100  $\mu$ l jeder Probe entnommen, mit 200  $\mu$ l MeOH versetzt, 10 min zentrifugiert und anschließend mit der HPLC untersucht (Bedingungen siehe II.5.2.3, Gradient I). Die erhaltenen Chromatogramme des ersten Inkubationsansatzes zeigen, daß das Signal des Produktes **2** bei ~ 12.3 min an Intensität stark abgenommen hat und ein neues Signal mit einer Retentionszeit von ~ 14.4 min nachweisbar ist. Dieses Ergebnis zeigte auch die Probe, die nur Raucaffricin enthielt. Durch Coinjektionen mit Referenzalkaloiden konnte die neu entstandene Substanz mit einer Retentionszeit von ~ 14.4 min Vomilenin zugeordnet und somit Produkt **2** ( $R_t$  ~ 12.3 min) als Raucaffricin identifiziert werden.

Um die weiteren Produkte der Metabolisierung von Vinorin zu identifizieren, wurden die Extrakte der Proben, die 24, 48 und 120 h nach Substratzugabe entnommen wurden, dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Entwicklung erfolgte mit FM 4 (siehe II.5.1), die Detektion unter UV-Licht bei 254 nm und mit Hilfe der Sprühreagenzien SR 1 und SR 2 (siehe II.5.1). Es konnten neben Raucaffricin ( $R_f$ -Wert 0.48, Rotfärbung nach Besprühen mit SR 2) noch zwei weitere Substanzen detektiert werden, deren Eigenschaften in Tabelle 5 aufgelistet sind.

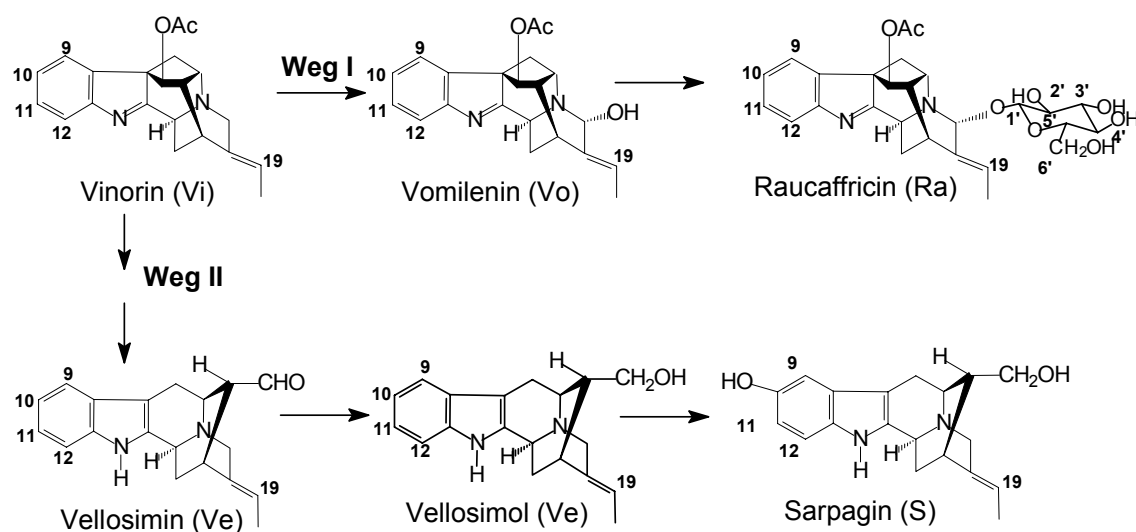
**Tabelle 5: Eigenschaften der Produkte 1 und 3 der Vinorin-Metabolisierung in Zellen von *R. serpentina*.**

|                                  | Substanz 1                    | Substanz 2                    |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Färbung nach SR 1 (siehe II.5.1) | Violett                       | Grau                          |
| Rf-Wert (FM 4)                   | 0.61                          | 0.71                          |
| Rt (siehe II.5.2.3, Gradient I)  | ~ 10.1 min = Produkt <b>1</b> | ~ 13.1 min = Produkt <b>3</b> |

Die violette Färbung von Substanz 1 nach Besprühen mit SR 1 (siehe II.5.1) ist spezifisch für ein hydroxyliertes Alkaloid der Sarpagan-Klasse. Die Graufärbung der zweiten Substanz ist charakteristisch für ein unsubstituiertes Sarpagan-Alkaloid. Die DC wurde nochmals angefertigt und die beiden Substanzflecke ausgekratzt, die Substanzen vom Kieselgel eluiert und massenspektrometrisch untersucht. Das Spektrum des ersten Substanzflecks (Rf 0.61) entspricht einem Spektrum von Sarpagin mit einem Massenpeak von 310 m/z. Das Massenspektrum des zweiten Substanzflecks (Rf 0.71) zeigt einen Massenpeak bei 294 m/z, mit einem Vergleich vorhandener MS-Spektren verschiedener Alkaloide kann das Produkt als Vellostimol identifiziert werden. Die Probe war leicht mit Acetyl-norajmalin verunreinigt. Jedoch konnte Acetyl-norajmalin auch in der Kontrollprobe (Zellextrakt von ungenährten Zellen) nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von Coinjektions-Experimenten konnten nun die Signale mit den Retentionszeiten von ~ 10.1 min und ~ 13.1 min den Alkaloiden Sarpagin (Produkt **1**) und Vellostimol (Produkt **3**) zugeordnet werden, die Produkte **4** und **5** konnten auf diese Weise als Vellostimin identifiziert werden, welches als Doppelsignal im Chromatogramm erscheint (vgl. III.2.1)

Die HPLC Analysen wurden mit einem weiteren Gradienten (Gradient II, siehe II.5.2.3) wiederholt, um die Überlappung zweier Peaks auszuschließen. Das erhaltene Ergebnis stimmte mit dem oben beschriebenen überein. Abbildung 21 faßt die ermittelten Hauptwege für die Metabolisierung von Vinorin in *R. serpentina* (T30)-Zellsuspensionskulturen zusammen.



**Abbildung 21: Biotransformationsprodukte des Vinorins bei Applikation an einer *R. serpentina* (T 30)-Zellsuspensionskultur**

Die Bildung von Vomilenin konnte unter diesen Bedingungen mit Hilfe der HPLC nicht nachgewiesen werden, womöglich wird dieses direkt nach seiner Bildung ohne Akkumulation weiter zu Raucaffricin umgesetzt.

### 2.2.2 Biotransformationsversuche mit Vomilenin

Die HPLC-Ergebnisse der Fütterung von Vinorin zeigen, daß dieses durch die Zellkultur hauptsächlich über die in Abbildung 21 dargestellten Nebenwege metabolisiert wird. Es war nun interessant zu untersuchen, in welchem Ausmaß Vomilenin von einer Zellkultur umgesetzt wird. Dafür wurden 2 mg Vomilenin, isoliert aus Hairy-Root-Kulturen (siehe II.8.2), in 200 µl 50 %igem MeOH gelöst und zu ca. 10 ml einer *R. serpentina* (T30)-Zellkultur gegeben (siehe III.2.2.1). Analog wurde mit einem Kontrollkolben ohne Zusatz von Vomilenin verfahren. Es wurde jeweils 1 ml Zellsuspension 3, 24, 72 und 168 h nach Substratzugabe entnommen und analog III.2.2 aufgearbeitet und unverdünnt analysiert. Neben dem Ausgangsprodukt mit einer Retentionszeit von ~ 14.4 min ist schon in der ersten Probe (entnommenen 3 h nach Substratzugabe) ein weiteres Produkt mit einer Retentionszeit von ~ 12.3 min

zu detektieren, das durch die in Kapitel III.2.2.1 beschriebenen Ergebnisse als Raucaffricin identifiziert werden konnte. Dieses Ergebnis wurde nochmals mit einer gleichzeitigen Injektion der Probe mit authentischem Raucaffricin mit Hilfe der HPLC überprüft und bestätigt. Weitere Produkte konnten auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

### **2.2.3 Testen einzelner Zelllinien von *R. serpentina* auf die Umsetzung der Alkaloide Vinorin und Vomilenin**

Da bekannt ist, daß Zellkulturen mit der Zeit ihr Inhaltsstoffspektrum ändern [18] und somit auch unterschiedliche Enzyme exprimieren, sollten folgende Zelllinien von *R. serpentina* auf die Metabolisierung von Vinorin und Vomilenin getestet werden:

- *Rauvolfia serpentina*
- *Rauvolfia serpentina* (München)
- *Rauvolfia serpentina* (Mutter)
- *Rauvolfia serpentina* (T30)
- *Rauvolfia serpentina* × *Rhazya stricta* (Mainz)

Zu 10 ml fünf Tage alter Kulturen der oben genannten Zelllinien, die einen Tag vor Fütterung in einen keimfreien 100 ml Erlenmeyerkolben überführt wurden, wurde jeweils 2.3 mg Vinorin bzw. Vomilenin, gelöst in 200 µl 50 %igem MeOH, gegeben. Zudem wurde von jeder Zelllinie ein Vergleichskolben ohne Substratzusatz kultiviert.

Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde mit einer sterilen Pipette aus den Kolben, der oben aufgeführten Kulturen, 90 min, 3, 24, 48 und 168 h nach Substratzugabe entnommen. Die Proben wurden entsprechend II.7 und III.2.2.1 aufgearbeitet und unverdünnt mittels HPLC analysiert (Bedingungen siehe II.5.2.3, Gradient I, II und III).

Die Chromatogramme der Extrakte der Kontrollkulturen von *Rauvolfia serpentina*, *Rauvolfia serpentina* (München), *Rauvolfia serpentina* (Mutter) zeigen ein sehr großes Raucaffricin-Signal (Rt ~ 12.3 min mit Gradient I). Die Metabolisierung von Vinorin und Vomilenin in diesen drei Zelllinien führte



---

ausschließlich zu Raucaffricin, was durch das Anwachsen dieses Signals beobachtet werden konnte. Per HPLC konnten auf diese Weise keine weiteren Produkte nachgewiesen werden.

Die Zelllinie *T30* und die Hybridkultur *RxR (Mainz)* zeigen in den Kontrollproben bei ~ 12.3 min nur einen sehr kleinen Peak, was auf eine geringe endogene Raucaffricin-Konzentration hindeutet. Die Hybridkultur *RxR (Mainz)* setzt Vinorin und Vomilenin wie die *T30*-Zelllinie über die beiden in Abbildung 1 dargestellten Nebenwege um (vergleiche III.2.2.1 und III.2.2.2.).

Da bei der Fütterung der Substrate Vinorin und Vomilenin Raucaffricin als eines der Hauptprodukte entsteht, waren diese beiden Kulturen den anderen vorzuziehen, da die Umsetzung aufgrund des sehr kleinen endogenen Raucaffricin-Signals einfacher zu beobachten war. Da die *RxR*-Kultur (*Mainz*) sich im Vergleich zur Zelllinie *T30* als wesentlich stabileres und unempfindlicheres System erwies, wurden die *in vivo* Experimente mit dieser Hybridkultur durchgeführt.

#### **2.2.4 Aufzeichnung der Biotransformation von Vomilenin und Vinorin mittels der invers korrelierten 2D NMR-Spektroskopie unter Anwendung der Cryogenic Probe Technologie**

Es hatte sich gezeigt, daß sich die Methode der invers korrelierten 2D NMR-Spektroskopie erfolgreich bei der Beobachtung von Biotransformationen anwenden läßt. Durch die leistungsstärkeren Hochfeld NMR-Spektrometer (bis zu 900 MHz) konnte auch die Empfindlichkeit dieser Methode drastisch erhöht werden. Im Zuge dieser Arbeit ergab sich die Möglichkeit eine weitere neue Technik anzuwenden. Ende der 90er Jahren kam es zu der Entwicklung der Cryogenic NMR Probe Technologie, die durch starkes Herunterkühlen des Preamplifiers auf ca. 70 K und der Spule auf 20 K, während sich die Probe bei Zimmertemperatur befindet, einen weiteren deutlichen Empfindlichkeitsgewinn erzielt. Die Spule, wie auch der Preamplifier, haben einen starken Einfluß auf das so genannte thermische Rauschen, welches durch die Bewegung freier Elektronen entsteht. Diese Elektronenbewegung ist vor allem abhängig von der Temperatur. Durch die starke Kühlung der Spule und des Preamplifiers wird die Elektronenbewegung und somit das thermische Rauschen reduziert, was zu einem Anstieg des S/N Ratio von einem Faktor 3 - 4 führt, verglichen mit einem konventionellen Probenkopf. Dies ist gleichbedeutend mit einer theoretischen Reduzierung der Meßzeiten um das 16-fache bzw. einer möglichen Konzentrationsminderung der Probe auf ein viertel (vgl. I.4) [113-115]. Die Bruker BioSpin AG (Fällanden, Schweiz) ermöglichte es, diese Technik an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, für die Verfolgung der Vinorin und Vomilenin Metabolisierung anzuwenden. Alle verwendeten Kulturen wurden bis zu dem Transport in die Schweiz unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Auch in Fällanden wurde versucht, die üblichen Kultivierungsbedingungen zu nutzen, was jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Ausstattung für die Kultivierung von Pflanzenzellkulturen schwierig war. Vor allem die Temperaturschwankungen waren mit  $\pm 5^\circ\text{C}$  deutlich größer als in Mainz.

Für die Messungen wurde das Pulsprogramm "invietgpsi" mit den in Tabelle 6 aufgeführten Parametern verwendet.

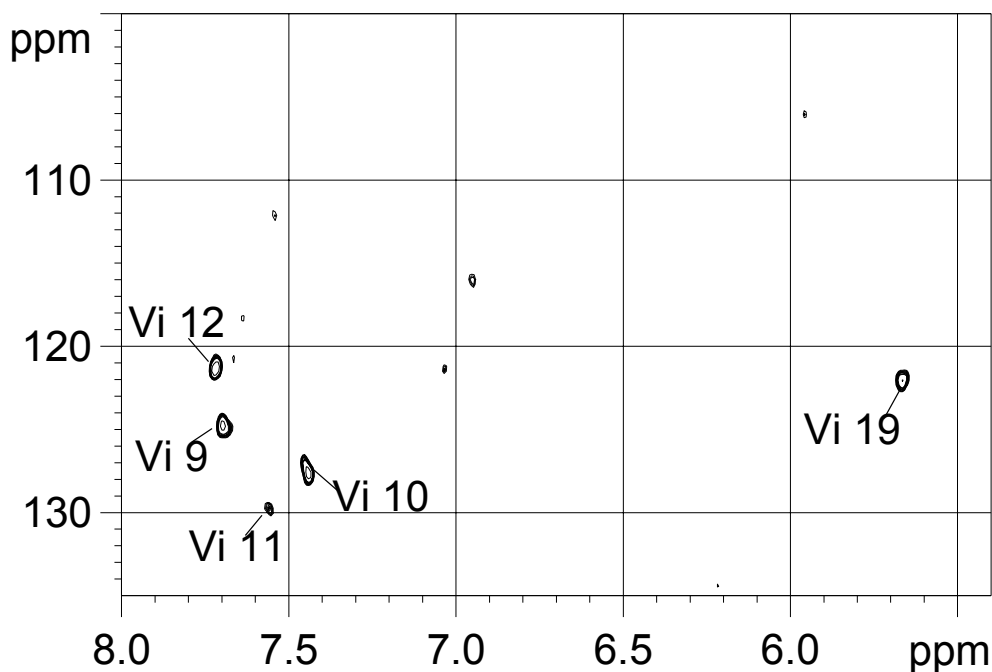
**Tabelle 6: NMR-Parameter der *in vivo* Verfolgung des Vinorin-Metabolismus**

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| Linear Prediction in f1 | 128         |
| Scans                   | 16-32       |
| Dummy scans             | 8           |
| Acquisition time        | 0.1705268 s |
| Relaxation delay        | 1 s         |
| Gradient ratio          | 80:20.1     |
| Recycle time            | 1.1705268 s |

#### **2.2.4.1 Beobachtung der Vinorin Umsetzung mit Hilfe der invers korrelierten 2D NMR-Spektroskopie unter Anwendung der Cryogenic Probe Technologie**

Da für die Messungen nur zwei Tage zur Verfügung standen, aber die Umsetzung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation untersucht werden mußte, wurden für die Verfolgung des Vinorin Stoffwechsels vier Fütterungsansätze vorbereitet. Es wurden an unterschiedlichen Tagen jeweils 6.5 mg Vinorin in MeOD-d<sub>4</sub> gelöst und zu ca. 15 ml einer vier Tage alten *RxR*-Kultur gegeben, so daß eine Startkonzentration von 1.8 mM erreicht wurde.

Das erste Spektrum zeigt *RxR* Zellen direkt nach der Zugabe von Vinorin (Vi). Das Alkaloid kann leicht an fünf charakteristischen Crosspeaks für die Signale Vi 9, Vi 10, Vi 11, Vi 12, Vi 19 in der Region zwischen 5.5 und 7.7 ppm bzw. 120 und 130 ppm identifiziert werden (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** *In vivo* NMR-Spektrum von Zellen einer *RxR*-Hybridkultur unmittelbar nach Zugabe von Vinorin

Das Spektrum wurde mit 16 Scans (Meßzeit 40 min) an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, aufgenommen. Die Abkürzungen Vi 9, Vi 10, Vi 11, Vi 12 und Vi 19 bezeichnen die C-H-Signale der entsprechend nummerierten Kohlenstoffatome des Vinorins (siehe Abbildung 21).

Am Ort der Messungen (Fällanden, Schweiz) wurde eine weitere Kultur gefüttert, aus welcher 7, 24 und 48 h nach Substratzugabe jeweils eine Probe entnommen und vermessen wurde. Schon im ersten Spektrum, dargestellt in Abbildung 23A, ist die beginnende Bildung eines Alkaloids der Sarpagan-Klasse zu erkennen. Mit einem Vergleich der Ergebnisse aus Kapitel III.2.1 sind die Crosspeaks bei 7.20/120 ppm (Ve 10), 7.22/124 ppm (Ve 11), 7.50/112 ppm (Ve 12) und 7.61/119 ppm (Ve 9) Vellosimin bzw. Vellosimol zuzuordnen. Zudem ist ein weiteres Signal für Ve 19 bei 5.70/123 ppm zu erkennen. Offensichtlich ist Vellosimin das erste Produkt, das dann zu Vellosimol reduziert wird. Die Signale von Vellosimin/Vellosimol sind zudem gut von denen des Präkursors separiert. Abbildung 23B zeigt die Intensitätszunahme der Signale des Vellosimins/Vellosimols. Die aromatischen Signale mit den chemischen Verschiebungen der Vorstufe (Vinorin) sind noch vorhanden, jedoch ist auch eine Verschiebung des Signals

19 zu beobachten, was auf eine Umsetzung von Vinorin zu Vomilenin bzw. Raucaffricin schließen läßt. Mit Hilfe der Spektren von Referenzalkaloiden konnte nachgewiesen werden, daß sich die Signale im Aromatenbereich von Vinorin, Vomilenin und Raucaffricin nicht unterscheiden; nur die Signale des Kohlenstoffs 19 variieren von Vinorin zu den beiden anderen Verbindungen. Das Signal 19 von Vomilenin und Raucaffricin unterscheidet sich in den Referenzspektren um ca. 4 ppm in der chemischen Verschiebung des  $^{13}\text{C}$ -Wertes. Das Signal bei 5.9/127 ppm muß entsprechend dem Referenzspektrum eher Raucaffricin zugeordnet werden, jedoch kommt es bei den *in vivo* Aufnahmen zu einer Verschlechterung der Auflösung und zu leichten Verschiebungen der ppm-Werte im Vergleich zur Aufnahme der Substanzen in wäßrigem Lösungsmittel. Deswegen ist eine eindeutige Zuordnung dieses Signals in diesem Falle schwierig. Die Zuordnung der chemischen Verschiebung des C-H-Signals 19 von Raucaffricin und Vomilenin wurde durch die Fütterung von Vomilenin zu einer *RxR*-Zellsuspensionskultur (siehe III.2.2.4.2) genauer untersucht. Da bei dem hier beschriebenen Fütterungsversuch Vinorin hauptsächlich über die Sarpagan-Alkaloide abgebaut wurde, waren weitere Zuordnungen für die Metabolisierung über den zweiten Weg aufgrund der niedrigen Konzentrationen der Intermediate schwierig. In Abbildung 23C ist die beginnende Sarpagin-Bildung zu sehen. Zwei schwache Signale bei 7.02/103 für S 9 und 7.40/113 ppm für S 12 sind nachweisbar. Durch die Hydroxylierung kommt es zu einer Hochfeldverschiebung der Signale (vgl. III.2.2.1).

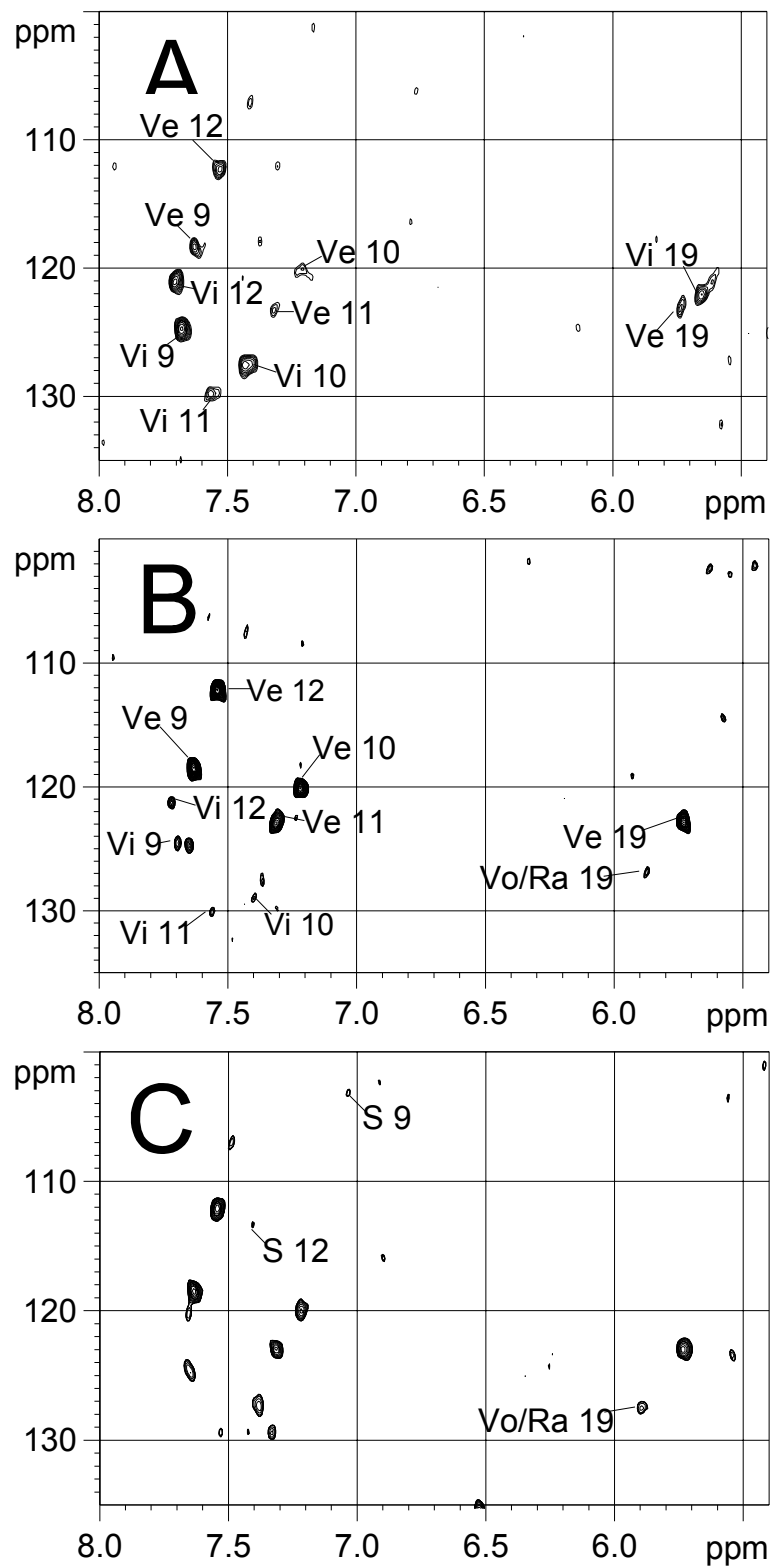
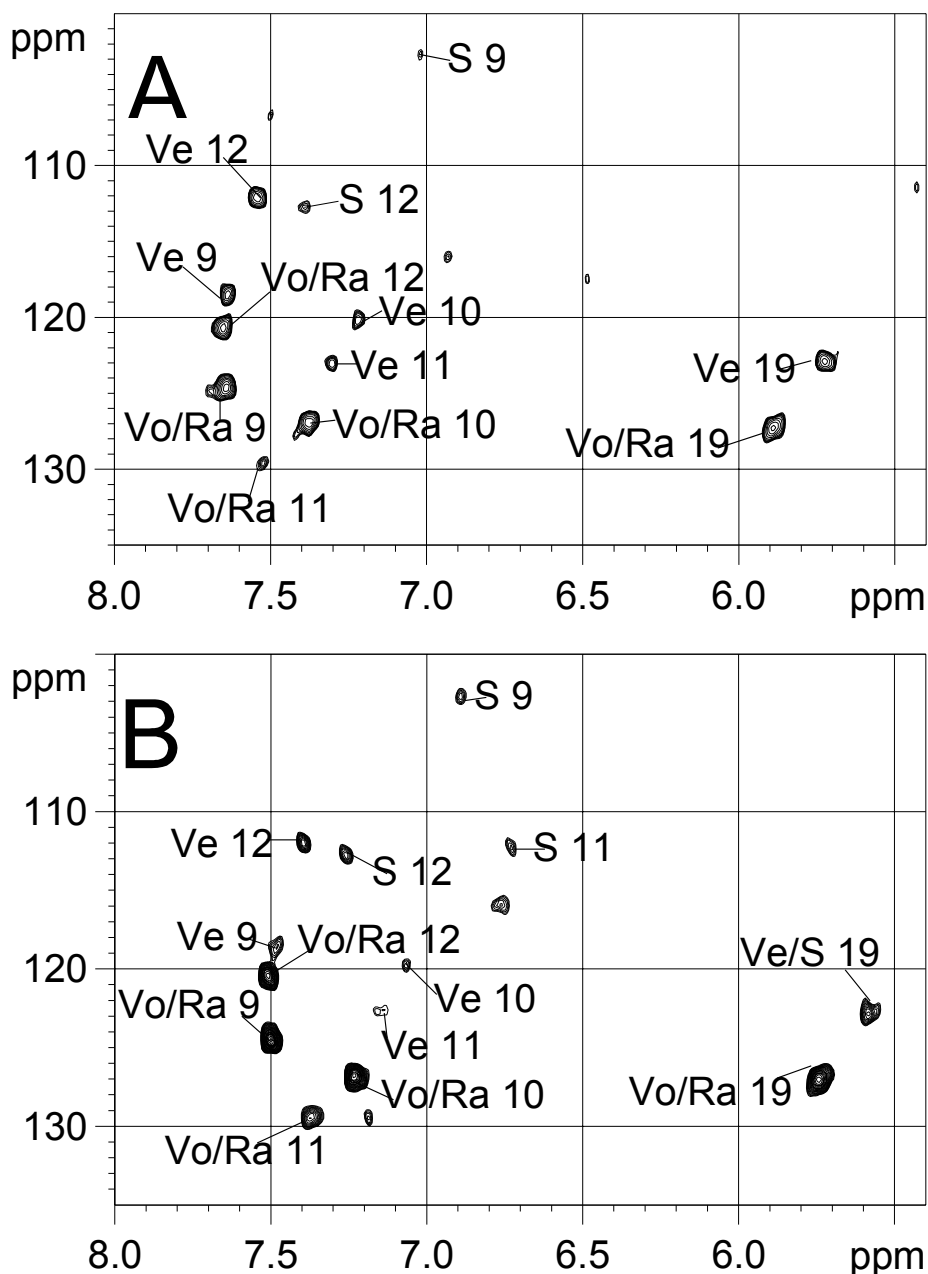


Abbildung 23: 2D *in vivo* NMR-Spektren der Zellen einer *RxR*-Hybridkultur 7, 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin

Die Messungen wurden **A**: 7 h, **B**: 24 h und **C**: 48 h nach Zugabe von Vinorin durchgeführt. Alle Spektren wurden mit 16 Scans (Meßzeit 40 min) an einem 500 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, aufgezeichnet. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: Vi 9, Vi 10, Vi 11, Vi 12 und Vi 19 bezeichnen die C-H-Signale des Vinorins. Ve 9, Ve 10, Ve 11, Ve 12 und Ve 19 bezeichnen die C-H-Signale des Vellosimins bzw. Vellosimols, die Signale S 9, S 11 und S 12 die aromatischen Signale des Sarpagins (vergleiche Abbildung 21).

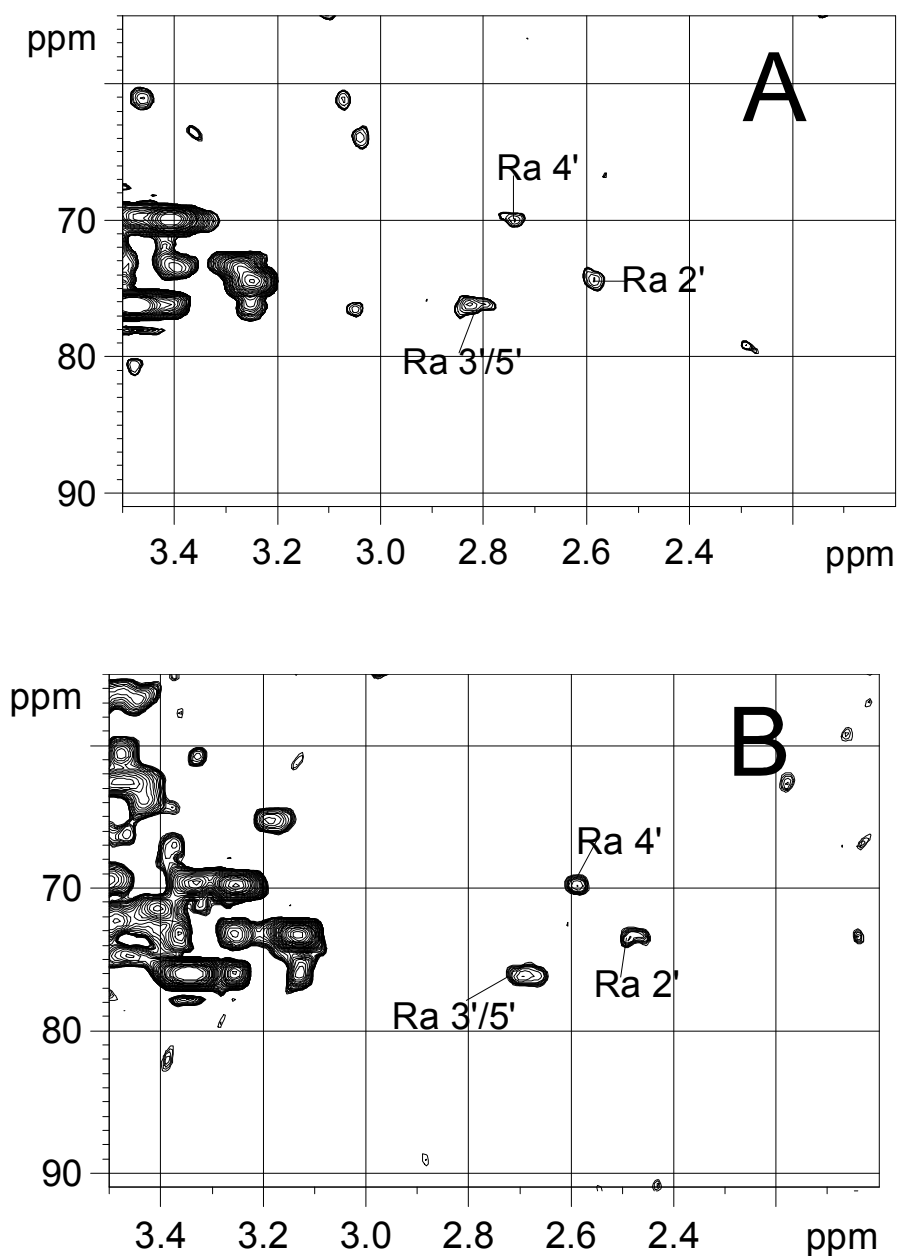
Aus der Zellsuspension des dritten Fütterungsansatzes, der in Mainz vorbereitet wurde, wurde 48 h und 96 h nach Applikation jeweils eine Probe entnommen (siehe II.6.3.1) und vermessen. In diesen Spektren ist zu sehen, daß Vinorin über beide Metabolisierungswege in etwa gleichem Maße abgebaut wird (vergleiche Abbildung 21). Auch hier ist die Umsetzung von Vinorin zu den Sarpagan-Alkaloiden zu erkennen. Im ersten Spektrum sind sowohl die spezifischen Signale für den Vellosimin-Typ, als auch die chemischen Verschiebungen für Sarpagin zu erkennen. Die Umsetzung von Vinorin zu Raucaffricin ist auf den ersten Blick schwerer zu verfolgen. Zum einen kann die Umsetzung durch die Verschiebung des Signals von C-H19 beobachtet werden, zum anderen kann sie aber auch über Signale im Aliphatenbereich verfolgt werden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Mit Hilfe des Referenzspektrums von Raucaffricin und eines Spektrums von ungefütterten Zellen können diese aliphatischen Signale den Kohlenstoffen und den dazugehörigen Protonen des Glucose-Teils des Raucaffricins zugeordnet werden.



**Abbildung 24: 2D *in vivo* NMR-Spektren der Zellen einer *RxR*-Hybridkultur 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin**

Die Spektren wurden **A**: 48 h und **B**: 96 h nach Zugabe von Vinorin an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe™ Probenkopf aufgenommen. Spektrum **A** wurde mit 16 Scans in 40 min erhalten, während Spektrum **B** mit 32 Scans in 80 min aufgezeichnet wurde. Zudem enthielt Probe **B** ca. 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , was zu einer leichten Verschiebung aller ppm-Werte führte. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: Vo/Ra 9, Vo/Ra 10, Vo/Ra 11, Vo/Ra 12 und Vo/Ra 19 bezeichnen die C-H-Signale des Vomilenins bzw. Raucaffricins. Die Signale Ve 9, Ve 10, Ve 11, Ve 12 und Ve 19 bezeichnen die C-H-Signale des Vellosimins bzw. Vellosimols und die Signale S 9, S 11, S 12 und S 19 die jeweiligen Signale des Sarpagins (vergleiche Abbildung 21).



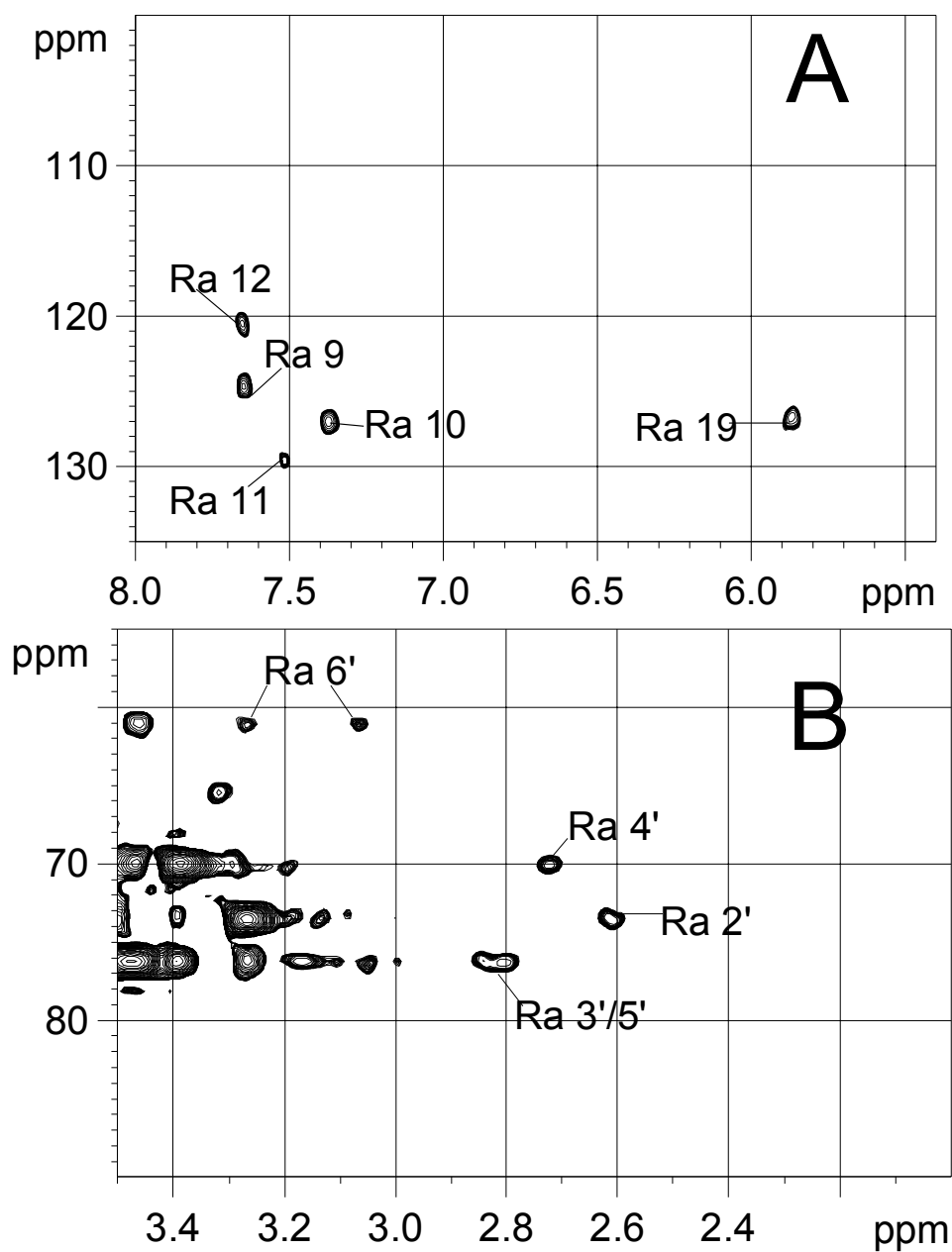


**Abbildung 25: 2D *in vivo* NMR-Spektren einer *RxR*-Hybridkultur 24 und 48 h nach Zugabe von Vinorin**

Die Spektren wurden **A**: 48 h und **B**: 96 h nach Zugabe von Vinorin an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf aufgenommen. Spektrum **A** wurde mit 16 Scans in 40 min erhalten, während Spektrum **B** mit 32 Scans in 80 min aufgezeichnet wurde. Zudem enthielt Probe **B** ca. 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , was zu einer leichten Verschiebung aller ppm-Werte führte. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: Ra 2', Ra 3'/5' und Ra 4' beziehen sich auf Signale, die den entsprechend nummerierten Kohlenstoffen des Raucaffricin zugeordnet werden können (vergleiche Abbildung 21).

---

In dem Spektrum der Probe des vierten Fütterungsexperimentes, das ebenfalls in Mainz vorbereitet wurde, ist nur die Bildung von Raucaffricin zu erkennen. Die vermessene Probe wurde 72 h nach Substratzugabe aus dem Kolben entnommen. Zehn Signale sind erkennbar. In Abbildung 26 können fünf Signale sowohl Vomilenin aber auch Raucaffricin zugeordnet werden, da die beiden Verbindungen in der Region von 5 - 8 ppm bzw. 100 - 130 ppm identische chemische Verschiebungen aufweisen (falls die chemische Verschiebung der Signale für C-H19 als identisch angenommen wird). Die Signale im Aliphatenbereich zwischen 2.6 und 3.3 ppm bzw. 60 und 80 ppm (siehe Abbildung 26) sind jedoch charakteristisch für Raucaffricin.



**Abbildung 26: 2D *in vivo* NMR-Spektrum einer *RxR*-Hybridkultur 72 h nach Zugabe von Vinorin**

Das Spektrum wurde mit 16 Scans aufgenommen an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, aufgenommen. **A:** zeigt den Bereich von 8.0 bis 5.4 ppm, **B:** zeigt den Bereich von 3.5 bis 1.0 ppm. Es wurde die Abkürzung Ra für die Kennzeichnung der Signale des Raucaffricins verwendet (Numerierung entsprechend der Kohlenstoffnumerierung (vergleiche Abbildung 21)).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die beiden Abbaewege für Vinorin auch mit der *in vivo* NMR-Spektroskopie nachzuweisen sind und die Auswertung der Spektren zu einem Ergebnis führt, das mit dem Ergebnis der HPLC-Analytik übereinstimmt. Um die Messungen nochmals zu überprüfen, wurde aus jedem Fütterungsansatz eine Probe für eine HPLC-Analyse entnommen. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme (Bedingungen siehe II.5.2.3, Gradient III) bestätigen die Ergebnisse der *in vivo* Messungen.

#### **2.2.4.2 Beobachtung der Vomilenin Umsetzung mit Hilfe der invers korrelierten 2D NMR-Spektroskopie unter Anwendung der Cryogenic Probe Technologie**

Aus den Spektren der Referenzsubstanzen konnte ermittelt werden, daß sich das Signal C-H19 von Vomilenin und Raucaffricin im  $^{13}\text{C}$ -Wert um ca. 4 ppm unterscheidet (laut Referenzspektrum: 126 ppm für Raucaffricin und 122 ppm für Vomilenin, siehe VIII Spektroskopischer Anhang). Während der Beobachtung des Vinorin-Metabolismus konnte jedoch nur ein Signal mit einer chemischen Verschiebung von 5.9/127 ppm detektiert werden. Durch eine Verfolgung der Vomilenin-Metabolisierung mit Hilfe der *in vivo* NMR sollte nun überprüft werden, ob Vomilenin im vorhergehenden Experiment nur in geringen Mengen gebildet wurde und deshalb das Signal nicht erfaßt wurde, was mit den HPLC-Ergebnissen korreliert, oder ob sich die Auflösung der Signale aufgrund der Tatsache, daß sich die Substanzen in den Zellen befinden, verschlechtert und sich dadurch beide Signale nicht mehr unterscheiden lassen, so daß keine Aussagen über die Bildung des Vomilenins gemacht werden können.

Die Zugabe von Vomilenin zu einer *RxR*-Zellsuspensionskultur zeigt, daß sich die chemischen Verschiebungen der beiden Verbindungen im Bereich von 5 - 8 ppm bzw. 100 - 130 ppm in den Zellen nicht unterscheiden. Das Spektrum der ersten Probe, die ca. 2 h nach Vomilenin Zugabe entnommen und direkt vermessen wurde, zeigt nur ein Signal mit einer chemischen Verschiebung von 5.9/127 ppm (vgl. auch 2.2.4.1). Dieses Signal kann dem Kohlenstoff 19 des Vomilenins zugeordnet werden, denn nach den Fütterungsversuchen mit anschließender HPLC-Analyse (vgl. III.2.2.3) müßte

zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich Vomilenin in den Zellen vorhanden sein. In einer späteren Probe (entnommen 72 h nach Zugabe des Substrates) ist keine weitere Verschiebung dieses Signals mehr zu erkennen. Es kommt jedoch wieder zu dem Erscheinen der fünf Signale im Aliphatenbereich zwischen 2.6 und 3.5 ppm bzw. 60 und 80 ppm (vgl. III.2.2.4.1), die dem Glucoserest des Raucaffricins entsprechen. Die HPLC-Analyse (Bedingungen siehe II.5.2.3) einer Probe, die 96 h nach Zugabe aus dem Fütterungsansatz entnommen wurde, bestätigte diese Umsetzung von Vomilenin zu Raucaffricin.

Damit zeigt sich, daß die Signale des C19 von Raucaffricin und Vomilenin unter *in vivo* Bedingungen bei der verwendeten Frequenz von 500 MHz (bzw. einer  $^{13}\text{C}$ -Frequenz von 125 MHz) nicht voneinander aufgelöst vorliegen.

### 2.2.5 Anlegen von "zuckerfreien" Kulturen

Mit Hilfe der Cryogenic Probe Technologie war es zum ersten Mal möglich, auch Signale im Aliphatenbereich mit großer Sicherheit zuzuordnen. Um noch weitere Signale der Substrate und deren Biotransformationsprodukte in diesem Bereich zu detektieren, wurde versucht, durch das Überführen von Pflanzenzellen in ein zuckerfreies Medium die Zuckersignale zu reduzieren. Dafür wurden 6 - 7 Tage alte Zellen einer *RxR*- und einer *R. serpentina*-Zellkultur (Zelllinie *R. serpentina Mutter*), die unter den in II.1 beschriebenen Standardbedingungen kultiviert wurden, durch Filtration vom üblichen Nährmedium getrennt und in ein kohlenhydratfreies LS-Medium überführt. Analog wurde zur Kontrolle mit Zellen verfahren, die in gewöhnliches LS-Medium überführt wurden.

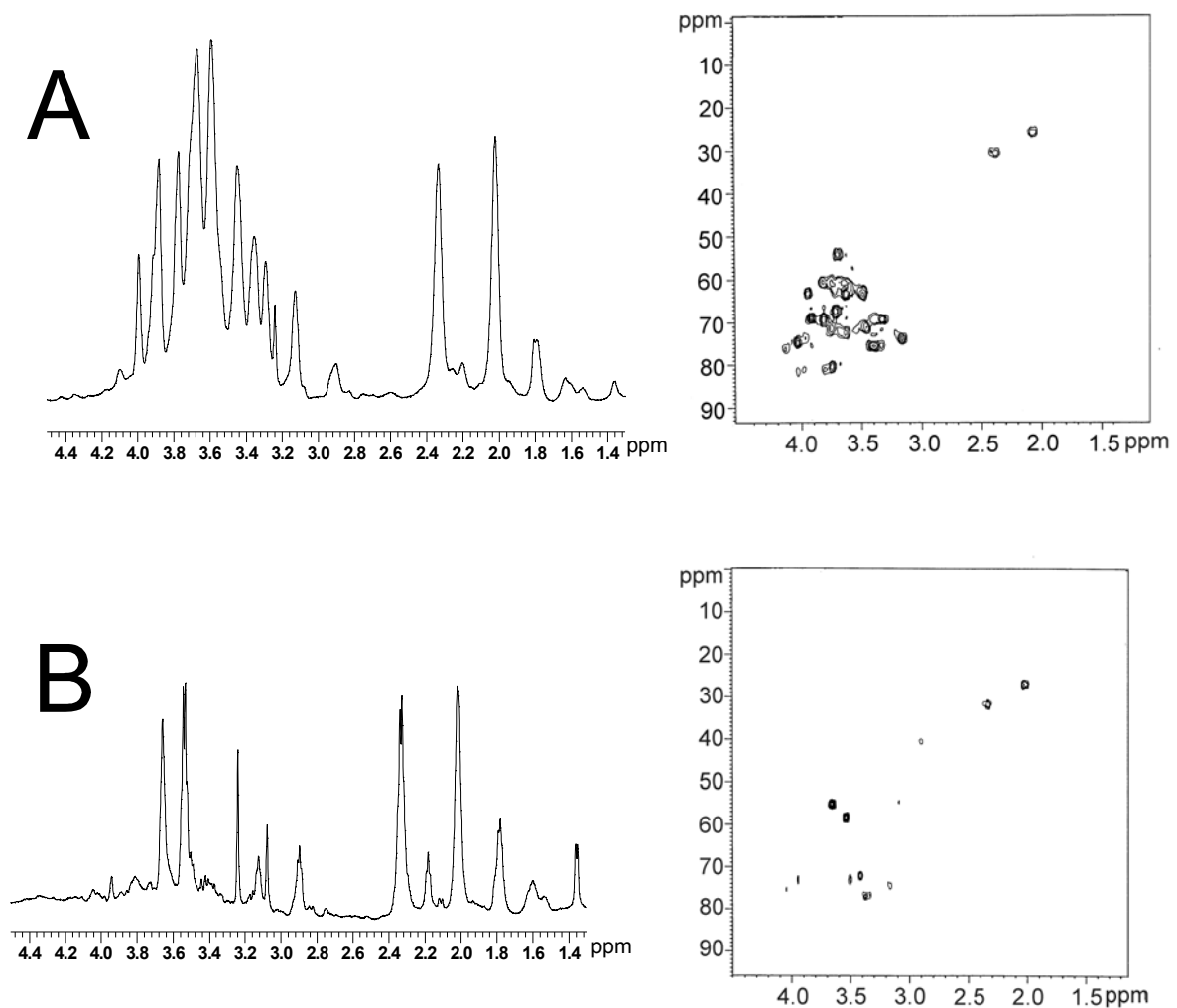
Jeweils eine Probe aus diesen angelegten Zellkulturen wurde fünf bzw. sechs Tage nach dem Überführen in das neue Medium entnommen und an einem 700 MHz UltraShield<sup>TM</sup> Spektrometer am CERM (Florenz, Italien) mit den in Tabelle 7 dargestellten Parametern vermessen.

Nach dem Transport wurden die Zellen unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

**Tabelle 7: Parameter der *in vivo* NMR-Messungen an Zellkulturen**

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| Pulsprogramm            | invietgpsi |
| CPD                     | GARP       |
| Linear Prediction in f1 | 128        |
| Scans                   | 16         |
| Dummy scans             | 16         |
| Acquisition time        | 0.129024 s |
| Relaxation delay        | 0.870926 s |
| Gradient ratio          | 80:20.1    |
| Recycle time            | 0.999950 s |

Die in Abbildung 27 abgebildeten Spektren zeigen die Reduzierung der Kohlenhydrat Signale durch die Überführung der Zellen in ein kohlenhydratfreies LS-Kulturmedium. Die Abnahme der Zuckersignale wurde auch in den anderen "zuckerfreien" Kulturen beobachtet.



**Abbildung 27: *In vivo* NMR-Spektren zweier *RxR* Kulturen**

Die Zellen wurden nach siebentägigem Wachstum in ein **A**: LS-Medium **B**: in ein zuckerfreies Medium überführt und fünf Tage später mit 16 Scans an einem 700 MHz Spektrometer vermessen.

Nach der erfolgreichen Reduzierung der Signale sollte untersucht werden, ob die "zuckerfreien" Kulturen auch Substrate in gleicher Art wie die Standardkulturen (vergleiche II.1) umsetzen. Fütterungsversuche mit Vinorin und Vomilenin, durchgeführt wie unter III.2.2.1 und III.2.2.4 beschrieben, führten zu den in III.2.2.1 und III.2.2.4 beschriebenen Ergebnissen. Die Versuche, den Metabolismus dieser Präkursoren in den Zellkulturen, die in einem zuckerfreien Medium kultiviert wurden, mit der *in vivo* Spektroskopie zu verfolgen, scheiterten. Nach dem Transport der "zuckerfreien" Zellkulturen

und bei Einsatz der *in vivo* Spektroskopie sowohl an einem 800 MHz CryoProbe<sup>TM</sup>- als auch an einem 500 MHz CryoProbe<sup>TM</sup>-Spektrometer konnte keine Metabolisierung beobachtet werden.

### 2.2.6 Versuch des Nachweises von endogenem Raucaffricin

Der Hauptinhaltsstoff der eingesetzten Zelllinien *R. serpentina München*, *R. serpentina Mutter* und *R. serpentina* ist nach den HPLC-Analysen Raucaffricin (vergleiche III.2.2.1). Die gegenwärtige Konzentration des endogenen Glucosids wurde jedoch nicht bestimmt. Raucaffricin ist als Hauptinhaltsstoff der *R. serpentina* Zellkulturen bekannt, es wurden Mengen bis zu 1.6 g/l gefunden [68]. Dies entspricht einer Konzentration von 3.1 mM bezogen auf 1 l Zellsuspensionskultur. Geht man jedoch davon aus, daß sich Raucaffricin nur in den Zellen befindet und nicht im Nährmedium, so kann die intrazelluläre Konzentration (bezogen auf die Gesamtmasse der Zellen) auf mindestens das Doppelte, ca. 6.2 mM, geschätzt werden. Wäre der Gehalt in den eingesetzten Kulturen heute tatsächlich noch so hoch, so müßte Raucaffricin mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie detektiert werden können. In den letzten Jahren ist jedoch ein Rückgang der Raucaffricin-Konzentration beobachtet worden [111].

Nach den bisherigen Versuchen kann die Nachweisgrenze der zugefügten Alkaloide auf eine Konzentration von etwa 0.5 mM geschätzt werden. Es sollte versucht werden endogenes Raucaffricin mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie nachzuweisen. Zum einen sollten dafür Standardkulturen eingesetzt werden und zum anderen Kulturen, die in ein zuckerfreies Medium überführt wurden. Die in III.2.2.5 beschriebenen Versuche wurden auch mit einer *R. serpentina*-Zellkultur (Zelllinie *R. serpentina Mutter*) durchgeführt. Diese Zelllinie zeigt in den HPLC-Untersuchungen einen hohen Raucaffricin-Gehalt (siehe III.2.2.3). Weder in dem Spektrum der "zuckerfreien" noch in dem Spektrum der "normalen" Kultur, konnten im Bereich von 6 - 8 ppm bzw. 100 - 135 ppm Crosspeaks von aromatischen C-H-Bindungen detektiert werden. Wahrscheinlich lag die Konzentration des Raucaffricins unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode.

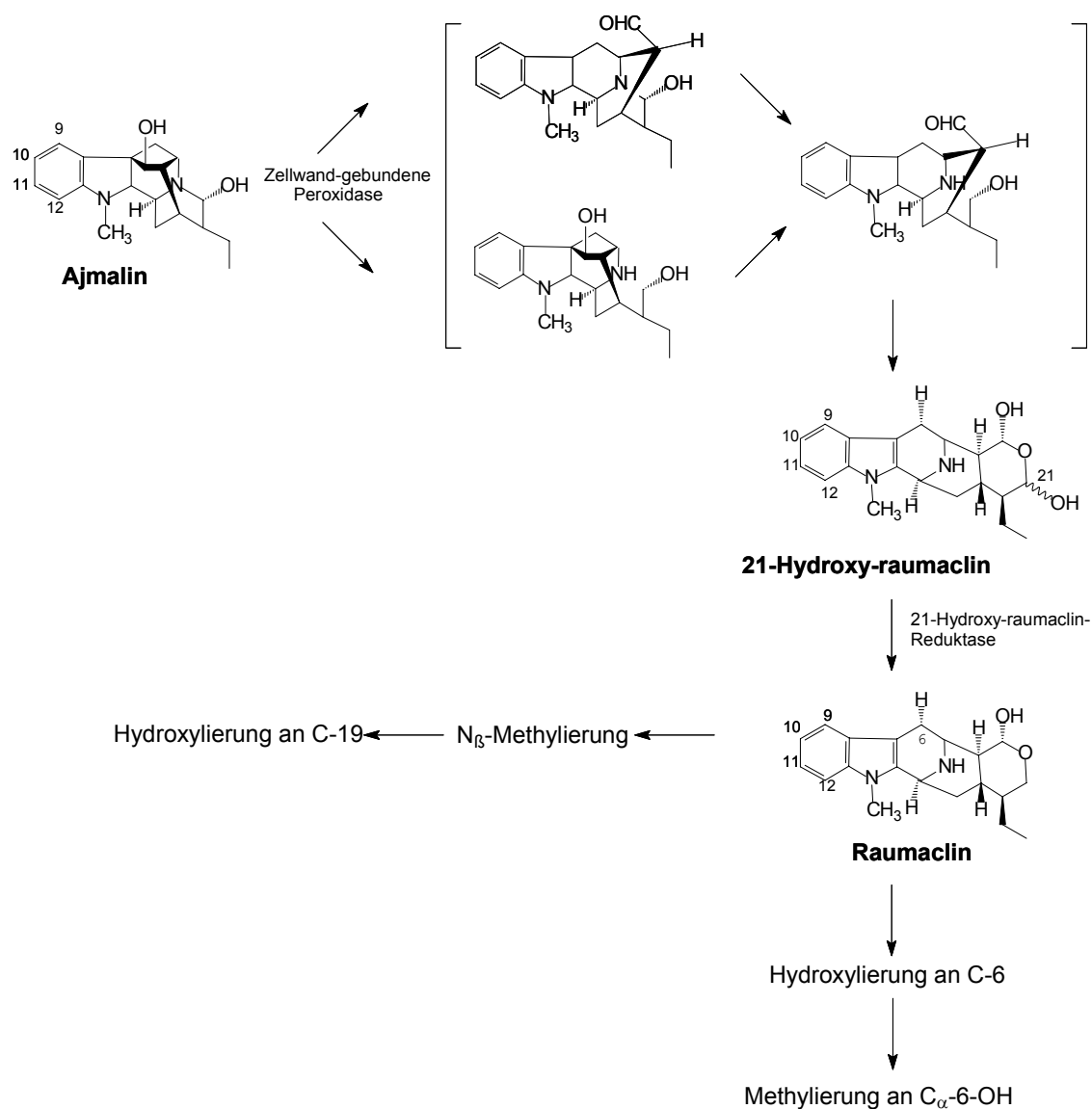


Es wurde versucht, diese Experimente an einem 800 MHz CryoProbe™ Gerät zu wiederholen. Dies müßte eine etwa 3 - 4-mal höhere Empfindlichkeit haben als das zuvor eingesetzte 700 MHz Spektrometer. Leider konnte aufgrund von Platzmangel beim Transport nur eine Kultur von *R. serpentina Mutter* mitgenommen werden. Die Zellen, die nach dreitägigem Wachstum in ein kohlenhydratfreies Medium überführt wurden, wurden vier Tage später vermessen. Es zeigten sich keine aromatischen Signale, die denen des Raucaffricins entsprechen.

Um sicher zu gehen, daß aufgrund der Kultivierung in dem kohlenhydratfreien Medium das Glucosid nicht abgebaut wird, um Glucose für den Energiehaushalt zu mobilisieren, wurde versucht, dies mit *invasiven* Methoden zu überprüfen. Dafür wurden die drei Zelllinien von *R. serpentina* (*R. serpentina*, *R. serpentina München* und *R. serpentina Mutter*) nach siebentägigem Wachstum in zuckerfreies Medium überführt und kultiviert. Nach 1, 24, 48, 96 und 168 h wurde jeweils eine Probe entnommen. Die Zellen wurden vom Nährmedium durch Zentrifugation abgetrennt; 300 mg Zellen wurden mit 600 µl MeOH extrahiert, in der üblichen Weise aufgearbeitet und anschließend mittels HPLC untersucht (vergleiche II.7 und III.2.2.1). Nur in der Zelllinie *R. serpentina Mutter* konnte erst nach dem fünften Tag eine abnehmende Raucaffricin Konzentration gefunden werden. Nach diesen Ergebnissen kann der ausgebliebene Nachweis von Raucaffricin in zuckerfreien Medien nicht auf den Abbau der Substanz zurückgeführt werden, sondern wahrscheinlich auf eine zu geringe Konzentration. Jedoch ist auch zu beachten, daß Inhaltsstoffe, falls diese an Makromolekülen gebunden vorliegen, nicht mittels der *in vivo* NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden können. Dies könnte eine weitere Möglichkeit für die ausbleibende Detektion gewesen sein.

### 2.3 Metabolismus von Ajmalin

Als eine weitere Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie in der Biosyntheseforschung diene die Untersuchung der Biotransformation des Ajmalins. Abbildung 28 stellt die Ergebnisse der Metabolisierung von Ajmalin dar, die durch Fütterungsversuche mit *R. serpentina*-Zellsuspensionskulturen erhalten wurden [137].



**Abbildung 28:** Biosynthesesequenz der Alkaloide des Raumaclin-Typs, nachgewiesen durch Fütterung von Ajmalin an *R. serpentina*-Zellsuspensionskulturen [137]

Ajmalin wird nach Oxidation und anschließender Reduktion zu Raumaclin, einer Verbindung vom Macrolin-Typ, umgesetzt. Danach schließen sich Methylierungen und Hydroxylierungen an [137-139]. Über die möglichen Zwischenprodukte (siehe Klammer in Abbildung 28) der Oxidationsreaktion besteht noch Ungewißheit. Es sollte deshalb festgestellt werden, ob mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie der Metabolismus der Raumaclin-Bildung nachvollzogen und eventuell auch Rückschlüsse auf die bisher unbekanntes Zwischenprodukte gezogen werden können.

#### 2.4.1 Biotransformationsversuche mit Ajmalin

Die bisherigen Ergebnisse, die durch die Umsetzung von Ajmalin mit einer *R. serpentina*-Zellkultur erhalten wurden [137], sollten mit der Hybridkultur-*R. serpentina x Rhazya stricta* zunächst *invasiv* nachvollzogen werden. Dafür wurden 75 mg Ajmalin, gelöst in 6.2 ml MeOH, zu 150 ml einer vier Tage alten *RxR*-Kultur gegeben, die unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert wurde, so daß eine Ajmalin-Konzentration von ca. 1.6 mM erreicht wurde. Jeweils 2 ml Zellsuspension wurden 1, 24, 72, 96 und 168 h nach Zugabe des Substrates entnommen. Die Zellen wurden vom Medium durch Zentrifugation abgetrennt und in der üblichen Weise aufgearbeitet (siehe II.7). Die erhaltenen Proben wurden unverdünnt mit Hilfe der HPLC untersucht (Bedingungen siehe II.5.2.4). Die Chromatogramme zeigen die Bildung eines Hauptproduktes (**1**) mit einer Retentionszeit von ~ 24.5 min und eines Nebenproduktes (**2**) mit einer Retentionszeit von ~ 19.7 min. Beide Produkte sind sowohl im Medium als auch in den Zellextrakten nachweisbar. Jedoch ist das Nebenprodukt (**2**) in den Proben des Nährmediums 72 h nach Applikation des Substrates im Verhältnis 0.7:1 zum Hauptprodukt vorhanden, in der 96 h nach Zugabe des Ajmalins entnommenen Probe des Nährmediums sogar im Verhältnis 1.4:1. Wobei die absolute Konzentration im Vergleich zu vorherigen Probe (entnommen 72 h nach Ajmalin-Applikation) geringer ist. In den Zellextrakten der beiden Proben ist Produkt (**1**) das Hauptprodukt. Das Produkt (**2**) ist dabei in wesentlich geringeren Mengen (Verhältnis Konzentration außen/Konzentration innen = 3:1) als im Nährmedium nachzuweisen. In den Proben, die eine Woche nach der Zugabe des Ajmalins entnommen wurden,

ist nur noch Produkt (1) nachweisbar. Die erhaltenen Extrakte wurden zudem dünnschichtchromatographisch untersucht. Die beiden Metabolisierungsprodukte zeigen die in Tabelle 8 dargestellten Eigenschaften.

**Tabelle 8: Eigenschaften der unbekanntem Biotransformationsprodukte des Ajmalins**

|  | Produkt 1  | Produkt 2  |
|--|------------|------------|
| Färbung nach Besprühen mit SR 1 (siehe II.5.2) | grau-grün  | grau-grün  |
| Rf-Wert (FM 6, siehe II.5.1)                   | 0.61       | 0.30       |
| Rt (siehe II.5.2.4)                            | ~ 24.5 min | ~ 19.7 min |

Mit Hilfe der Coinjektion konnte Produkt 1 als Raumaclin identifiziert werden. Um dies zu bestätigen, wurde eine weitere DC angefertigt, der Substanzfleck mit Rf 0.61 ausgekratzt, vom Kieselgel eluiert und die erhaltene Verbindung massenspektrometrisch untersucht. Das Spektrum zeigt einen Molekül-Ionenpeak bei 326 m/z. Durch einen Vergleich mit vorhandenen MS-Daten [137] kann die Substanz eindeutig als Raumaclin identifiziert werden. Das Nebenprodukt ist aufgrund der charakteristischen grau-grünen Färbung des Flecks nach Besprühen der DC mit SR 1 (siehe II.5.1) auch in die Gruppe der Raumaclin-Alkaloide einzuordnen. Das Massenspektrum zeigt einen Massenpeak bei 324 m/z. Der Vergleich mit vorhandenen EI-MS-Referenzspektren [140], [137] isolierter Raumaclin-Derivate deutet darauf hin, daß das Nebenprodukt ein hydroxyliertes Raumaclin-Derivat, entweder 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin oder 21-Hydroxy-raumaclin, eine Vorstufe des Raumaclins, sein könnte. Keines der beiden hydroxylierten Derivate zeigt einen Molekül-Ionenpeak im EI-MS-Spektrum [140], [139], jedoch tritt in den Spektren der beide Verbindungen auch ein Signal bei 324 m/z auf. Das HPLC-Chromatogramm einer Probe, der 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin zugeführt wurde, deuten daraufhin, daß es sich bei dem Nebenprodukt um 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin handeln könnte. Es kam zu keiner weiteren Signalbildung. Jedoch ist zu bemerken, daß ENDREß [137] frühestens sieben Tage nach Applikation

von Ajmalin zu einer *R. serpentina*-Zellkultur, 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin in den Extrakten nachweisen konnte. Es entsteht durch Hydroxylierung von Raumaclin. Deswegen ist die abnehmende Konzentration des Nebenproduktes in den letzten Proben ein Punkt, der gegen diese Identifizierung spricht. 21-Hydroxy-raumaclin ist eine Vorstufe in der Raumaclin-Biosynthese (siehe Abbildung 28). Sie wurde auch bei Fütterungsexperimenten mit Ajmalin in einer Zellkultur mit einem verlangsamten Stoffwechsel gefunden. Zudem konnte 21-Hydroxy-raumaclin durch eine *in vitro* Inkubation von Ajmalin, dem Cofaktor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einer Enzymfraktion, die Zellwandfragmente enthielt, dargestellt werden [140]. Leider stand diese Substanz zur Bestimmung der Retentionszeit und für Coinjektions-Analysen nicht zur Verfügung. Jedoch kann für die Verbindung eine dem des 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclins ähnliche Polarität angenommen werden, so daß die Retentionszeiten der beiden Verbindungen bei dem verwendeten Gradient gleich sein können und zusammenfallen. Daher ist eine eindeutige Identifizierung des zweiten gebildeten Raumaclin-Derivats nicht möglich.

Die Bildung der weiteren Raumaclin-Derivate (siehe Abbildung 28) konnte unter den angewandten Bedingungen nicht nachvollzogen werden. ENDREß konnte jedoch erst nach 14-tägiger Inkubationsdauer von Ajmalin alle Derivate des Raumaclins nachweisen [137]. Die Biotransformation in den beschriebenen Experimenten wurde nur über eine Woche beobachtet.

Auf die weitere Untersuchung der Bildung der übrigen Nebenprodukte wurde verzichtet. Falls *RxR*-Hybridkulturen den gleichen Metabolisierungsweg wie *R. serpentina*-Kulturen eingehen und die übrigen Raumaclin-Derivate bildet, so ist nach den Ergebnissen von ENDREß frühestens ab dem siebten Tag nach Substratzugabe mit der einer beginnenden Bildung der Raumaclin-Derivate zu rechnen.

### 2.4.2 *In vivo* Beobachtung des Metabolismus von Ajmalin in einer Hybridkultur von *R. serpentina* x *Rhazya stricta*

Der Metabolismus des Ajmalins wurde an einem 700 MHz UltraShield™ Spektrometer bei der Bruker BioSpin AG (Fällanden, Schweiz) untersucht. Dafür wurde Ajmalin in 12 ml eines Gemisches aus MeOD-d<sub>4</sub> und D<sub>2</sub>O (1:1) gelöst und zu 150 ml einer fünf Tage alten *RxR*-Zellkultur gegeben. Die Startkonzentration des Ajmalins betrug 1.6 mM. Die dargestellten Spektren wurden mit dem Pulsprogramm "invietgpsisp.ric" und den in Tabelle 9 aufgeführten Parametern gemessen.

**Tabelle 9: NMR-Parameter der *in vivo* Verfolgung der Ajmalin-Metabolisierung in *RxR*-Zellen**

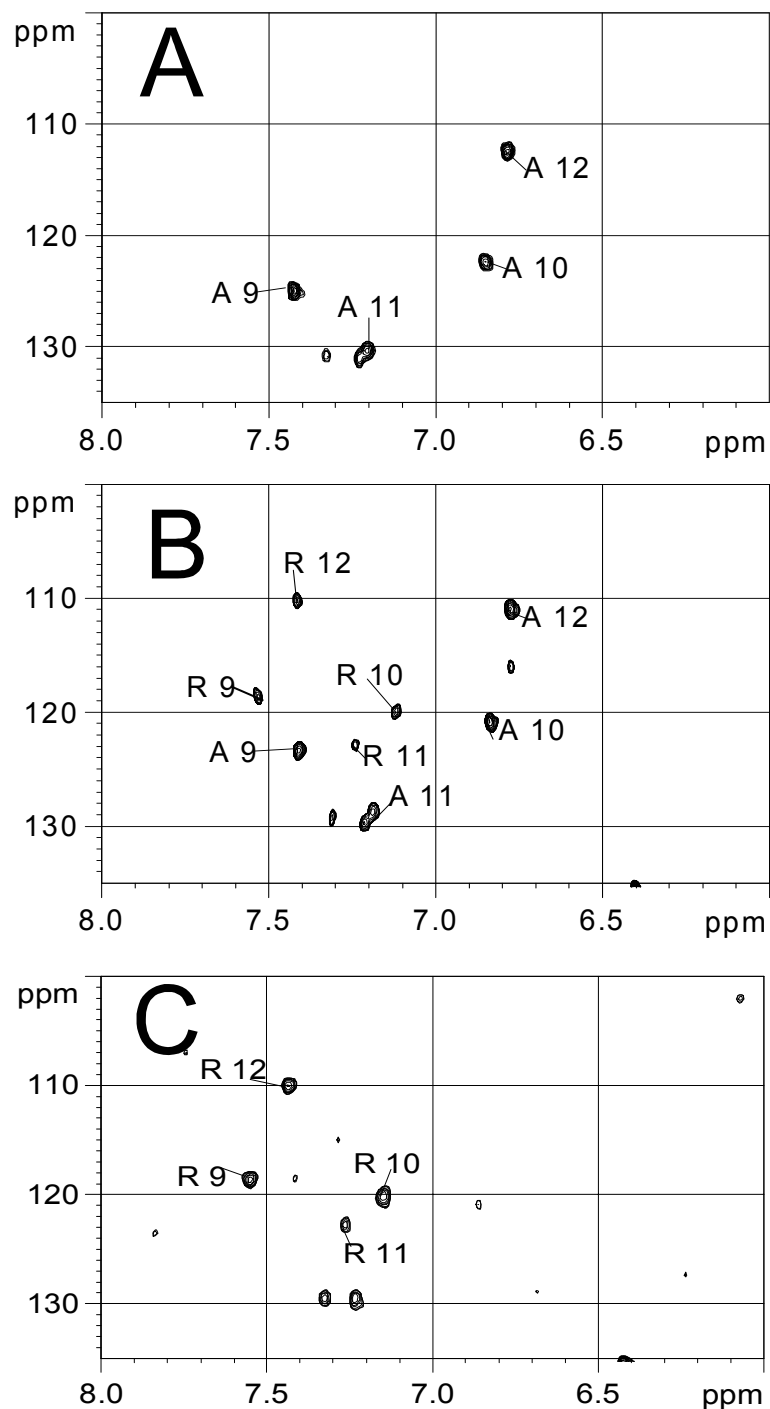
|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| Linear Prediction in f1 | 128 data points |
| Scans                   | 32              |
| Dummy scans             | 16              |
| Acquisition time        | 0.1221704 s     |
| Relaxation delay        | 1 s             |
| Gradient ratio          | 80:20.1         |
| Recycle time            | 1.1221704 s     |

Die Zellen, die unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert wurden, mußten für die Messungen nach Fällanden (Schweiz) transportiert werden. Nach dem Transport wurde versucht sie unter den in Mainz üblichen Bedingungen weiter zu kultivieren. Dies war jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Ausstattung für die Kultivierung von Pflanzenzellkulturen schwierig. Vor allem die Temperaturschwankungen waren mit mehr als  $\pm 5$  °C deutlich größer als in Mainz ( $\pm 1$  °C).

Es wurden drei Fütterungsansätze an unterschiedlichen Tagen angesetzt aus denen dann 24, 120 h und 2 Wochen nach Zugabe des Substrates jeweils eine Probe entnommen und vermessen wurde. In dem in Abbildung 29A dargestellten Spektrum, welches 24 h nach Zugabe von Ajmalin aufgenommen wurde, sind im Bereich von 5 - 8 ppm vier Crosspeaks zu erkennen, die mit Hilfe eines Referenzspektrums des Ajmalins dem Substrat zugeordnet

---

werden können. In dem Spektrum 120 h nach Zugabe des Ajmalins ist das Erscheinen von vier neuen Signalen bei 7.10/120 (R 10), 7.23/124 (R 11), 7.39/110 (R 12) und 7.55/119 ppm (R 9) zu beobachten (siehe Abbildung 29B). Mit Hilfe eines Referenzspektrums und vorhandenen Literaturdaten [137, 139, 141] können diese vier neuen Signale Raumaclin bzw. dem hydroxylierten Raumaclin-Derivat zugeordnet werden. In der Probe 2 Wochen nach Substratzugabe sind nur noch die aromatischen Signale des bzw. der Raumaclin-Alkaloide zu beobachten (siehe Abbildung 29C).



**Abbildung 29: *In vivo* Spektren einer *RxR*-Zellkultur nach Zugabe von Ajmalin**

**A:** 24 h, **B:** 120 h und **C:** 2 Wochen nach Zugabe von Ajmalin. Die Probe des Ansatzes **C** enthält MeOH statt MeOD- $d_4$ . Die Spektren wurden mit 32 Scans in 80 min an einem 700 MHz UltraShield™ Spektrometer aufgenommen. Die Abkürzungen A 9, A 10, A 11, A 12 bezeichnen die C-H-Signale der entsprechend numerierten Kohlenstoffatome des Ajmalins; die Abkürzungen R 9, R 10, R 11, R 12 die des Rauvolfins (siehe Abbildung 28).

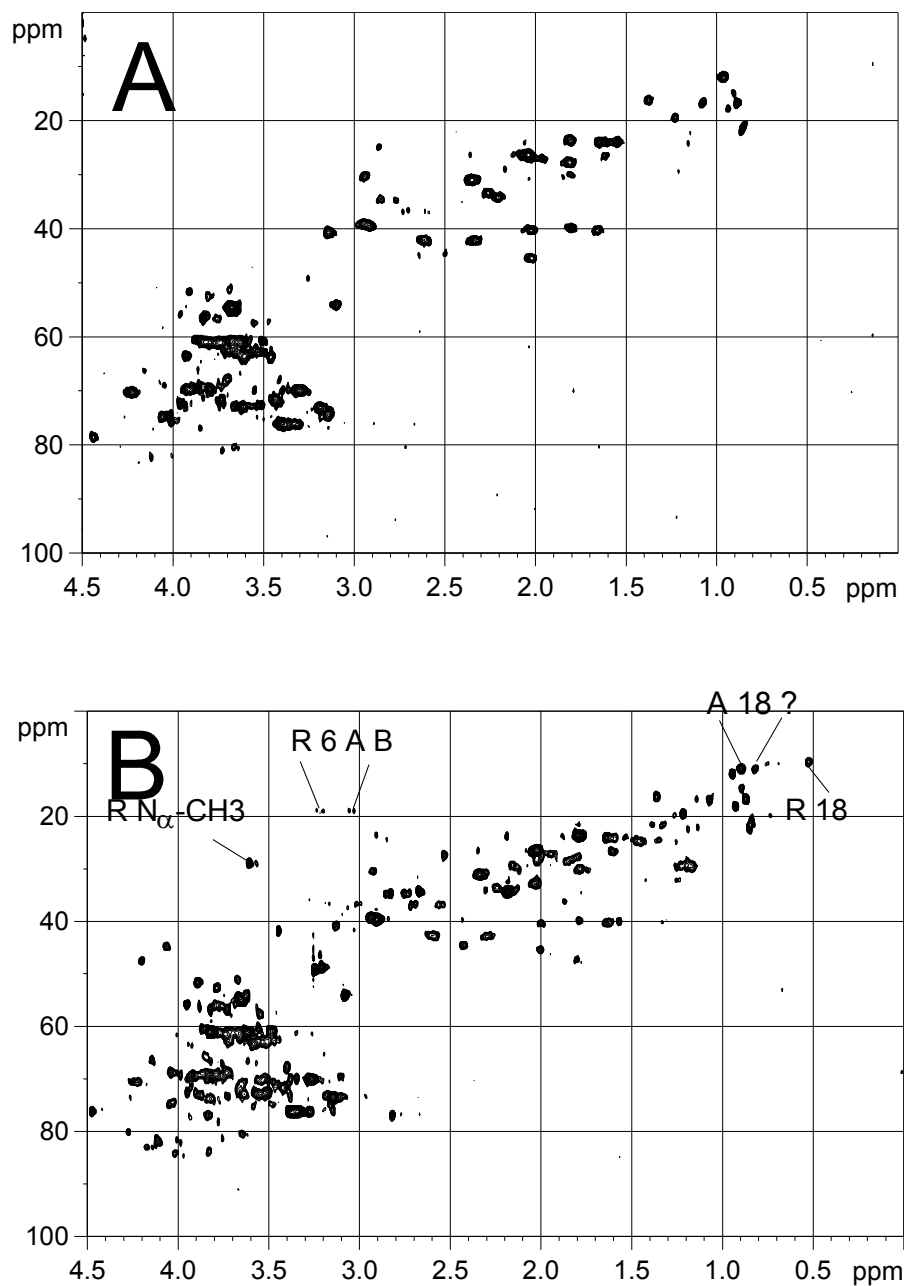


Mit Hilfe eines Referenzspektrums einer Zellkultur ohne Alkaloidzusatz und den NMR-Spektren von Raumaclin, 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin und Ajmalin sollte versucht werden, weitere Signale im Aliphatenbereich zuzuordnen.

In dem in Abbildung 30B dargestellten Spektrum, 120 h nach der Zugabe von Ajmalin, sind einige neue Signale im Bereich von 0 bis 4.5 ppm bzw. von 0 bis 100 ppm erschienen, die von dem Zellhintergrund separiert vorliegen. Deutlich zu erkennen sind die Signale der Methylgruppen, d.h. das Signal der Protonen und des dazugehörigen Kohlenstoffs 18 mit der chemischen Verschiebung von 0.5/10 ppm und die N $\alpha$ -Methylgruppe bei 3.7/29 ppm. Die Zuordnung der Methylgruppen des Ajmalins ist schwierig. Laut Referenzspektrum liegen sie bei 0.8/11 ppm und 2.6/34 ppm. In diesen Regionen weist der Zellhintergrund jedoch viele Signale auf (siehe Abbildung 30). Somit ist die Zuordnung nicht eindeutig. Die Crosspeaks bei 3.0/19 ppm und 3.2/19 ppm könnten den Protonen 6A und B und dem dazugehörigen Kohlenstoff des Raumaclins zuzuordnen sein. Die Werte im Referenzspektrum liegen für diese beiden Signale bei 2.7/19 ppm und 3.1/19 ppm (siehe Abbildung 30B). Die Intensität der entsprechenden Signale im *in vivo* Spektrum ist jedoch sehr schwach. Somit sind sie nicht zur Identifizierung geeignet. Außerdem sind Signale vorhanden, die keiner der Substanzen zugeordnet werden können. Es ist auch zu beachten, daß es bei unterschiedlich langer Kultivierung bzw. unterschiedlicher Behandlung der Zellkultur auch zu einer Änderung des Zellhintergrunds kommen kann.

Über das in den HPLC-Analysen gebildete Nebenprodukt läßt sich mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie keine weitere Aussage treffen. Nach den Referenzspektren sind die chemischen Verschiebungen der beiden Methylgruppen des Raumaclins und des 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclins identisch. Auch die vorhandenen Literaturdaten des 21-Hydroxy-raumaclins weisen für die beiden Methylgruppen die gleichen chemischen Verschiebungen auf [140]. Wenn das in den HPLC-Analysen gefundene Produkt nicht während der Extraktion und weiteren Aufarbeitung aus Raumaclin entstanden ist und in diesem Versuch in ausreichender Menge gebildet wurde, so daß die Konzentration überhalb der Nachweisgrenzen liegt, gehört das zweite Biotransformationsprodukt zu den Raumaclin-Alkaloiden, da im Aromatenbereich keine weiteren Signale für ein

Alkaloid einer anderen Klasse zu erkennen sind. Dies stimmt mit den zuvor durchgeführten HPLC-, MS- und DC-Untersuchungen überein.



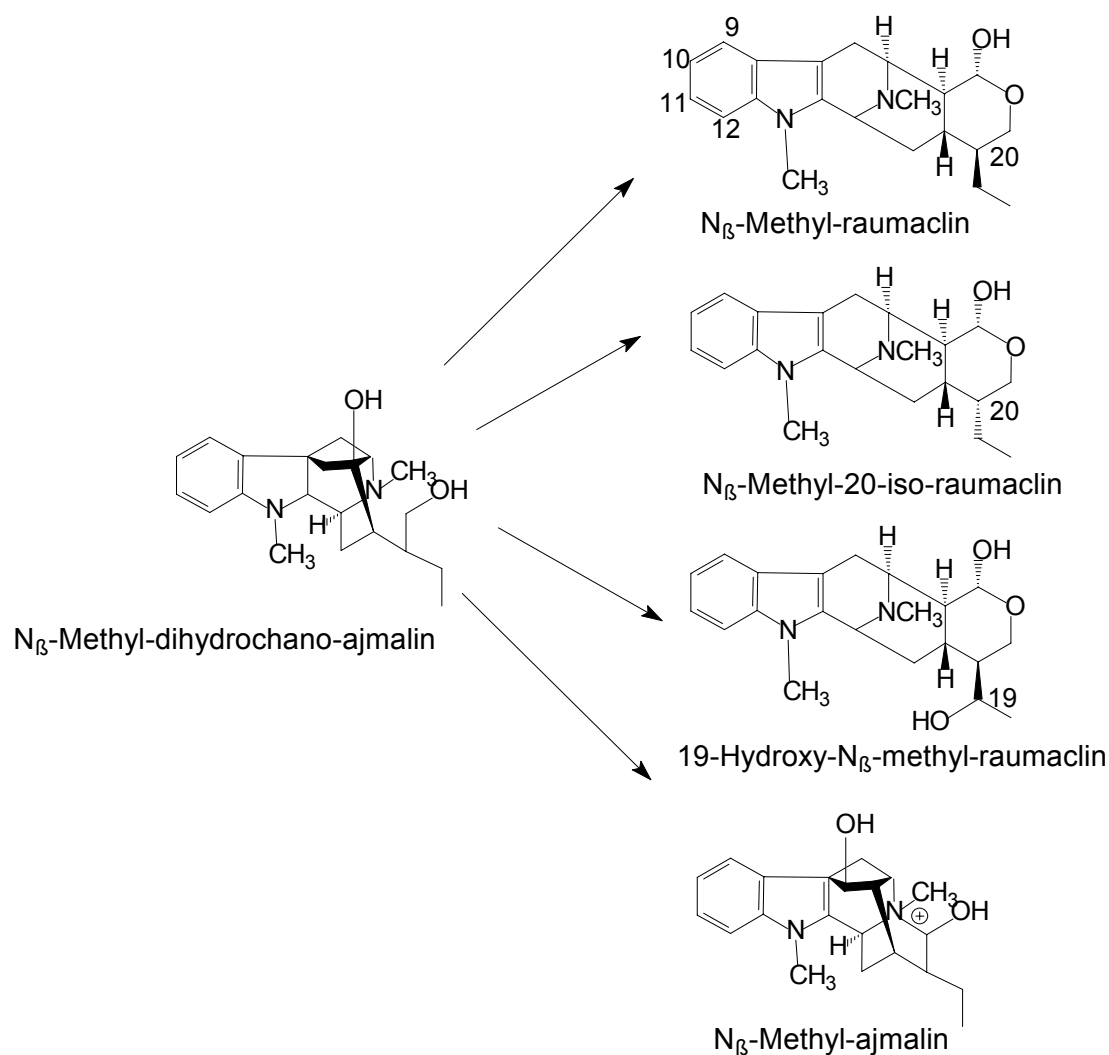
**Abbildung 30: In vivo Spektren zweier RxR-Zellkulturen**

**A:** ohne Substratzusatz und **B:** 120 h nach Zusatz von Ajmalin. Die Spektren wurden mit 32 Scans in 80 min an einem 700 MHz Spektrometer aufgenommen. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: A 18 bezeichnet das C-H-Signal des entsprechend nummerierten Kohlenstoffatoms des Ajmalins; die Abkürzungen R 6 A B, R 18 und R N<sub>α</sub>-CH<sub>3</sub> die des Raumaclins (siehe Abbildung 28).

### 2.4.3 Biotransformationsversuche mit N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin

N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin ist das N<sub>β</sub>-Methyl-Derivat des Dihydrochano-ajmalins, das ein mögliches Zwischenprodukt in der Raumaclin-Biosynthese (siehe Abbildung 28) ist und von den Zellkulturen der *R. serpentina* problemlos metabolisiert wird [122]. Da bei der Beobachtung des Metabolismus von Ajmalin nur die Bildung des Raumaclins und eines hydroxylierten Derivates beobachtet werden konnte, war es nun interessant *in vivo* zu untersuchen, ob der Metabolismus von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin vielleicht Hinweise auf die möglichen Zwischenprodukte der Raumaclin-Bildung ergibt.

Auch hier galt es zunächst vorhandene Ergebnisse mit der Hybridkultur, die in LS-Medium kultiviert wurde, zu überprüfen [122]. In *R. serpentina*- und *RxR*-Zellkulturen, welche in AP-Medium angezogen wurden, wurde N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin zu den in Abbildung 31 dargestellten beiden Hauptprodukten (N<sub>β</sub>-Methyl-raumaclin und N<sub>β</sub>-Methyl-iso-raumaclin) und den beiden Nebenprodukten (N<sub>β</sub>-Methyl-ajmalin und 19-Hydroxy-N<sub>β</sub>-methyl-raumaclin) umgesetzt. Das Nebenprodukt 19-Hydroxy-N<sub>β</sub>-methyl-raumaclin wurde bei Kultivierung einer *R. serpentina*-Kultur im LS-Medium in weit geringerem Umfang gebildet [122]. Die Metabolisierung von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin in einer *RxR*-Kultur, die in LS-Medium kultiviert wurde, war bisher noch nicht untersucht worden.



**Abbildung 31: Biotransformationsprodukte des  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalins nach Applikation an *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen [122]**

Um zu untersuchen, wie die im LS-Medium kultivierte Hybridkultur das  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin, das nach der in II.4.3 beschriebenen Vorschrift hergestellt wurde, umsetzt, wurden 5 mg der Substanz in 1 ml 50 %igem MeOH gelöst und zu 15 ml einer vier Tage alten *RxR*-Zellkultur gegeben. Diese wurde unter den in II.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert (vgl. II.7). Die Probenentnahme (1.5 ml Zellsuspension) erfolgte 1, 48 und 120 h nach Substratzugabe. Das Zellgewebe wurde durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt, die Proben in gewohnter Weise aufgearbeitet (vgl. II.7) und mit

Hilfe der HPLC unverdünnt analysiert (HPLC-Bedingungen siehe II.5.2.4). Die Chromatogramme zeigen die Bildung von zwei Hauptprodukten mit Retentionszeiten von  $\sim 24.3$  und  $\sim 26.4$  min und eines Nebenproduktes mit einer Retentionszeit von  $\sim 20.3$  min. Nach den HPLC-Daten der von SCHROEDER durchgeführten Fütterungsversuche mit  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochanoajmalin in einer *RxR*-Kultur, die jedoch in AP-Medium kultiviert wurde [122], handelt es sich vermutlich um  $N_{\beta}$ -Methyl-iso-raumaclin,  $N_{\beta}$ -Methyl-raumaclin und  $N_{\beta}$ -Methyl-ajmalin. Zur Bestätigung wurden nach einer zweiten Fütterung die Zellen sieben Tage nach Applikation vom Nährmedium abgetrennt, mit MeOH extrahiert und der erhaltene Extrakt dünnschichtchromatographisch analysiert. Nach Besprühen der DC-Platte mit SR 2 (siehe II.5.1) kam zu einer grau-grün Färbung von zwei Substanzflecken ( $R_f$  0.75 (FM 6, siehe II.5.1) und 0.66 (FM 6, siehe II.5.1) und einer verblassenden Rotfärbung eines Substanzflecks mit einem  $R_f$ -Wert von 0.26 (FM 6, siehe II.5.1). Abschließend wurden die Substanzen mit Hilfe der präparativen DC isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Die erhaltenen Spektren und die Sprühreagenzreaktion bestätigen die Strukturvermutung. Zudem wurde von den beiden Hauptprodukten ein Protonen-NMR-Spektrum aufgenommen, welche ebenfalls das Ergebnis unterstützen.

#### 2.4.4 Beobachtung des Metabolismus von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalin in einer Hybridkultur von *R. serpentina* x *Rhazya stricta* mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie

Zur *in vivo* Beobachtung der Metabolisierung des N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalins fanden NMR-Messungen bei der Bruker BioSpin AG in Fällanden (Schweiz) an einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm 1H {13C/15N} Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, statt. Es wurden folgende in Tabelle 10 dargestellte Parameter verwendet.

**Tabelle 10: NMR-Parameter der *in vivo* Verfolgung des N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalin-Stoffwechsels in einer *RxR*-Zellkultur**

|                         |              |
|-------------------------|--------------|
| Pulsprogramm            | invietgpsisp |
| Linear Prediction in f1 | 128          |
| Scans                   | 4 - 32       |
| Dummy Scans             | 16           |
| Acquisition time        | 0.1463486 s  |
| Relaxation delay        | 1 s          |
| Gradient ratio          | 80:20.1      |
| Recycle time            | 1.1463486 s  |

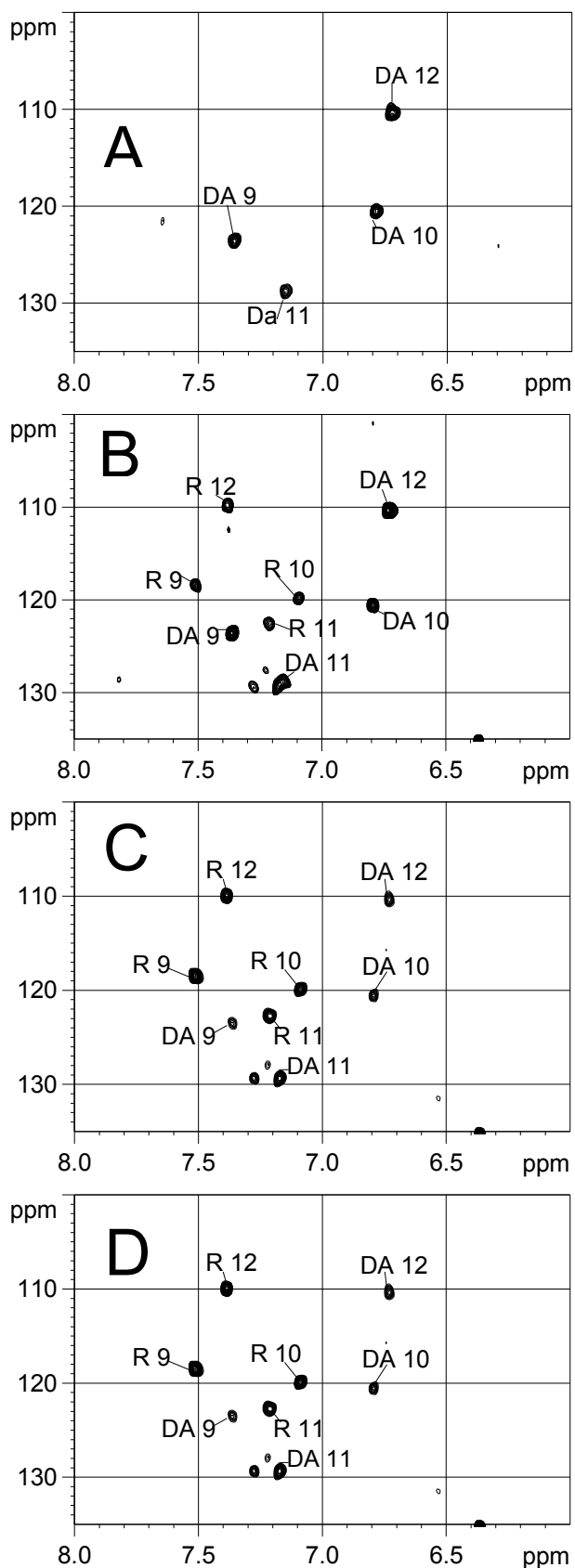
Da für die Messungen nur drei Tage zu Verfügung standen, wurden erneut zwei Fütterungsansätze vorbereitet. Zu ca. 15 ml einer *RxR*-Suspensionskultur wurden jeweils 12.5 mg N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalin, gelöst in 1 ml eines Gemisches aus MeOD-d<sub>4</sub> und D<sub>2</sub>O (1:1), gegeben, so daß eine Konzentration von 2.6 mM erreicht wurde. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen sechs Tage alt waren, um so vielleicht einen geringeren "Kohlenhydrat-Hintergrund" zu gewährleisten.

Durch die Erhöhung der Konzentration des Substrates und der Anwendung der Cryogenic Probe Technologie sollten so mehrere Signale im Aliphatenbereich zur Identifizierung der Pro- und Edukte herangezogen werden können. Aus dem Fütterungsansatz, der in der Schweiz vorbereitet wurde, wurde direkt nach der Zugabe des Substrates und 43 h später eine Probe entnommen und NMR-spektroskopisch untersucht.

Aus einem zweiten Fütterungsansatz wurden 72 h und 120 h nach Substratzugabe Proben entnommen und vermessen. In den in Abbildung 32 dargestellten Spektren ist die Umwandlung des  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin zu einem Alkaloid des Raumaclin-Typs durch Auswertung der Signale im Aromatenbereich klar erkennbar. Im ersten Spektrum sind schon nach 4 Scans (20 min) vier Crosspeaks bei 6.73/110 (DA 12), 6.78/121 (DA 10), 7.15/129 (DA 11) und 7.35/124 ppm (DA 9) zu sehen (siehe Abbildung 32A). Diese können eindeutig  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin zugeordnet werden. Anschließend wurde die Probe noch mit 16 (Meßzeit: 40 min) und 32 (Meßzeit: 80 min) Scans vermessen. Diese Spektren brachten aber keine weiteren Informationen bezüglich der Signale des Eduktes und der Bildung eines neuen Produktes. Durch ein Referenzspektrum des Substrates, aufgenommen in  $D_2O$ , und mit Hilfe Literaturdaten [122], wurde die Zuordnung der Signale überprüft und bestätigt.

Im Spektrum der Probe nach 43 h (siehe Abbildung 32B) sind mindestens vier neue Signale bei 7.10/120 (R 10), 7.21/124 (R 11), 7.39/110 (R 12) und 7.52/119 ppm (R 9) zu erkennen. Diese chemischen Verschiebungen sind typisch für Raumaclin-Alkaloide (siehe III.2.3.1). Auch in den Spektren des zweiten Fütterungsansatzes sind beiden Verbindungen zu erkennen. Im Spektrum der Probe, die 72 h nach Zugabe des Substrates entnommen wurde, (siehe Abbildung 32C) zeigen noch die Signale des  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalins eine stärkere Intensität, während im Spektrum der Probe, die nach 120 h nach Substratzugabe entnommen wurde (siehe Abbildung 32D), die Umsetzung vorangeschritten ist und deshalb die Signale des bzw. der Raumaclin-Alkaloide eine höhere Intensität aufweisen.





**Abbildung 32: 2D *in vivo* NMR-Spektren einer RxR-Zellkultur nach Zugabe von N $\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin**

**A:** 1 h, **B:** 43 h, **C:** 72 h und **D:** 120 h nach Applikation des Substrates. Spektrum **A** wurde mit 4 Scans in 20 min und die Spektren **B**, **C** und **D** mit 16 Scans in 40 min an einem 500 CryoProbe<sup>TM</sup>-Spektrometer aufgenommen. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: DA 9, DA 10, DA 11 und DA 12 bezeichnen die C-H Signale des N $\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin. R 9, R 10, R 11 und R 12 sind die C-H-Signale des bzw. der N $\beta$ -Methyl-raumaclins bzw. des N $\beta$ -Methyl-iso-raumaclins.

Durch einen Vergleich eines Zellhintergrundspektrums, d.h. eines Spektrums von ungefütterten Zellen, Referenzspektren der erwarteten Produkte und des Eduktes mit den *in vivo* NMR-Spektren sollte versucht werden, Signale im Aliphatenbereich zuzuordnen. In den Spektren der später entnommenen Proben (43 h, 72 h und 96 h nach Substratzugabe) waren lediglich zwei Signale auffällig von den Zellhintergrundsignalen abgetrennt, die in den Spektren der Kontrollproben und im Spektrum, das direkt nach Zugabe des Substrates aufgenommen wurde, nicht vorhanden waren. Diese Signale stammen von der N<sub>α</sub>-Methylgruppe und von der Methylgruppe 18 mit den chemischen Verschiebungen von 3.5/29 ppm und 0.5/10 ppm der Raumaclin-Alkaloide. Die N<sub>β</sub>-Methylgruppe hat eine chemische Verschiebung von ca. 2.3/39 ppm im Referenzspektrum. In den *in vivo* Spektren 43, 72 und 96 h nach Substratzugabe kann ein Signal bei 2.7/39 ppm detektiert werden, welches in den anderen beiden Spektren nicht vorhanden ist. Dies könnte dem Signal der N<sub>β</sub>-Methylgruppe entsprechen und ein Hinweis auf die Bildung eines N<sub>β</sub>-Methyl-raumaclins sein. Denn in *in vivo* Spektren sind schon häufiger Verschiebungen der <sup>1</sup>H-Werten bis zu 0.5 ppm beobachtet worden (siehe II.2.2.4).

Auch Signale des N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalins scheinen identifiziert werden zu können. Die Signale bei 2.5/53 ppm für C-H16, 1.5/48 ppm für C-H20 und bei 2.7/73 ppm für C-H2 erscheinen nur in den Spektren der gefütterten Proben. Auch bei diesen Signalen ist eine Tieffeldverschiebung von 0.2-0.5 ppm in den <sup>1</sup>H-Werten zu erkennen. Zudem ist das Signal bei 0.8/12 ppm wesentlich intensiver als im Referenzspektrum der Zellen. Dies ist der Bereich der chemischen Verschiebung in dem die 18CH<sub>3</sub>-Gruppe des N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalins liegt. Je größer die Dauer zwischen Applikation und Probenentnahme ist, desto schwächer werden die Intensitäten der eben genannten Signale des N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalins. Jedoch ist die Zuordnung schwierig, da die Signale im Rauschen liegen und aufgrund der Vielzahl der endogenen Verbindungen nicht unbedingt charakteristisch sind. Aus diesem Grund lassen sich anhand der Signale keine eindeutigen Aussagen über die Bildung der Raumaclin-Typen machen. Um dies zu untersuchen, wurde neben der Probe für die NMR-Aufnahme zum gleichen

Zeitpunkt eine weitere entnommen, um sie zu einem späteren Zeitpunkt mit der HPLC zu analysieren. Die Zellen wurden zuvor jedoch vom Medium abgetrennt, mit MeOH versetzt und im Kühlschrank für die weitere Aufarbeitung aufbewahrt. Für die HPLC-Analyse (Bedingungen siehe II.5.2.4) wurden die Proben dann im Ultraschallbad für 20 min aufgeschlossen und die erhaltenen Extrakte zentrifugiert. Die HPLC-Chromatogramme gleichen denen der schon in III.2.3.1 beschriebenen Fütterungen. Es sind zwei Signale für die beiden Hauptprodukte  $N_{\beta}$ -Methyl-raumaclin bei  $\sim 26.4$  min und  $N_{\beta}$ -Methyl-iso-raumaclin bei  $\sim 24.3$  min zu erkennen sowie geringe Mengen des Substrates ( $R_t = \sim 18.4$  min) und des Nebenproduktes  $N_{\beta}$ -Methyl-ajmalin ( $R_t = \sim 20.3$  min).

## 2.4 Metabolismus von Perakin

Als letztes Anwendungsbeispiel für die *in vivo* NMR-Spektroskopie diene wiederum eine Sequenz eines Nebenweges der Ajmalin-Biosynthese. Mit Hilfe dieser *nicht-invasiven* Methode sollte die Umsetzung des Perakins untersucht werden, da vermutet wird, daß Perakin zu Raucaffrinolin reduziert wird. Ob und wie Raucaffrinolin anschließend von der *R. serpentina*-Zellkultur weiter umgesetzt wird, ist nicht bekannt.

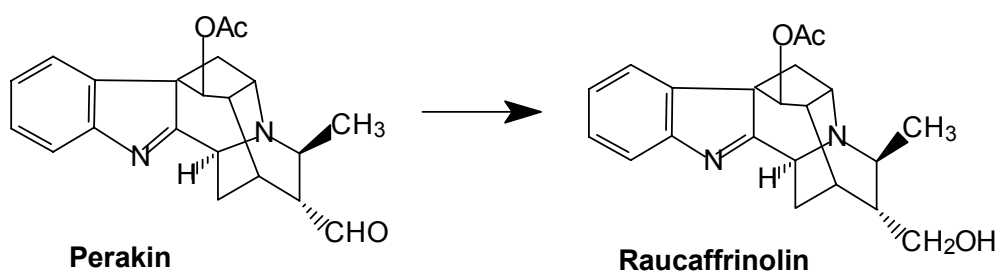


Abbildung 33: Vermutete Umsetzung von Perakin nach Fütterung zu *R. serpentina*-Zellkulturen

### 2.4.1 Biotransformationsversuche mit Perakin

Um zu untersuchen, wie die *RxR*-Hybridkultur Perakin umsetzt, wurden 5.4 mg Perakin in 1 ml 50 %igem MeOH gelöst und zu 15 ml einer fünf Tage alten *RxR*-Zellkultur gegeben, die, wie in II.1 und II.7 beschrieben, kultiviert wurde. Zum Vergleich wurde auch eine Kontrollkultur ohne Zusatz von Perakin angesetzt. Aus den Kulturen wurde jeweils 1 ml Zellsuspension 1, 24, 48 und 96 h nach Substratzugabe entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g) vom Nährmedium getrennt und in der gewohnten Weise aufgearbeitet (siehe II.7). Die erhaltenen Proben wurden unverdünnt mit Hilfe der HPLC (Bedingungen siehe II.5.2.4) analysiert. Perakin ist in der ersten Probe (entnommen 1 h nach Substratzugabe) sowohl im Medium als auch im Zellextrakt nachzuweisen. In den weiteren Proben ist das Entstehen eines Hauptproduktes mit einer Retentionszeit von ~ 12.5 min zu beobachten. Das Signal dieses Produktes ist in den Proben, entnommen 24 und 48 h nach Zugabe von Perakin, leicht verbreitert. In dem Chromatogramm der Probe, die 96 h nach Applikation entnommen wurde, ist das Signal schärfer. Dieses Hauptprodukt kann hauptsächlich in den Proben der Zellextrakte nachgewiesen werden. Des weiteren sind zwei bis drei kleine Signale mit ähnlicher Retentionszeit wie das Hauptprodukt zu detektieren, die in den Chromatogrammen der Vergleichsextrakte nicht vorhanden sind und in einem sehr geringen Verhältnis (im Vergleich 1:50) zum Hauptprodukt auftreten. Auf weitere Untersuchungen zur Identifizierung des Hauptproduktes wurde zunächst verzichtet. Statt dessen wurde versucht mit Hilfe der *in vivo* Spektroskopie weitere Hinweise zum Hauptprodukt zu erhalten.

### 2.4.2 *In vivo* Verfolgung der Metabolisierung des Perakins

Die Messungen zur Metabolisierung des Perakins fanden ebenfalls in Fällanden (Schweiz) bei der Bruker BioSpin AG statt und wurden mit einem 500 MHz Gerät, ausgestattet mit einem 5 mm  $^1\text{H} \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Z-Grad CryoProbe<sup>TM</sup> Probenkopf, aufgezeichnet. Es wurde das Pulsprogramm "invietgpcisp" mit den in Tabelle 11 dargestellten Parametern verwendet.

**Tabelle 11: NMR-Parameter der *in vivo* Verfolgung der Perakin-Metabolisierung in *RxR*-Zellkulturen**

|                   |             |
|-------------------|-------------|
| Linear Prediction | 128         |
| Scans             | 16          |
| Dummy Scans       | 16          |
| Acquisitiontime   | 0.1463486 s |
| Relaxation delay  | 1 s         |
| Gradient ratio    | 80:20.1     |
| Recycle time      | 1.1463486 s |

Zur Entnahme der Proben wurden zwei Fütterungsansätze vorbereitet. Es wurden 12.3 mg Perakin in 1.5 ml einer Mischung aus MeOD-d<sub>4</sub> und D<sub>2</sub>O (1:1) gelöst und zu 15 ml einer sechs Tage alten *RxR*-Zellkultur gegeben, so daß eine Startkonzentration von 2.3 mM erreicht wurde. Aus dem ersten Ansatz wurde 72 und 96 h nach Substratzugabe eine Probe entnommen und vermessen. Aus dem zweiten Ansatz wurde jeweils eine Probe nach 3 und 30 h entnommen. Abbildung 34A zeigt das Spektrum der Probe, die 3 h nach Zugabe von Perakin entnommen wurde. Es sind vier Signale im Aromatenbereich bei 7.25/127 (P 10), 7.39/130 (P 11), 7.52/124 (P 9) und 7.53/121 ppm (P 12) zu erkennen, die mit Hilfe eines Referenzspektrums dem Substrat zugeordnet werden können. Die chemischen Verschiebungen sind denen des Vinorins und Vomilenins sehr ähnlich, da die Alkaloide das gleiche Grundgerüst aufweisen und sich nur in den Seitenketten bzw. Substituenten an den Kohlenstoffen 20 und 21 unterscheiden.

Analysiert man jedoch das Hintergrundrauschen des ersten Spektrums genauer, so sind vier weitere Signale zu erkennen (siehe Abbildung 34B). In den anderen drei Spektren haben diese vier neuen Signale bei 7.05/120, 7.13/123, 7.38/112 und 7.45/119 ppm an Intensität stark zugenommen (siehe Abbildung 34). Im Gegensatz dazu sind die Signale des Perakins nicht mehr zu detektieren. Durch die starke Veränderung der chemischen Verschiebung der Signale im Bereich von 6 - 8 ppm bzw. 100 - 135 ppm kann die Bildung des Raucaffrinolins als Hauptprodukt ausgeschlossen werden. Dieses müßte die gleichen oder zumindest sehr ähnliche chemische Verschiebungen für die aromatischen Kohlenstoffe und Protonen aufweisen wie Perakin. Vergleicht

man die ppm-Werte der neu entstandenen Signale mit denen der gemessenen Alkaloiden aus den vorher durchgeführten Versuchen (siehe III.2.1.2 und III.2.2.2), so weisen diese vier neuen Crosspeaks auf die Bildung eines unsubstituierten Sarpagan-Alkaloids hin (vergleiche II.2.1 und II.2.2).

Die aliphatische Region ist auch in diesem Versuch nicht auswertbar. Nach einem bereits vorhandenen Referenzspektrum des Perakins liegen alle Signale in dem Bereich, in dem auch die Signale des Zellhintergrunds sehr stark sind. Lediglich ein Signal bei 1.3/48 ppm müßte separiert in einem Bereich ohne weitere Crosspeaks liegen. Jedoch ist bei diesen Werten im *in vivo* Spektrum der ersten Proben (entnommen 3 h nach Zugabe des Perakins) kein Signal zu detektieren, lediglich eines bei 1.0/58 ppm. Doch hier stimmen weder der  $^1\text{H}$ - noch der  $^{13}\text{C}$ -Wert mit den Werten aus dem Referenzspektrum überein. Hinzu kommt, daß das erhaltene Produkt zunächst unbekannt war. Zwar kann aus den *in vivo* NMR-Spektren der Alkaloid-Typ des Produktes bestimmt werden, jedoch die genaue Struktur des Produktes kann mit der *in vivo* Spektroskopie unter den bisher verwendeten Bedingungen nicht aufgeklärt werden.

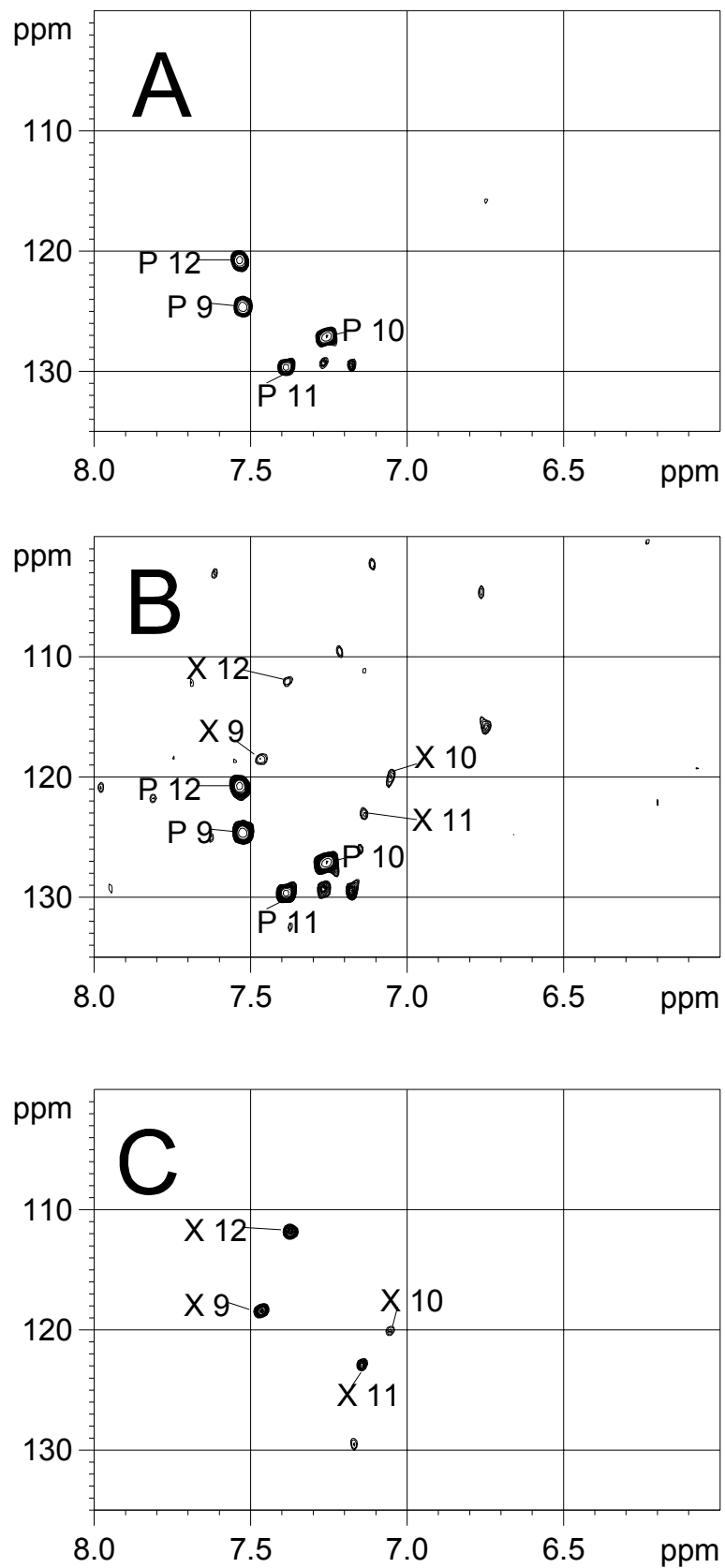


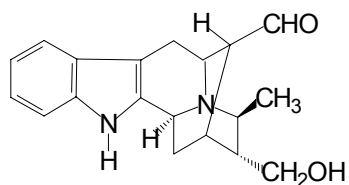
Abbildung 34: 2D *in vivo* Spektren einer RxR-Zellkultur nach Applikation von Perakin

Die Spektren wurden **A** und **B**: 3 h und **C**: 30 h nach Zugabe von Perakin mit 16 Scans (Meßzeit 40 min) an einem 500 CryoProbe<sup>TM</sup> Spektrometer aufgenommen. Die Abkürzungen P 9, P 10, P 11, P 12 bezeichnen die C-H-Signale der entsprechend numerierten Kohlenstoffatome des Perakins; die Abkürzungen X 9, X 10, X 11, X 12 die des unbekanntes Metaboliten (siehe Abbildung 35).

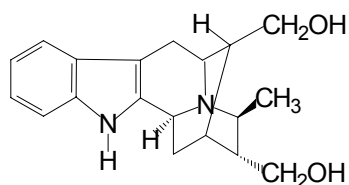
Um die Struktur dieses neuen Produktes genauer zu untersuchen, wurde neben der Probe für die NMR-Aufnahme gleichzeitig eine weitere entnommen, um sie zu einem späteren Zeitpunkt mittels der HPLC zu untersuchen. Die Zellen wurden vom Medium getrennt, mit MeOH versetzt und im Kühlschrank für die weitere Aufarbeitung aufbewahrt. Für die HPLC-Analyse wurden sie im Ultraschallbad für 20 min aufgeschlossen und die erhaltenen Extrakte zentrifugiert (Bedingungen siehe II.5.2.4). Die HPLC-Chromatogramme zeigen das Erscheinen eines Signals bei ~ 12.5 min. In der 30 h nach Substratzugabe entnommenen Probe ist das Signal verbreitert, während es in den späteren Proben (entnommen 72 und 96 h nach Perakin-Zugabe) schärfer ist. Um das Hauptprodukt zu isolieren und zu identifizieren, wurde der erste Fütterungsansatz benutzt. Dafür wurden die Zellen vom Nährmedium abgetrennt, mit MeOH extrahiert und der erhaltene Extrakt dünn-schichtchromatographisch analysiert. Es wurde eine Bande erhalten, die sich nach Besprühen mit SR 1 (siehe II.5.1) grau färbt. Dieses Produkt wurde mit Hilfe einer präparativen DC (FM 6, siehe II.5.1) isoliert und HPLC-analytisch, massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch untersucht. Durch einen Vergleich mit vorhandenen Daten [142] konnte das Hauptprodukt als 19(S),20(R)-Dihydroperaksin identifiziert werden. Aus Wurzelkulturen von *Rauvolfia serpentina* wurden bisher drei Verbindungen dieses Alkaloid-Typs 19(S),20(R)-Dihydro-peraksin-17-al, 19(S),20(R)-Dihydroperaksin und 10-Hydroxy-Derivat des 19(S),20(R)-Dihydroperaksin isoliert (siehe Abbildung 35). Da Raucaffrinolin, 19(S),20(R)-Dihydroperaksin-17-al, 19(S),20(R)-Dihydroperaksin und 10-Hydroxy-19(S),20(R)-dihydroperaksin als Referenzsubstanzen rein vorhanden waren, zeigte sich, daß die drei zuerst genannten Verbindungen mit dem verwendeten HPLC-Gradienten sehr ähnliche Retentionszeiten haben, deshalb konnte die Bildung der beiden möglichen Zwischenprodukte nicht verfolgt werden. 10-Hydroxy-19(S),20(R)-dihydro-



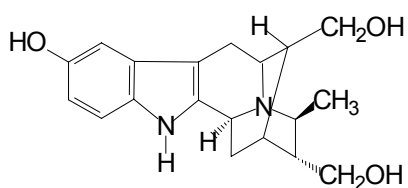
peraksin hat durch die polare Hydroxylgruppe eine wesentliche kürzere Retentionszeit. Die Bildung dieses Produktes konnte nicht nachgewiesen werden.



19(S),20(R)-Dihydroperaksin-17-al



19(S),20(R)-Dihydroperaksin



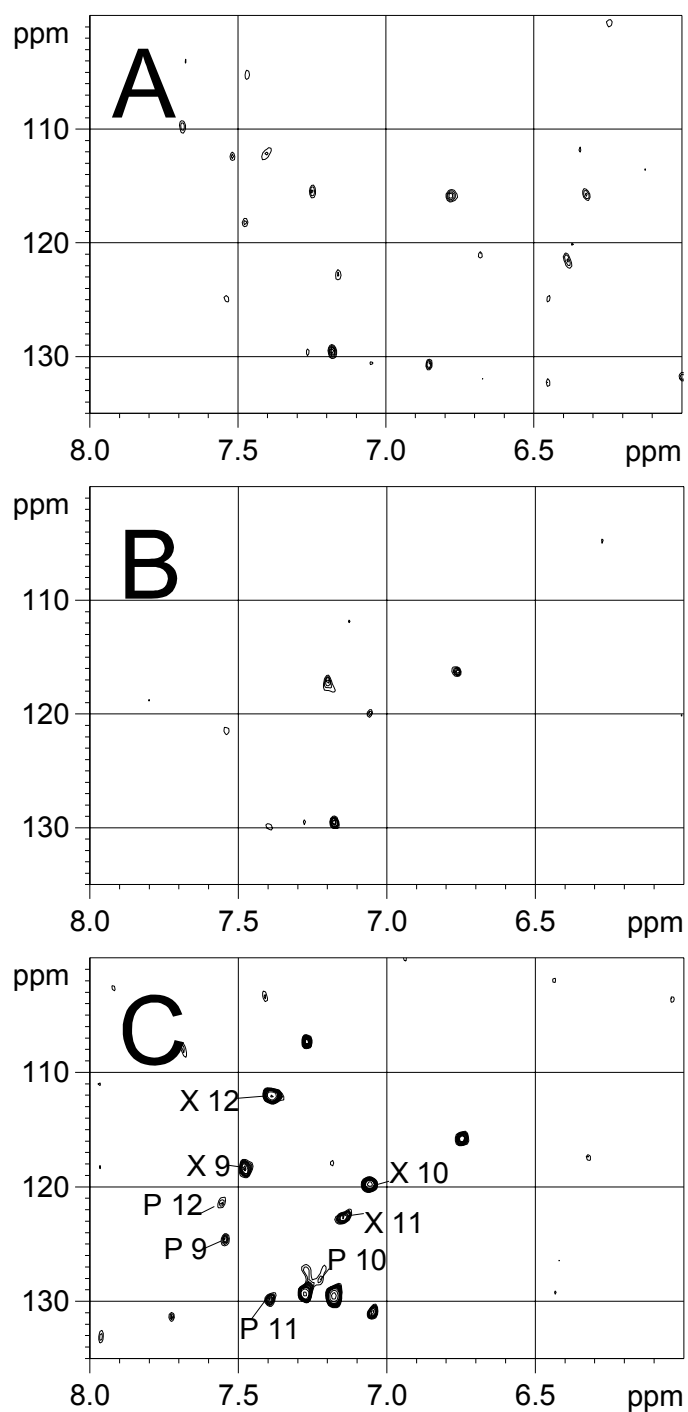
10-Hydroxy-19(S),20(R)-dihydroperaksin

**Abbildung 35: Aus Wurzelkulturen von *Rauvolfia serpentina* isolierte Alkaloide des Sarpagin-Typs**

### 2.4.3 Bestimmung der *in vivo* Nachweisgrenze für Perakin

Um einen genauen Anhaltspunkt zu haben, bei welcher Konzentration die Nachweisgrenze bei der *in vivo* NMR-Spektroskopie für ein Alkaloid liegt, wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt, in dem nur ein zehntel der zuvor zugefügten Menge als Präkursor eingesetzt wurde. Zu 15 ml einer sieben Tage alten *RxR*-Zellkultur wurden 2.37 mg Perakin gegeben (gelöst in 210  $\mu$ l eines 1:1 Gemisches von  $D_2O$  und  $MeOD-d_4$ ), so daß eine Startkonzentration von 380  $\mu$ M erreicht wurde. Ungefähr 6 h nach Zugabe des Substrates wurde eine Probe entnommen und mit einer unterschiedlichen Anzahl von Scans (16, 32 und 128) vermessen. In den beiden ersten Spektren, die mit 16 und 32 Scans aufgezeichnet wurden (siehe Abbildung 36A und B), sind keine Zuordnungen möglich. Im Spektrum, welches mit 128 Scans aufgenommen wurde, sind acht Signale, die zwei Verbindungen zugeordnet werden können (siehe Abbildung 36C und Abbildung 34), zu detektieren.

Die Meßbedingungen waren mit den unter III.2.4.2 beschriebenen identisch.



**Abbildung 36:** *In vivo* NMR-Spektren einer *RxR*-Kultur nach Zugabe von Perakin

Die Spektren wurden mit einer unterschiedlichen Anzahl von Scans an einem 500 MHz CryoProbe™-Spektrometer aufgenommen. **A:** 16 Scans, **B:** 32 Scans und **C:** 128 Scans. Die Abkürzungen P 9, P 10, P 11, P 12 bezeichnen die C-H-Signale der entsprechend nummerierten Kohlenstoffatome des Perakins; die Abkürzungen X 9, X 10, X 11, X 12 die des unbekannteten Metaboliten (siehe Abbildung 35).

---

## IV DISKUSSION

### 1 Biotransformation von Isatin-3-oxim in *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen

#### 1.1 Biotransformationsversuche mit Isatin-3-oxim

Pflanzliche Zellkulturen sind in der Lage Biotransformationen mit den unterschiedlichsten chemischen Verbindungen durchzuführen (siehe 1.2). Die Bildung von alkoholischen und vor allem phenolischen Glucosiden ist eine Form der Biotransformation, die in Zellkulturen vieler Pflanzengattungen beobachtet und mit einem breiten Spektrum an zugefügten Substanzen untersucht wurde. Die Glucosylierung dieser Substanzen kann als Entgiftungsreaktion interpretiert werden. Die zugeführten Verbindungen werden wasserlöslicher und können besser in der Vakuole der Pflanzenzelle gespeichert werden, da sie aufgrund ihrer höheren Polarität die Membran weniger gut passieren können [143]. Die Zellkulturen von *R. serpentina* zeichnen sich durch ein hohes Glucosylierungspotential aus. Es sind mehrere Beispiele für die Glucosylierung von phenolischen Substraten durch diese Zellkultur beschrieben worden [35, 38, 108].

Interessant war es, der Frage nachzugehen, ob auch andere Hydroxylgruppen, z.B. die OH-Gruppe einer Oxim-Gruppierung, von dieser Zellkultur glucosyliert werden kann, da zuvor war noch kein derartiges Beispiel bekannt war. Es wurden Fütterungsexperimente mit Isatin-3-oxim durchgeführt. Dieses Molekül bot sich aufgrund der chemischen Verschiebungen der Signale in der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, im Bereich von 6 - 8 ppm bzw. 100 - 135 ppm, besonders an. Denn falls die Zellkultur das Substrat glucosyliert, war das nächste Ziel der Arbeit, diese Biotransformation mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie zu verfolgen. In dem oben ausgegebenen Bereich der chemischen Verschiebungen sind so gut wie keine Hintergrundsignale der Zellkultur von Zuckern und Aminosäuren vorhanden. Zudem wird

diese Region auch nicht durch das Wassersignal beeinträchtigt [122], da NMR-Messungen von lebenden Systemen im wäßrigen Milieu durchgeführt werden müssen.

Das von den Zellkulturen bei den Fütterungsversuchen gebildete Produkt, wurde als  $\beta$ -Glucosid des Isatin-3-oxims identifiziert. Zur Identifizierung diente die Inkubation mit  $\beta$ -Glucosidase, die das Produkt wieder zu Isatin-3-oxim und Glucose umsetzte. Des weiteren konnte das Produkt im Milligramm-Maßstab isoliert werden, so daß die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums möglich war. Die erhaltenen Spektren zeigen die typischen Signale für Glucoside in den Bereichen von 3 - 5.5 ppm bzw. 60 - 110 ppm. Besonders charakteristisch ist die Verschiebung des anomeren Kohlenstoffs bzw. des dazugehörigen Protons bei 107/5.4 ppm. Durch die Glucosylierung kommt es zu einer Tieffeldverschiebung der Signale im Vergleich zur freien Glucose. Aufgrund der ppm Werte kann die Bildung eines  $\beta$ -Glucosids angenommen werden, das C-H1' Signal eines  $\beta$ -Glucosids wird aufgrund des anomeren Effektes zu tieferem Feld verschoben als das eines  $\alpha$ -Glucosids. Untermuert wird diese Vermutung durch die Kopplungskonstante  $J_{\text{H-1}'/\text{H-2}'}$  von 7.3 Hz. Diese Größe ist typisch für  $\beta$ -Glucoside. Die beiden koppelnden Protonen stehen axial/axial zueinander. Daraus ergibt sich aufgrund der Karplus-Beziehung eine größere Kopplungskonstante als bei  $\alpha$ -Glucosiden. Hier ist die Kopplung wegen der axial/equatorial Stellung der Protonen H1' und H2' und dem daraus resultierenden kleineren Diederwinkel geringer und liegt im Bereich von nur 3 - 4 Hz [123].

Die Fähigkeit von *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen zur Glucosylierung von phenolischen Substraten war im Prinzip bekannt. Es stellte sich jedoch die Frage, ob der Glucosetransfer auf das Oxim durch dieselbe Glucosyltransferase katalysiert wird, die Arbutin aus Hydrochinon bildet, oder einer anderen Transferase. Inkubationen von Isatin-3-oxim mit UDP-Glucose und der Arbutinsynthese ergaben eine relative Enzymaktivität von 0.3 % [144]. Da die Umsatzrate gering ist, könnten weitere Enzymtests mit unterschiedlichen Zellfragmenten durchgeführt werden, um zu sehen, ob es möglich ist eine höhere Aktivität zu erreichen. Bei positivem Ergebnis könnte dies ein Hinweis

auf das Bestehen einer weiteren, für das Oxim spezifischeren Glucosyltransferase sein.

## 1.2 Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie zur Beobachtung der Biotransformation des Isatin-3-oxims

Nachdem die Fütterung von Isatin-3-oxim zu *R. serpentina* Zellkulturen zur Glucosylierung des Substrates führte, sollte die Biotransformation des Oxims auch *nicht-invasiv* mit der invers korrelierten *in vivo* NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Die NMR-Spektroskopie bietet seit ihrem Bestehen eine hervorragende Möglichkeit zur Identifizierung und Charakterisierung von chemischen Verbindungen. Auch in der Untersuchung biogener Prozesse in bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Zellkulturen ist sie von großem Nutzen. Eine Möglichkeit zur Analyse von Metabolismen besteht darin, parallel wachsende Zellkulturen zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation von markierten aber auch unmarkierten Vorstufen zu extrahieren und die Extrakte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu analysieren. Diese Methode spielt heute noch in der Aufklärung des Primärstoffwechsels eine große Rolle. Durch Applikation und Inkubation von markierten Grundbausteinen des Stoffwechsels, wie z.B.  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose,  $^{13}\text{C}$ -Ribose,  $^{13}\text{C}$ -Pyruvat,  $^{13}\text{C}$ -Glycerol oder anderer geeigneter Intermediate zu Wurzel- oder Zellkulturen, können Rückschlüsse auf einzelne Biosynthesewege und sogar das Zusammenspiel und die Regulierung des gesamten Stoffwechsel gezogen werden, in dem nach der anschließenden Isolierung von den Produkten, wie z.B. Aminosäuren, Kohlenhydraten, Sekundärstoffwechselprodukten etc., mit Hilfe der quantitativen NMR-Spektroskopie die Einbau-raten markierter Kohlenstoffe in den jeweiligen Produkten bestimmt werden [50, 145-147]. Die Spektren, die mit *invasiven* Methoden erhalten wurden, müssen aber nicht zwingend die *in vivo* Situation widerspiegeln. Es besteht bei Aufarbeitung und Extraktion immer die Gefahr, daß der Metabolit sich teilweise oder vollständig chemisch verändert. Somit kann das Produkt, wenn überhaupt, nur mit einer geringeren Konzentration nachgewiesen werden. Eine Alternative zur Beobachtung und Aufklärung biogener Prozesse bietet die *in vivo* NMR-Spektroskopie. Zur Beobachtung des Primärstoffwechsels

bietet sich die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie an, da viele Moleküle des Primärstoffwechsels oft gebundene Phosphat-Gruppen enthalten und  $^{31}\text{P}$  das ausschließlich natürlich vorkommende Isotop ist (siehe auch I.4). Aufgrund der intrinsischen Empfindlichkeit ist es deshalb möglich phosphorhaltige Metabolite in wenigen Minuten zu messen

Auch die Protonenspektroskopie zeichnet sich aufgrund der natürlichen Häufigkeit von  $^1\text{H}$  (99.98%) und einer hohen gyromagnetischen Konstante (42.6 MHz/T) durch eine enorm hohe Empfindlichkeit aus. Die Analyse der  $^1\text{H}$ -Spektren von lebenden Zellen ist jedoch erschwert, da diese häufig eine Fülle verschiedener Signale enthalten, welche aufgrund von Überlagerungen nur schwierig oder gar nicht auswertbar sind. Da die Messungen meist im wässrigen Medium stattfinden, bedarf es zudem einer effektiven Wasserunterdrückung (siehe I.4).

Zur Beobachtung pflanzlicher Prozesse, insbesondere denen des Sekundärstoffwechsels, bieten sich vor allem die  $^{13}\text{C}$ - und auch die  $^{15}\text{N}$ -Spektroskopie an. Sie sind aufgrund der natürlichen Häufigkeit der Isotope von 1.1 % bzw. 0.37 % und den geringeren gyromagnetischen Konstanten wesentlich unempfindlicher als die beiden vorher beschriebenen Methoden. Deswegen erfolgte zunächst die *in vivo* Anwendung nur in Kombination mit markierten Präkursoren [96, 97, 105]. Mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie gelangen aber im Zuge der Weiterentwicklung der Methode auch *in vivo* Messungen an unmarkierten Substanzen, wenn diese sich durch hohe Akkumulations- und Transformationsraten auszeichneten [106-108, 112]. Jedoch lagen z.B. bei der Beobachtung des Vanillinstoffwechsels die Meßzeiten an einem 400 MHz Spektrometer bei einer Startkonzentrationen des Vanillins von 8.2 mM noch bei über 2 h, um die Biotransformationsprodukte identifizieren zu können [111].

Als gute Lösung des Empfindlichkeitsproblems erwies sich die invers korrelierte NMR-Spektroskopie. Sie bringt einen theoretischen Empfindlichkeitsgewinn von einem Faktor 32 im Vergleich zur  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie und einen Faktor 8 im Vergleich zur herkömmlichen 2D Spektroskopie [110]. Zudem bietet sie die Möglichkeit aufgrund der Zweidimensionalität auch Signale zu unterscheiden, die in einer Dimension nicht voneinander aufgelöst vorliegen. Bei der Beobachtung der Biotransformation von p-Methoxyphenol

und Vanillin an einem 600 MHz Instrument reichten Startkonzentration von 6 mM und Meßzeiten von 20 - 40 min aus, um ausreichende Informationen über die Biotransformationsprozesse zu erhalten [112].

Ein Ziel dieser Arbeit war die Beobachtung von Biotransformationen ausgesuchter Substrate mit Hilfe der invers korrelierten *in vivo* NMR-Spektroskopie bei Einsatz höchst zugänglicher Magnetfelder wie z.B. einem 800 MHz Spektrometer (18.8 T).

Es zeigte sich, daß es möglich war, mit dieser Methode an einem 800 MHz Gerät *in vivo* Messungen durchzuführen und auch die Metabolisierung der Substrate zu beobachten. In den Protonenspektren wird bei dieser Feldstärke der Zellhintergrund im aromatischen Bereich sichtbar. Bei der eingesetzten Startkonzentration von über 5 mM konnte aber auch hier die Metabolisierung noch beobachtet werden, da sich die Signale des Isatinoxims und des Isatinoxim- $\beta$ -glucosid wenig mit den endogenen Signalen überlagerten, was bei dem Entstehen von mehreren Produkten schwierig bis unmöglich sein wird.

In den HSQC-Spektren sind jedoch keine endogenen Signale im Bereich von 9.0 - 5.5 ppm bzw. 135 - 100 ppm sichtbar, die das Verfolgen der Biotransformation erschweren. Vermutlich liegt die Konzentration aller endogenen aromatischen Inhaltsstoffe unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode. Es gelang, die Biotransformation des Isatin-3-oxims anhand der Änderung der vier aromatischen Signale zu verfolgen. Zudem war das Erscheinen des anomeren C-H-Signals ein weiterer Beweis für die Umsetzung zu einem Glucosid. Es reichten Meßzeiten von 19 min aus, um Spektren mit einem guten S/N Verhältnis zu erhalten.



## 2 Biotransformation von Isatin in *Rauvolfia serpentina*-Zellsuspensionskulturen

### 2.1 Biotransformationsversuche mit Isatin

Das Indolderivat Isatin spielt in vielen Organismen unterschiedliche Rollen und zeigt eine Vielzahl von pharmakologischen Aktivitäten. Der Abbau sowie die toxikologischen und pharmakologischen Wirkungen dieser Verbindung werden intensiv untersucht [135].

In der Flora wird es in der Pflanzengattung *Isatis* [148], in *Calanthe discolor* LINDL. [149] und in *Couroupita guianensis* Aubl. [150] gefunden, in der Tierwelt zudem als eine Komponente des Sekrets des Bufo Frosches [151].

Substituierte Isatine kommen in einer Vielzahl von Pflanzen und auch Pilzen vor, z.B. als Melossatin-Alkaloide (Methoxy-phenylpentyl-isatine) in *Melochia tomentosa* [152], [153] oder als 6-(3'-Methylbuten-2'-yl)-isatin in *Streptomyces albus* [154]. Im menschlichen Organismus ist Isatin ein metabolischer Abkömmling des Adrenalins [155], [156].

Aufgrund der Bedeutung des Indolderivats, sollte die Metabolisierung von Isatin in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* beobachtet werden.

Zunächst wurden mögliche Abbauewege postuliert. Nach den vorhandenen Ergebnissen, der schon durchgeführten Fütterungsversuchen mit anderen Substraten in *R. serpentina* Zellen war anzunehmen, daß eine der beiden vorhandenen Carbonylgruppen reduziert, anschließend glucosyliert und das entstandene  $\beta$ -Glucosid schließlich zu einem Primverosid umgesetzt wird. Eine analoge Reaktionsfolge wurde z.B. bei Applikation von Vanillin gefunden [111].

Ein mögliches Produkt, das 3-Hydroxy-2-oxoindol (Dioxindol), wurde z.B. beim Menschen als Abbauprodukt des Isatins gefunden. Enzymtests mit einer Carbonylreduktase der menschlichen Leber und Niere, dem Cofaktor NADPH und Isatin führten zu Bildung des Dioxindols [135]. Unter anderem wird es vermutlich auch beim Abbau von Indol durch Bakterien gebildet [157]. Zudem

ist Dioxindol auch als Intermediat in der Naturstoffsynthese von DIMBOA bekannt [158].

Aufgrund dieser Ergebnisse lag die Vermutung nahe, daß auch in Pflanzenzellen die Reduktion an der 3-Carbonylfunktion stattfindet.

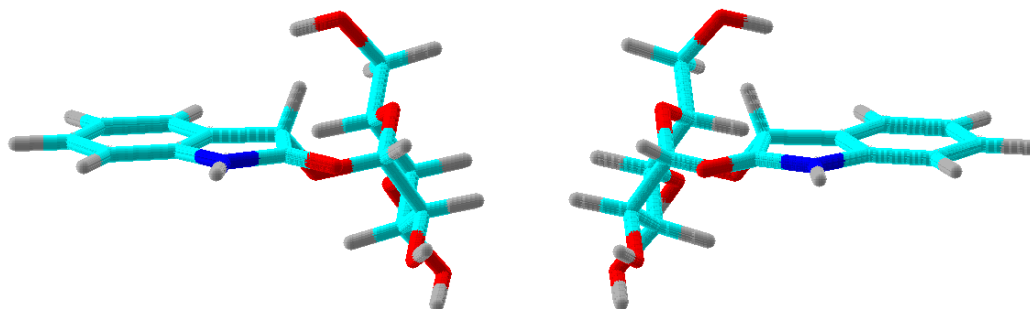
Die bei den Fütterungsversuchen mit Isatin gebildeten Produkte wurden als die vermuteten identifiziert. Das Vorliegen des Reduktionsproduktes Dioxindol konnte schon durch das Entfärben der Zellkultur beobachtet werden. Die starke Orangefärbung der Kultur, die durch das Isatin verursacht wurde, verschwand je nach Startkonzentration des Substrates innerhalb von 10 - 30 Minuten, wenn Isatin gelöst und unterhalb der toxischen Konzentration von 1 g/l lag (siehe II.1.2). Mit Hilfe von HPLC-Analysen und Coinjektion von synthetischem Dioxindol konnte das erste Produkt als 3-Hydroxy-2-oxoindol (Dioxindol) identifiziert werden. Das Entstehen beider Stellungsisomere kann aufgrund der HPLC-Ergebnisse ausgeschlossen werden, da die HPLC-Chromatogramme nur ein Signal für das erste Produkt zeigen. Weil die Trennung von Stellungsisomeren auf jeden Fall möglich ist, wurde, um eine Überlappung der Produktsignale auszuschließen, die HPLC-Analyse mit zwei weiteren Gradienten wiederholt. Auch in diesen Chromatogrammen ist jeweils nur ein Signal für Dioxindol vorhanden. Das erhaltene MS-Spektrum des Reduktionsproduktes zeigt die gleichen m/z-Werte wie das Spektrum von synthetischem Dioxindol und vorhandene Literaturdaten dieser Verbindung [135].

Des weiteren zeigten die HPLC-Untersuchungen, daß das Substrat Isatin nur im Medium und nicht in den Extrakten der Zellgewebe zu detektieren ist. Die Konzentration des gebildeten Dioxindols ist in den als erstes entnommenen Proben der Nährmedien hoch und nimmt mit fortschreitender Zeit ab, während sie in den Zellextrakten zunimmt. Von den Zellen aufgenommen, wird Dioxindol dann weiter zum Glucosid umgesetzt. Ein ähnlicher Reaktionsverlauf wurde auch bei der Applikation von Vanillin zu *R. serpentina* Zellkulturen gefunden. Vanillylalkohol wurde sowohl extra- als auch intrazellulär detektiert, während das Glucosid nur in den Zellextrakten nachgewiesen wurde. Enzymtests mit unterschiedlichen Zellfragmenten konnten eine Reduktasetätigkeit sowohl in der Zellwand als auch in den Protoplasten

nachweisen. Zudem ergaben die Tests, daß das lösliche Enzym nicht aus der Zelle sezerniert wird [111].

Auch die Reduktion des Isatins könnte durch ein analoges Enzymsystem katalysiert sein. Um jedoch weitere Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reduktion des Isatins zu ziehen, müßte dieser Reaktionsschritt durch Enzymtests mit unterschiedlichen Zellfragmenten und unterschiedlichen Cofaktoren weiter untersucht werden. Die zunächst hohe Konzentration von Dioxindol im Medium und das anschließende Ansteigen der Konzentration im Zellinneren spricht für die Lokalisation auf der Außenseite der Zellmembran, d.h. zunächst Reduktion dann Aufnahme, ansonsten wäre die Konzentration des Dioxindols außen zu keinem Zeitpunkt höher als innen.

Die Umsetzung des Alkohols zu wahrscheinlich zwei  $\beta$ -Glucosiden konnte zum einen durch Inkubation mit einer  $\beta$ -Glucosidase unter Spaltung in Dioxindol und Glucose bestätigt werden. Da beide Produkte in einem gleichen Verhältnis durch die  $\beta$ -Glucosidase abgebaut werden, spricht dies für zwei Glucoside. Zum anderen dienten MS- und NMR-Spektren zur Identifizierung der Substanzen. Die NMR-Spektren bestätigen die  $\beta$ -glucosidische Bindung beider Produkte, da die Kopplungskonstanten  $J_{H-1/H-2}$  für beide Verbindungen über 7 Hz betragen [123]. Anhand der chemischen  $^1H$ - und  $^{13}C$ -Verschiebungen kann das Hauptprodukt eindeutig als Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid identifiziert werden. Die Identifizierung des Nebenproduktes war nicht ganz eindeutig. Zwar können unter Berücksichtigung der prochiralen Carbonylgruppen bei der Reduktion des Isatins theoretisch zwei Enantiomere entstehen, die weiter zu Glucosiden umgesetzt werden können, jedoch sind diese NMR-spektroskopisch und mit den angewandten chromatographischen Bedingungen nicht zu unterscheiden. Die zwei in Frage kommenden Enantiomere zeigt Abbildung 37:



**Abbildung 37: Mögliche Enantiomere des Dioxindolglucosids**

Deswegen kommen für das Entstehen des Produktgemisches nur zwei Möglichkeiten in Betracht. Es könnte zum einen sein, daß es sich um zwei unterschiedliche Glykoside handelt und neben Glucose noch ein anderer Zucker mit einer unterschiedlichen Konfiguration an den Kohlenstoffen C3' oder C4' auf Dioxindol übertragen wurde. Dagegen spricht jedoch, daß beide Produkte von einer  $\beta$ -Glucosidase in einem gleichen Verhältnis abgebaut wurden. Die chemischen Verschiebungen der Protonen H3, H1', H6' $\alpha$  und H6' $\beta$  des Nebenproduktes sind gegenüber den Protonen des Dioxindol- $\beta$ -glucosid bis zu 0.1 ppm tieffeldverschoben. Die  $^{13}\text{C}$ -Werte des C3, C1' und C6' beider Produkte sind jedoch identisch. Wenn es sich um zwei unterschiedliche Zuckerreste handeln würde, müßte man eigentlich auch eine Abweichung der chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Werten erwarten. Eine zweite Möglichkeit zur Erklärung des Auftretens zweier Stereomere könnte das Entstehen zweier Rotationsisomere sein. Aufgrund sterischer Wechselwirkungen könnten die Rotationen der C3-O-C1'-Bindungen eingeschränkt sein, so daß zwei Verbindungen mit einer energetisch günstigen Orientierungen des Glucoserestes entstehen. Um dies zu überprüfen, müßten HPLC-Läufe bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt oder ein temperaturabhängiges NMR gemessen werden. Falls bei höheren Temperaturen nur noch ein Produkt nachweisbar ist, kann diese Vermutung als bestätigt gelten.

Das isolierte Primverosid konnte mittels DC und zweidimensionaler NMR identifiziert werden. Auch hier konnten zwei Stereomere nachgewiesen werden.

## 2.2 Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie zur Beobachtung der Biotransformation des Isatins

Da die Reaktion von Isatin zu Dioxindol-6-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranosid in mehreren Stufen abläuft, war sie als weiteres Beispiel für die Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie von Nutzen. Die Beobachtung des ersten Schrittes gelang mit der invers korrelierten NMR-Methode nicht. Die Einstellung des Gerätes für die jeweilige Messung erforderte mindestens 30 min. Fand die Fütterung von Isatin im Erlenmeyerkolben statt und wurde direkt nach der Fütterung und vollständigem Durchmischen eine Probe entnommen, war bis zum Beginn der Messung die Reaktion schon nahezu abgeschlossen, so daß nur noch Dioxindol im 2D Spektrum detektiert werden konnte. Da sich aber beide Verbindungen in den chemischen Verschiebungen von zwei aromatischen Protonen stark unterscheiden, konnte die Reaktion mit Hilfe der eindimensionalen Protonenspektroskopie nachvollzogen werden. Durch Fütterung einer Isatinlösung (Startkonzentration ca. 4 mM) zu *R. serpentina*-Zellen konnte die Reduktion trotz vorhandener endogener Signale recht einfach beobachtet werden. Durch die Reduktion der Carbonylgruppe kommt es zu einer Hochfeldverschiebung der Signale 4 und 6. Die nicht vollständige Umsetzung des Isatins ist vor allem aufgrund des fehlenden Durchmischens der Suspension zurückzuführen. Durch die kurze Meßzeit von nur 2 min pro Messung stellt jede Messung einen stark eingegrenzten Zeitpunkt des Metabolismus dar. Durch die Aufnahme von sechs Spektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte die Ab- und Zunahme der einzelnen Signale gut verfolgt werden.

Es wäre wahrscheinlich auch möglich gewesen, diesen Schritt mit Hilfe der 2D NMR-Methode zu beobachten, falls die Fütterung im NMR-Röhrchen stattgefunden hätte, da aufgrund der ungleichen Konzentration des Substrates, die Reaktion in Teilregionen der Zellansammlung langsamer verläuft. Jedoch hätten wahrscheinlich nur maximal zwei Spektren aufgenommen werden können in denen Isatin noch hätte detektiert werden können. Eine Meßzeit von 20 min stellt bei dieser schnellen Reaktion eine so große Zeitspanne dar, daß diese nicht mehr als Zeitpunkt bzw. Moment-

aufnahme angesehen werden kann. Dies ist nur möglich, wenn die Meßzeit Größenordnungen unterhalb der Reaktionszeit liegt.

Aufgrund der begrenzten Meßzeit und des erfolgreichen Verfolgens der Reaktion mit Hilfe der Protonenspektroskopie konnte auf einer Wiederholung des Versuchs mit der 2D Methode verzichtet werden.

Die sich der Reduktion anschließende Glucosylierung wurde dagegen mit der invers korrelierten NMR-Spektroskopie untersucht. Vier Scans in 20 min reichten aus, um die Verschiebung der vier aromatischen Signale und der aliphatischen C-H<sub>3</sub>-Signale sowie das Entstehen der anomeren C-H-Signale beobachten zu können.

Die Primverosidbildung konnte mit der *in vivo* Spektroskopie nicht beobachtet werden. Dies liegt vermutlich daran, daß die Zellen durch den Transport nach Florenz einem extremen Streß ausgesetzt waren. Auch die Bildung der anderen Produkte brauchte unter diesen Bedingungen länger. Da die Meßzeit nicht unbegrenzt war, mußte auf die weitere Verfolgung aus Zeitgründen verzichtet werden.

### 3 Metabolismus von Vellostimol und Vellostimin

Einer der hypothetischen Seitenwege der Ajmalin-Biosynthese war die Bildung des Vellostimins aus Epi-Vellostimin, gefolgt von einer Reduktion zu Vellostimol und einer abschließenden Hydroxylierung zu Sarpagin. Applikation von Vellostimol und Vellostimin zu einer *Rauvolfia serpentina* (T 30)-Zellsuspensionskultur führten zur Bildung von Sarpagin. Die Identifizierung des Endproduktes erfolgte über HPLC und DC-Analysen mit anschließender MS-Auswertung und bestätigte die damals nur postulierte Umsetzung. Nach Fütterung der Zellkultur mit Vellostimin ließ sich Vellostimol sowohl extra- als auch intrazellulär mit Hilfe der HPLC nachweisen, während Vellostimin nur im Nährmedium und Sarpagin nur in den Zellextrakten nachweisbar war. Diese enzymatische Reduktion zeigt Parallelen zu den Reduktionen der beiden exogenen Substanzen Isatin und Vanillin. Auch könnte hier die Reduktion sowohl durch eine zellwandgebundene als auch durch eine cytosolische Reduktase katalysiert sein (vergleiche IV.2.1). Jedoch ist unklar, ob die

Reduktase, welche am Sekundärstoffwechsel beteiligt ist, tatsächlich die in der Zellwand gebundene sein kann. Denn in den vorangegangenen Versuchen konnte nicht geklärt werden, auf welcher Seite der Membran sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Falls das aktive Zentrum der Reduktase an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert ist, erklärt dies die hohen Konzentrationen von Vanillylalkohol und auch Dioxindol im Nährmedium. Falls sich das aktive Zentrum an der Innenseite der Membran befindet, ließe sich die hohe Konzentration an Vanillylalkohol und Dioxindol nur durch die gute Permeabilität der Membran für Vanillylalkohol und Dioxindol und deren Vorstufen erklären. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich.

Falls das aktive Zentrum extrazellulär liegt, ist anzunehmen, daß dieses Enzym nicht mit der im Sekundärstoffwechsel eingesetzten Reduktase identisch ist. Denn es ist davon auszugehen, daß die Biosynthese von Naturstoffen ausschließlich innerhalb der Zelle stattfindet, d.h. durch ein cytosolisches oder durch ein membrangebundenes Enzym mit einem aktiven Zentrum innerhalb der Zelle.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Ausweitung der *in vivo* Spektroskopie auf die Biosyntheseforschung von Sekundärstoffwechselprodukten. Bisher gelang dies nur mit markierten Substraten [103], [51]. Die kurze Biosynthesesequenz, die Umsetzung von Vellosoimin über Vellosoimol zu Sarpagin (siehe Abbildung 17), war sehr geeignet, um sie mit der *in vivo* Spektroskopie zu untersuchen, da sich die aromatischen Signale von Sarpagin aufgrund der Hydroxylierung des Aromaten stark von denen des Vellosoimins und Vellosoimols unterscheiden. Nach Applikation von Vellosoimin und Inkubation von 48 h und 120 h reichte eine Meßzeit von 80 min an einem 800 MHz Gerät aus, um die Entstehung von Sarpagin mit Hilfe von drei neuen Signalen zu beobachten. Da an beiden Zeitpunkten, d.h. sowohl 48 h als auch 120 h nach Zugabe des Substrates, jeweils mindestens zwei Metaboliten detektierbar waren, bedeutet dies bei einer Startkonzentration von ca. 1 mM, daß die Konzentration von ca. 500  $\mu$ M ausreicht, um ein Alkaloid mit dieser Methode zu detektieren.

Die Verfolgung der Reduktion von Vellosoimin zu Vellosoimol erwies sich als schwierig. Durch die starken Zellhintergrundsignale im Bereich von 0 - 5 ppm

bzw. 0 - 80 ppm können die Veränderungen der aliphatischen Signale des Alkaloids, wie das Anwachsen der entstehenden C(OH)-H<sub>2</sub>17-Signale, nicht beobachtet werden. Die aromatischen Signale sind aufgrund der ähnlichen Struktur der beiden Verbindungen identisch (siehe Abbildung 17). Somit diente das Verschwinden des Aldehydsignals als Identifizierung. Da die Reaktion sehr schnell verläuft, erwies sich die Protonenspektroskopie als sinnvolle Methode um das Abfallen des Signals beobachten zu können. Die Meßzeit der 2D-Methode wäre zu lang gewesen, um die Biotransformation zu beobachten (siehe IV.2). In diesem Fall konnte die Reaktion jedoch nur an einem Signal verfolgt werden, was natürlich kaum Aussagen über den Reaktionsweg zuläßt. Falls der Biosyntheseschritt Änderungen in dem aliphatischen Teil der Verbindung hervorruft, ist es in der Zukunft erforderlich, die Zellhintergrundsignale zu reduzieren, um auch diesen Bereich für die Beobachtung nutzen zu können.

Durch Einsatz von "D<sub>2</sub>O-Kulturen" konnte eine effektive Wasserunterdrückung erreicht und die Signale der endogenen OH-Gruppen eliminiert werden. Dies ist jedoch nur in den Protonenspektren im Bereich von 5 - 6 ppm sichtbar. Aufgrund der Vielzahl von weiteren Signalen im Bereich von 0 - 6 ppm können die Protonenspektren nicht zur Analyse von Änderungen aliphatischer Signale bei Biotransformationsprozessen herangezogen werden. Versuche, den Zellhintergrund im Bereich von 0 - 5 ppm durch Einbau von Deuterium in Zellinhaltsstoffe weiter zu reduzieren, waren erfolglos. Dies lag zum Teil an der zu kurzen Kultivierungsdauer der Zellen in dem D<sub>2</sub>O-haltigen Medium. Eine längere Kultivierung der Zellen mit mindestens einmaligem "Überimpfen" war aufgrund des schlechten Wachstums der Zellen in diesem Medium jedoch nicht möglich. Deswegen wurden die Zellen erst kurz vor Fütterung in das D<sub>2</sub>O-haltige Nährmedium transferiert. Des Weiteren ist noch zu bedenken, daß Pflanzenzellkulturen nicht fähig sind Photosynthese zu betreiben. Somit ist mit einem Einbau von Deuterium in Zucker (ausgenommen der OH-Gruppen) nicht zu rechnen. Da die meisten störenden Hintergrundsignale in den NMR-Spektren jedoch von Zuckern stammen, ist die alleinige Kultivierung von Zellkulturen in einem D<sub>2</sub>O-haltigem Medium nicht die alleinige Lösung. Erfolgversprechend wäre dies nur, falls zusätzlich noch vollständig deuterierte



Zucker als Kohlenhydratquelle eingesetzt werden können. Ob diese aber von den Zellkulturen akzeptiert werden ist fraglich.

Um bei Biotransformationsversuchen, die mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie verfolgt werden, Änderungen von aliphatischen Signalen zu beobachten, ist es jedoch wichtig die Zellhintergrundsignale zu reduzieren. Dies ist natürlich in bezug auf die endogenen Zucker und Aminosäuren schwierig, vielleicht sogar unmöglich.

Eine weitere Möglichkeit, um mehr Information über Biosyntheseschritte von chemisch ähnlichen Verbindungen bzw. von Reaktionen, bei denen nur Veränderungen im aliphatischen Teil des Grundgerüsts entstehen und dessen Pro- und Edukte die gleichen chemischen Verschiebungen der aromatischen C-H-Signale aufweisen, zu bekommen, wären vielleicht parallele Messungen von markierten und unmarkierten Präkursoren.

Durch sinnvolle Markierung und mit Hilfe der neuen 2D-Techniken beschränkt sich diese Methode nicht mehr ausschließlich auf die Beobachtung der Veränderung eines Signals. Beispielsweise durch die Aufnahme von TOCSY-Spektren können sich ändernde Kopplungen der markierten C-H-Bindungen über zwei bis drei weitere Bindungen beobachtet werden [104], [105].

Nachdem die Ergebnisse der *in vivo* NMR-Spektroskopie den vorher angenommenen Seitenweg der Vellosimin-Metabolisierung (siehe Abbildung 17) bestätigt haben, gelang es auch Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung von Vellosimol zu ziehen. Durch *in vitro* Inkubationen mit einer Mikrosomen Fraktion wurde die Umsetzung von Vellosimol zu Sarpagin beobachtet. In weiteren Versuchen wurde eine Sauerstoff und NADPH Abhängigkeit dieses Enzyms gefunden und somit kann es als eine Cytochrom P 450 Monooxygenase identifiziert werden [159]

#### **4 Metabolismus von Vinorin und Vomilenin**

Ajmalin ist eines der in der Pflanze *Rauvolfia serpentina* vorkommenden Hauptalkaloide. In dem postulierten Hauptweg der Ajmalin-Biosynthese wird Vinorin über Vomilenin in mehreren Schritten zu Ajmalin umgesetzt (siehe I.3). Bisher sind 15 Enzyme bekannt, die an der Biosynthese der Ajmalan-

und Sarpagan-Alkaloide beteiligt sind. Davon entfallen 10 Enzyme auf den Hauptweg der Ajmalin-Biosynthese. Ausgehend vom Vinorin sind 5 Enzyme identifiziert, von denen mittlerweile 2 heterolog exprimiert sind (siehe I.3).

In Zellkulturen gehört Ajmalin jedoch nicht zu den Hauptinhaltsstoffen. Zellkulturen von *R. serpentina* lieferten das in der Pflanze vorkommende Spurenalkaloid Raucaffricin in Mengen bis zu 1.6 g/l [68]. Das heißt, daß in Zellkulturen verstärkt Enzyme exprimiert werden können, die den Sekundärstoffwechsel in einen der Seitenwege der Ajmalin-Biosynthese lenken. Raucaffricin entsteht durch Glucosylierung von Vomilenin und wird von der Pflanzenzelle akkumuliert. Die für die Raucaffricin Synthese verantwortliche Glucosyltransferase ist bekannt, jedoch bisher nicht isoliert worden. Aufgrund der Tatsache, daß es sich um ein membrangebundenes Enzym handelt, erwies sich die Aufreinigung als schwierig [111]. Die für die Rückreaktion verantwortliche Glucosidase ist dagegen identifiziert, charakterisiert und in *E. coli* funktionell exprimiert worden [79], [80].

HPLC-Untersuchungen der methanolischen Zellextrakte unterschiedlicher *R. serpentina*-Zelllinien und einer *RxR*-Hybridkultur zeigen, daß Raucaffricin in unterschiedlichen Mengen von den Kulturen akkumuliert wird. In den Zelllinien *R. serpentina*, *R. serpentina München* und *R. serpentina Mutter* wurden höhere Konzentrationen an Raucaffricin detektiert als in der Zelllinie *T 30* und in der *RxR*-Hybridkultur. Der Rückgang in der Produktion von Sekundärstoffen ist jedoch ein Phänomen, das in vielen pflanzlichen Zellkulturen beobachtet wird und auf chromosomale Aberrationen zurückgeführt wird [18].

Fütterungsversuche mit unterschiedlichen *R. serpentina*-Zelllinien und einer *RxR*-Hybridkultur mit Vomilenin zeigen ausschließlich die Bildung von Raucaffricin. Dies konnte durch Enzyminkubation mit einer durch Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Enzymfraktion einer sechs Tage alten *RxR* (*Mainz*)-Kultur bewiesen werden. Durch die Inkubation der Probe mit der Enzymfraktion konnte Raucaffricin in Vomilenin und Glucose gespalten werden. Coinjektions-Experimente bestätigen das Ergebnis. Das Entstehen von Ajmalin konnte auf diese Weise nicht beobachtet werden. Wenn es gebildet wurde, dann in sehr geringen Mengen, die unter der Nachweisgrenze der angewandten Methoden lagen.

Fütterungsversuche mit vier unterschiedlichen *R. serpentina*-Zelllinien und einer *RxR*-Hybridkultur mit Vinorin zeigen, daß in allen fünf Zellkulturen Vinorin zu Raucaffricin umgesetzt wurde. Bestätigt wurde dies durch Coninjektion und DC-Analysen. Während in den Zelllinien *R. serpentina*, *R. serpentina München* und *R. serpentina Mutter* diese Umsetzung fast ausschließlich statt fand, konnte in der Zelllinie *T 30* und in der *RxR*-Hybridkultur noch ein weiterer Weg der Metabolisierung beobachtet werden. In diesen Zellextrakten konnten mit Hilfe von HPLC-Analysen mit Coinjektionen und der Entwicklung einer DC mit anschließender MS-Untersuchung Vellosimin, Vellosimol und Sarpagin als Metaboliten von Vinorin gefunden werden. Dies deutet auf eine Rückreaktion von Vinorin zu Vellosimin hin. Die chemische Veränderung, d.h. Bildung des Vellosimins durch die Extraktionsbedingungen und Aufarbeitung der Proben kann aufgrund der Detektion der Folgeprodukte Vellosimol und Sarpagin ausgeschlossen werden. Diese Metaboliten waren nicht in den Kontrollproben detektierbar und müssen somit Folgeprodukte des gebildeten Vellosimins sein. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Ringöffnung, die für den Übergang von Vinorin nach Vellosimin verantwortlich ist, ein enzymatischer oder spontaner Vorgang ist. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes der Kultur wäre die Möglichkeit zur Ringöffnung gegeben, da Vinorin durch Einwirkungen von Basen zu Vellosimin umgesetzt werden kann (vergleiche II.4). Um diese Frage näher zu untersuchen, müßte die Stabilität von Vinorin in wäßrigen Systemen mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht werden. Auf einen enzymatischen Vorgang deutet jedoch hin, daß bei der Verfütterung von Vomilenin keine Rückreaktion beobachtet wurde. Auch Vomilenin müßte unter Baseneinwirkung bzw. einer pH-Wert Erhöhung durch Hydrolyse der 17-O-Acetylgruppe zu einem Sarpagan-Alkaloid umgesetzt werden.

Um die Metabolisierung des Vinorins *in vivo* zu verfolgen, wurde die Hybridkultur verwendet, da sie sich im Vergleich zur *T 30*-Kultur als stabileres System erwies. Es ergab sich die Möglichkeit, erstmals die Cryogenic Probe Technologie für die *in vivo* Beobachtungen anzuwenden. Durch diese Technologie, die durch starkes Herunterkühlen der Spule und des Pre-amplifiers das thermische Rauschen reduziert, wird die Empfindlichkeit

gegenüber einem normalen Probenkopfes um das 3- bis 4-fache erhöht [113-115].

Drei Fütterungsansätze mit jeweils gleicher Startkonzentration des Intermediates dienten zur Beobachtung der Metabolisierung. Es konnte mit der *in vivo* Spektroskopie nachgewiesen werden, daß die Zellkulturen Vinorin über die in III.2.2 beschriebenen Wege umsetzten. Jedoch zeigte jeder Fütterungsansatz eine unterschiedliche Akkumulation der Zwischen- und Endprodukte. Da alle drei Fütterungsversuche die gleiche Startkonzentration haben, scheint die Stoffmenge des zugesetzten Substrates keinen Einfluß auf die Regulierung des Metabolismus zu haben.

Anhand des Entstehens von vier aromatischen Signalen und des C-H19-Signals konnte die Bildung von Vellosimin/Vellosimol nachgewiesen werden. Die Bildung des Sarpagins konnte durch das Erscheinen seiner drei aromatischen Kohlenstoffe bzw. Protonen Signale verfolgt werden, welche eine eindeutige Identifizierung zulassen. Die Identifizierung des Raucaffricins erwies sich dagegen als schwieriger, da Vinorin, Vomilenin und Raucaffricin die gleichen chemischen Verschiebungen der aromatischen C-H-Signale aufweisen. Deshalb war die Verschiebung des C-H19-Signals zunächst der einzige Hinweis. Es konnten aber durch die Anwendung der Methode der Cryo-NMR erstmals Signale im aliphatischen Bereich detektiert werden, die von einem Biotransformationsprodukte stammen. Mit Hilfe eines Referenzspektrums von Raucaffricin konnten die Signale des Glucoserestes mit großer Sicherheit zugeordnet werden. Diese weisen im *in vivo* Spektrum das gleiche Muster auf wie die Signale des Glucoserestes im Referenzspektrum des Produktes Raucaffricin. Jedoch sind die dem Glucoserest zugeordneten Crosspeaks um ca. 1 ppm in ihren  $^1\text{H}$ -Werten hochfeldverschoben. Die  $^{13}\text{C}$ -Werte sind aber identisch. Aufgrund des charakteristischen Musters der 4 bzw. 5 Signale scheint die Zuordnung relativ eindeutig.

Die Hochfeldverschiebung in den  $^1\text{H}$ -Werten kann zum einen durch die unterschiedliche Lösungsmittelzusammensetzung entstanden sein. Das Referenzspektrum wurde in reinem  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen, während die *in vivo* Aufnahmen in wäßriger Lösung mit einer maximal 10 %igen Konzentration an  $\text{D}_2\text{O}$  und zum Teil mit einem 5 %igem  $\text{MeOD-d}_4$ -Zusatz erfolgten. Zum anderen kann es auch zu Verschiebungen der ppm-Werte durch die

Aufnahme der Substanzen in Zellen kommen. Dadurch, daß die NMR-Messungen nicht mehr in einer idealen flüssigen Phase stattfinden, sondern in einem partiellen Festkörper kommt es zu Anisotropieeffekten, von denen insbesondere Protonenverschiebungen stark beeinflusst werden können, während die Verschiebung der Kohlenstoffe davon häufig unbeeinflusst bleibt. Um die vermutete Zuordnung endgültig zu beweisen, könnten Fütterungsversuche mit Raucaffricin durchgeführt werden. Die Aufnahme von Monoglucosiden durch Pflanzenzellkulturen wurde schon beobachtet [122]. Die Aufnahme des Glucosids könnte zuerst mittels HPLC überprüft und bei einem positiven Nachweis müßten die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Substratzugabe NMR-spektroskopisch vermessen werden. Die chemischen Verschiebungen der Glucosesignale des Raucaffricins direkt nach der Fütterung müßten sich von denen in den späteren Proben unterscheiden.

Für die Bildung des Vomilenins gaben die *in vivo* Spektren keinen Hinweis. Mit Hilfe der Spektren von Referenzalkaloiden konnte nachgewiesen werden, daß sich die Signale im Aromatenbereich von Vinorin, Vomilenin und Raucaffricin nicht unterscheiden; nur die Signale des Kohlenstoffs 19 und des dazugehörigen Protons variieren von Vinorin zu den beiden anderen Verbindungen. Das Signal 19 von Vomilenin und Raucaffricin unterscheidet sich in den Referenzspektren nur durch den  $^{13}\text{C}$ -Werte um ca. 4 ppm. Jedoch zeigt sich, daß die Signale für das C-H19 des Vomilenins und des Raucaffricins in den *in vivo* Aufnahmen nicht voneinander aufgelöst sind. Aus diesem Grund können keine zuverlässigen Aussagen über die Bildung des Vomilenins auf der Basis der hier durchgeführten Experimente gemacht werden.

Die Anwendung der Cryo-NMR brachte bei der Beobachtung des Vinorin-Metabolismus keinen erkennbaren Empfindlichkeitsgewinn bezüglich der einsetzbaren Konzentrationen. Es gelang in einer Meßzeit von 40 bis maximal 80 min und einer Startkonzentration des Substrates von 1.8 mM, mindestens drei bis fünf Alkaloide nebeneinander zu detektieren. Das heißt, die Alkaloid-Konzentrationen der einzelnen Zwischen- und Endprodukte lagen zwischen 0.4 bis 0.9 mM. Dies ist ein ähnlicher Konzentrationsbereich, in dem auch die Alkaloide mit einem 800 MHz Gerät nachgewiesen wurden (vergleiche III.2.1 und IV.3). Durch Verwendung unterschiedlicher Parameter, insbesondere des

Relaxation delays, der Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte und Scans, ist aber ein direkter Vergleich der beiden Geräte auch nur sehr schwer möglich.

Ein Hinweis für die erhöhte Empfindlichkeit der Cryogenic Probe Technologie ist jedoch die Aufnahme der ungefütterten Kulturen. Es zeigte sich, daß auch die Signale der endogenen Substanzen in den Spektren, aufgenommen am 500 MHz CryoProbe™-Gerät, wesentlich intensitätsstärker sind als in den Spektren, die an einem 700 MHz Spektrometer gemessen wurden.

Die Reduktion des Zellhintergrunds durch das Überführen der Zellen in ein zuckerfreies Medium war erfolgreich; die "zuckerfreien" Kulturen zeichneten sich durch einen deutlich geringeren Zellhintergrund im Bereich von 3 - 4.5 ppm und 60 - 80 ppm aus.

Die Metabolisierung von zugefügtem Vinorin oder Vomilenin konnte in diesen Kulturen mit *invasiven* Methoden beobachtet werden, bei Anwendung der *in vivo* NMR-Spektroskopie jedoch nicht. Wahrscheinlich waren die Zellen durch den Transport und das kohlenhydratfreie Medium metabolisch zu "gestreßt" und haben zumindest die erwarteten Transformationen nicht länger durchgeführt. Für diese Art von Experimenten müßten Bedingungen gewählt werden, bei denen die Zellen keinem Transportstreß ausgesetzt sind und unter optimierten Bedingungen (vergleiche II.1) kultiviert werden können.

In Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* wurden bis zu 1.6 g/l an Raucaffricin gefunden [68]. Dies entspricht einer Konzentration von 3.1 mM. Geht man davon aus, daß sich Raucaffricin nur in den Zellen befindet und nicht im Medium, so kann die intrazelluläre Konzentration, bezogen auf die Gesamtzellmasse, mindestens doppelt so hoch sein. Nach den bisherigen Methoden müßte dieser endogene Inhaltsstoff auf jeden Fall mit der *in vivo* Spektroskopie nachweisbar sein, falls er nicht innerhalb der Zelle in sehr hohen Konzentrationen z.B. an Makromolekülen gebunden vorliegt und deshalb nicht *in vivo* NMR-spektroskopisch erfaßt werden kann. Jedoch wurde ein Rückgang der Konzentration des Raucaffricins in den letzten Jahren beobachtet [111]. Das Glucosid konnte weder an einem 700 MHz Spektrometer noch an einem 800 MHz CryoProbe™-Gerät in einer *R. serpentina* (Mutter)-Kultur nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine endogene Konzentration des Alkloids von unter 0.5 mM hin. Jedoch fand die

Messung auch einer "zuckerfreien" Kultur statt. Hier besteht auch die Möglichkeit, daß Raucaffricin von der Raucaffricin-Glucosidase wieder zu Vomilenin und Glucose umgesetzt wurde, so daß der Raucaffricin-Gehalt nicht dem einer normalen Kultur entspricht.

Nach den durchgeführten Untersuchungen ist jedoch anzunehmen, daß der Raucaffricin-Gehalt in den verwendeten Zellkulturen abgenommen hat und mittlerweile unter Nachweisgrenze der *in vivo* NMR liegt oder daß ein Großteil des Raucaffricins in der Zelle an Makromolekülen gebunden vorliegt und deshalb mittels der *in vivo* Spektroskopie nicht nachweisbar ist. Um dies zu überprüfen müßte die momentane Konzentration von Raucaffricin in den Zellkulturen genau bestimmt werden. Falls die Konzentration unterhalb der *in vivo* NMR-Nachweisgrenze liegt, könnte durch Elicitierungen und Variation der Nährmedien versucht werden, den endogenen Gehalt des Raucaffricins bzw. anderer Alkaloide so zu erhöhen, daß sie dann mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie nachzuweisen sind.

## **5 Metabolismus von Ajmalin und N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochanoajmalin**

Die bei Fütterungsversuchen von Ajmalin gebildeten Alkaloide in *Rauvolfia*-Zellkulturen wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt in unserem Arbeitskreis untersucht. Ajmalin wurde zu dem Hauptprodukt Raumaclin umgesetzt, eine Verbindung vom Macrolin-Typ. Des weiteren konnten sieben Nebenprodukte, von denen fünf Derivate des Raumaclins sind, isoliert und identifiziert werden [137]. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß an der Biosynthese des Raumaclins zwei verschiedene katalytische Aktivitäten beteiligt sind. Eine zellwandgebundene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängige Peroxidase, die durch eine oxidative Spaltung der C7/C17-Bindung die Bildung von 21-Hydroxy-raumaclin über eine weitere unbekannte Vorstufe katalysiert. Anschließend wird 21-Hydroxy-raumaclin von der Pflanzenzelle aufgenommen und durch eine NADPH-abhängige enzymatische Reaktion zu Raumaclin reduziert. Die dafür verantwortliche Reduktase ist ausschließlich in der löslichen Proteinfraktion enthalten [140].

Im Verlauf dieser Arbeit konnte auch bei Fütterungsversuchen von Ajmalin mit einer *RxR*-Hybridkultur mit einer Startkonzentration des Substrates von 1.6 mM die Bildung des Hauptproduktes Raumaclins beobachtet werden. Zudem kam es zur Bildung eines Nebenproduktes, das als Raumaclin-Derivat identifiziert werden konnte. Aufgrund des erhaltenen MS-Spektrums scheint es sich bei diesem Derivat entweder um 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin oder 21-Hydroxy-raumaclin zu handeln. Das HPLC-Chromatogramm einer Probe des Fütterungsexperimentes, der 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin zugeführt wurde, deuten daraufhin, daß es sich bei dem Nebenprodukt um 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin handelt. Es kam zu keiner weiteren Signalbildung. Jedoch ist zu bemerken, daß ENDREß [137] frühestens sieben Tage nach Applikation von Ajmalin zu einer *R. serpentina*-Zellkultur, 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclin in den Extrakten nachweisen konnte. Es entsteht durch Hydroxylierung von Raumaclin. Deswegen ist die abnehmende Konzentration des Nebenproduktes in den letzten Proben (entnommen 96 h und 168 h nach Ajmalin-Zugabe) ein Punkt, der gegen diese Identifizierung spricht. Eine weitere Identifizierungsmöglichkeit für das Produkt könnte die Bildung von 21-Hydroxy-raumaclin sein, einer Vorstufe in der Raumaclin-Bildung. Dieses Derivat konnte in den früheren Fütterungsversuchen in einer *R. serpentina*-Zellkultur mit verlangsamtem Stoffwechsel nachgewiesen werden. Zudem gelang die *in vitro* Synthese aus Ajmalin mit einer zellwandgebundenen Peroxidase von *R. serpentina*-Zellen in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [140]. Leider stand diese Substanz zur Bestimmung der Retentionszeit und für Coinjektions-Analysen nicht zur Verfügung. Jedoch kann für die Verbindung eine dem des 6 $\alpha$ -Hydroxy-raumaclins ähnliche Polarität angenommen werden, so daß die Retentionszeiten der beiden Verbindungen bei dem verwendeten Gradient sehr gleich sein können und zusammenfallen. Zudem spricht für die Bildung des 21-Hydroxy-raumaclins, die hohe Konzentration in den ersten Proben und abnehmende Konzentration in den letzten Proben (entnommen 96 h und 168 h nach Ajmalin-Zugabe).

Für eine abschließende Identifizierung muß das Produkt auf jeden Fall isoliert und einer Strukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie unterzogen werden.



Die fehlende Beobachtung der weiteren Derivatisierung dürfte in der unterschiedlichen Inkubationsdauer liegen. ENDREß [137] konnte erst nach 14-tägiger Inkubationsdauer von Ajmalin alle übrigen Raumaclin-Derivate nachweisen. In den hier beschriebenen Versuchen wurde die Metabolisierung nur über eine Woche beobachtet.

Weitere mögliche Gründe sind die etwas geringere Startkonzentration des eingesetzten Substrates (1.6 mM) und die entnommene Probenmenge von nur 300 mg Zellen. In den früheren Versuchen lag die Startkonzentration bei etwa 2.1 mM und jeweils die Zellen eines ganzen Kolbens (ca. 150 g Feuchtwicht) wurden extrahiert. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, daß im aktuellen Fall die Nebenprodukte auch aufgrund ihrer geringen Konzentration in der Probe nicht mit der HPLC detektiert werden könnten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Biotransformation mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie zu untersuchen, deswegen sollte die Untersuchung der Bildung der Nebenprodukte mit Hilfe der HPLC unberücksichtigt bleiben. Nach den von ENDREß [137] bestimmten Konzentrationen der Raumaclin-Derivate wären diese auf jeden Fall zu niedrig, um mit der *in vivo* NMR-Spektroskopie erfaßt zu werden.

Für die Beobachtung der Raumaclin Biosynthese stand nur ein 700 MHz Spektrometer zur Verfügung, jedoch sollte die Empfindlichkeit auf jeden Fall ausreichen, die Biotransformation zumindest im Aromatenbereich zu verfolgen. Die *in vivo* Spektren zeigen die Umsetzung von Ajmalin zu einem Raumaclin-Alkaloid. Die vier Signale der aromatischen C-H-Bindungen des Ajmalins nehmen mit der Zeit an Intensität ab, während die des Raumaclins an Intensität gewinnen. Jedoch weisen alle bisher gefundenen Raumaclin-Derivate, nach vorhandenen Daten, die gleichen bzw. sehr ähnliche chemische Verschiebungen im Aromatenbereich auf [137-139, 141].

Auch die zwei identifizierten aliphatischen Signale weisen auf kein bestimmtes Raumaclin-Alkaloid hin. Denn auch diese Signale sind bei allen Raumaclin-Derivaten fast identisch und lassen sich aufgrund der schlechteren Auflösung der *in vivo* NMR-Spektroskopie nicht mehr unterscheiden.

Nur in Kombination mit der HPLC läßt sich das Raumaclin-Alkaloid eindeutig als Raumaclin identifizieren.

Über das in den HPLC-Analysen gefundene Nebenprodukt läßt sich mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie keine weitere Aussage machen. Die chemischen Verschiebungen der aromatischen C-H-Bindungen und der beiden Methylgruppen ist nach den vorhandenen Daten der Raumaclin-Alkaloide mit den anderen Derivaten identisch. Wenn dieses mit der HPLC detektierte Produkt, nicht durch eine chemische Reaktion, während der Extraktion oder weiteren Aufarbeitung entstanden ist und seine Akkumulationsrate ausreicht, um mit der *in vivo* Spektroskopie nachgewiesen zu werden, so gehört es zu den Raumaclin-Alkaloiden. Denn im Aromatenbereich sind keine weiteren Signale für ein Alkaloid einer anderen Klasse zu erkennen. Dieses Ergebnis stimmt mit den HPLC-, DC- und MS-Untersuchungen überein. Dies zeigt die Grenzen der *in vivo* NMR-Spektroskopie unter den momentanen Bedingungen. Änderungen der Signale im Bereich von 5 - 10 ppm und 70 - 100 ppm können zwar beobachtet werden, die vollständige Strukturaufklärung der Biosyntheseprodukte ist jedoch nur mit Hilfe der üblichen *invasiven* Methoden möglich.

Frühere Fütterungsexperimente von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin in einer *Rauvolfia serpentina*- und einer *RxR*-Kultur zeigten, daß es neben der Bildung von zwei Hauptprodukten (N<sub>β</sub>-Methyl-raumaclin und N<sub>β</sub>-Methyl-iso-raumaclin) zur Bildung zweier Nebenprodukte, N<sub>β</sub>-Methyl-ajmalin und 19-Hydroxy-N<sub>β</sub>-methyl-raumaclin, kommt. Jedoch fand die Kultivierung der Zellkulturen während und nach der Applikation des Substrates in AP-Medium statt. Der gleiche Versuch wurde nochmals in LS-Medium durchgeführt, jedoch nur mit einer *R. serpentina*-Zellkultur. Es kam zur Bildung der beiden Hauptprodukte und der beiden Nebenprodukte, jedoch wurde 19-Hydroxy-N<sub>β</sub>-methyl-raumaclin in einem wesentlich geringeren Maßstab gebildet [122]. Bei der Fütterung von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin zu einer *RxR*-Kultur, kultiviert in LS-Medium, zeigten die HPLC-Chromatogramme die Bildung von N<sub>β</sub>-Methyl-raumaclin, N<sub>β</sub>-Methyl-iso-raumaclin und des Nebenproduktes N<sub>β</sub>-Methyl-ajmalin. Die Bildung des zweiten Nebenproduktes konnte nicht nachvollzogen werden, jedoch war hier die eingesetzte Konzentration an N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin geringer als die in den früheren Versuchen

[122], so daß die Konzentration des zweiten Nebenproduktes unterhalb der Nachweisgrenze der hier angewandten Methode lag.

Die gebildeten Produkte wurden mit Hilfe von DC, MS und NMR nochmals identifiziert und sind mit denen von SCHROEDER [122] identisch.

Es war interessant zu untersuchen, ob die *in vivo* Messungen an einem 500 MHz Instrument, ausgestattet mit einem CryoProbe<sup>TM</sup>, bei einer Konzentrationserhöhung des Substrates auf 2.3 mM und der Verwendung einer bei Fütterung sechs Tage alten Zellkultur mehr Hinweise auf die Bildung der Raumaclin-Alkaloide geben als bei den vorherigen Beobachtungen des Ajmalin-Metabolismus, d.h. ob die Produkte durch weitere Signale im Aliphatenbereich eindeutig identifiziert werden können oder die Identifizierung erneut nur auf den Aromatenbereich beschränkt bleiben würde.

Die *in vivo* Spektroskopie bestätigt die Umsetzung zu einem oder mehreren Raumaclin-Alkaloiden, wie das Entstehen von vier neuen Signale im Bereich von 6 - 7 ppm in den Spektren 43, 72 und 120 h nach Applikation des Substrates zeigt. Diese Crosspeaks zeigen die gleichen chemischen Verschiebungen, die auch bei der Ajmalin Metabolisierung beobachtet wurden. Im Aliphatenbereich sind wiederum die Signale für die N<sub>α</sub>- und die C18-Methylgruppe sichtbar. Die Bildung der N<sub>β</sub>-Methyl-raumacline kann aufgrund eines Signals bei 2.7/39 angenommen werden, jedoch liegt dieses Signal in einem Bereich, in dem der Zellhintergrund sehr stark ist. Weitere Aussagen können aufgrund der *in vivo* Spektren nicht gemacht werden. Die Zuordnung im Aliphatenbereich ist unsicher, da die Vielzahl der Zellhintergrundsignale sehr stört und sich diese auch von Messung zu Messung verändern können. Die Verwendung einer älteren Kultur konnte auch keine Reduzierung der Hintergrundsignale bewirken. Jedoch wäre gerade der Aliphatenbereich für die genaue Identifizierung der beiden Hauptprodukte notwendig. Die Identifizierung der beiden Stereomere ist nur mit Hilfe der Kohlenstoffsignale möglich, die in der Nähe des Stereozentrums liegen.

Die Signale von N<sub>β</sub>-Methyl-ajmalin im Bereich von 6 - 8 ppm sind nach vorhandenen Daten und aufgenommenen Referenzspektren mit denen des Substrates N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin identisch. Aus diesem Grund können auch über die Bildung dieses Nebenprodukts keine Aussagen

gemacht werden. In allen Spektren sind die Signale eines Ajmalin-Alkaloids vorhanden. In den ersten Messungen können diese dem Substrat zugeordnet werden; in den späteren Spektren könnten diese Signale sowohl von  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin als auch von  $N_{\beta}$ -Methyl-ajmalin stammen, falls die Akkumulationsrate des Nebenproduktes zur Detektion überhaupt ausreicht.

Auch über die Intermediate in der Raumaclin-Biosynthese können keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden. Bei den hier durchgeführten *in vivo* Messungen sind die Pausen zwischen den Probenentnahmen zu groß, um tatsächlich Hinweise zu den Intermediaten zu bekommen. In der Zukunft könnte vielleicht eine Kultivierung in einem NMR-Röhrchen für diese Fragestellung von Nutzen sein. Wachstumskurven der Kultivierung von Zellkulturen in einem 15 mm und in einem 8 mm NMR-Röhrchen wurden bereits durchgeführt. Das Wachstumsverhalten unterschied sich nicht von dem von Zellen, die in einem 1 l Erlenmeyerkolben kultiviert wurden. Einziger Nachteil war die Bildung von Zellpfropfen bei der Kultivierung in einem 8 mm NMR-Röhrchen. Mit  $N_{\beta}$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin wurden auch Biotransformationsversuche in einem 8 mm Röhrchen durchgeführt, die ein gleiches Ergebnis lieferten wie Fütterungsversuche mit Zellen in einem Erlenmeyerkolben [122]. Jedoch sind zur Zeit weder 8 mm Probenköpfe für NMR-Geräte über 600 MHz noch CryoProbes<sup>TM</sup> über 5 mm erhältlich. Man könnte versuchen, Zellen in einem 5 mm Röhrchen zu kultivieren. Dies wurde schon erfolgreich bei Bakterienkulturen angewandt, Beschreibungen für die Begasung sind erhältlich. Es bleibt jedoch auch dann fraglich, ob die Akkumulationsrate der Zwischenstufen ausreicht, um sie unmarkiert nachweisen zu können. Deswegen sollte man auf die Verfütterung von markierten und unmarkierten Verbindungen zurückgreifen. Mit einer Kombination aller erhaltenen Informationen könnte es vielleicht gelingen, Rückschlüsse auf die Zwischenstufen zu ziehen, die entstandenen Raumaclin-Derivate genauer zu identifizieren und die Biosynthese dieser Alkaloidklasse in pflanzlichen Zellkulturen erstmals im einzelnen unter *in vivo* Bedingungen aufzuklären.

## 6 Metabolismus von Perakin

Es wird postuliert, daß ein Nebenweg der Ajmalin-Biosynthese ausgehend von Vomilenin die Bildung von Perakin ist, welches weiter zu Raucaffrinolin reduziert wird (siehe I.3). Die enzymatische Umsetzung von Perakin zu Raucaffrinolin in einer NADPH-abhängigen Inkubation mit einem Proteinrohextrakt von *R. serpentina*-Zellkulturen gelang [68]. In Inkubationsversuchen von Perakin mit aufgereinigter 21-Hydroxy-raumaclin-reduktase wurde das Substrat mit hoher Substratspezifität zu Raucaffrinolin reduziert [140]. Die 21-Hydroxy-raumaclin-reduktase wurde bei Fütterungsversuchen von *Rauwolfia*-Zellenkulturen mit Ajmalin entdeckt und ist ausschließlich in der löslichen Proteinfraction der *R. serpentina*-Zellkultur vorhanden [140]. Das Substrat 21-Hydroxy-raumaclin konnte bisher jedoch nur nach Applikation von Ajmalin zu *R. serpentina*-Zellkulturen nachgewiesen werden, deswegen kann Perakin als das eigentliche endogene Substrat dieses Enzyms angesehen werden, da Perakin sowie Raucaffrinolin natürlich vorkommende Indolalkaloide in *Rauwolfia*-Pflanzen sind.

Die Umsetzung mit der entsprechenden Proteinfraction einer *RxR*-Zellkultur war mit einer relativen Aktivität von 44% im Vergleich zur *R. serpentina*-Zellkultur möglich [140].

Ein Hinweis für eine andere bzw. weitere Umsetzung des Perakins konnte mit Hilfe der *in vivo* NMR-Spektroskopie erhalten werden. Durch das Erscheinen von vier neuen Signalen im Bereich von 6 - 8 ppm bzw. 100 - 135 ppm, die sich stark von den chemischen Verschiebungen der aromatischen C-H-Signale des Perakins unterscheiden, scheint die Bildung von Raucaffrinolin als Metabolisierungsendprodukt ausgeschlossen. Perakin und Raucaffrinolin unterscheiden sich nur durch den Substituenten an der C-20 Position. Das Alkaloid-Grundgerüst ist identisch (siehe Abbildung 33). Die unterschiedlichen Substituenten dürften keinen Einfluß auf die chemischen Verschiebungen der aromatischen Kohlenstoff- und Wasserstoffsignale haben. Durch Vergleich der ppm-Werte der vier neuen Signale mit vorhandenen Spektren aus den vorausgegangen *in vivo* Experimenten und mit Referenzspektren unterschiedlicher Alkaloide war zu sehen, daß die hier gefundenen Werte den

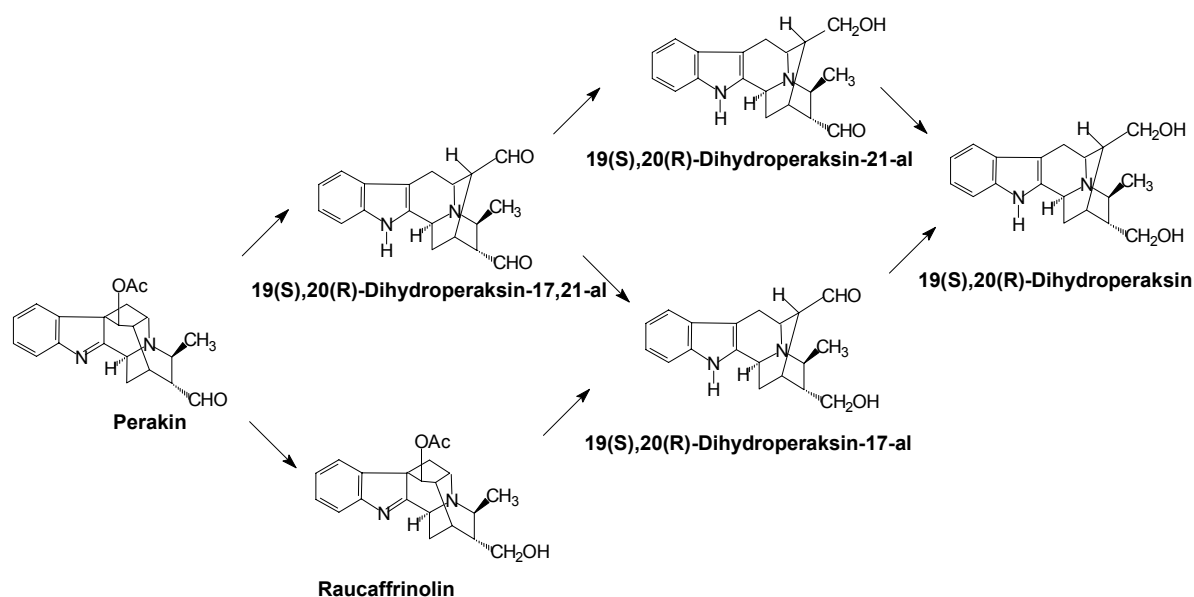
ppm-Werten des Vellosimins bzw. Vellosimols sehr ähnlich sind. Dies ist ein Hinweis auf die Bildung eines Sarpagan-Alkaloids, welches durch Hydrolyse der 17-O-Acetylgruppe entsteht. Eine genauere Identifizierung des Produktes war mit der *in vivo* Spektroskopie nicht möglich.

Fütterungsexperimente mit Perakin in einer *RxR*-Zellkultur und anschließender HPLC-Analyse der entnommenen Proben mit Coinjektion der vermuteten Zwischenprodukte, die als Referenzsubstanzen vorhanden waren, bestätigen, daß das entstandene Hauptprodukt nicht Raucaffrinolin ist.

Auffallend ist, daß Perakin im Gegensatz zu den beiden anderen gefütterten Carbonylverbindungen Isatin und Vellosimin (siehe III.1.2 und III.2.1) in hohen Konzentrationen auch in den Zellextrakten zu detektieren war. Das Hauptprodukt konnte hauptsächlich in den Zellextrakten nachgewiesen werden. Spuren eines unidentifizierten Produktes wurden zwar auch im Medium detektiert, jedoch in viel geringeren Mengen als die Reduktionsprodukte Dioxindol und Vellosimol (siehe III.1.2 und III.2.1). Das spricht dafür, daß das Enzym für die Perakin Metabolisierung tatsächlich ausschließlich im Zellinneren lokalisiert ist. Die geringe Konzentration des Produktes im Medium könnte auf eine Reduktion durch eine nicht spezifische Reduktase bzw. durch Freisetzung des Produktes durch die Zellen zurückzuführen sein.

Das bei den Fütterungsversuchen gebildete Hauptprodukt konnte mit Hilfe der präparativen DC isoliert und mittels MS- und NMR-Messungen als 19(S),20(R) Dihydroperaksin identifiziert werden.

Dieses Alkaloid wurde bereits neben 19(S),20(R)-Dihydroperaksin-17-al und 10-Hydroxy-19(S),20(R)-dihydroperaksin in Wurzelkulturen von *R. serpentina* gefunden [142]. In Abbildung 38 sind die theoretisch möglichen End- und Zwischenprodukte der Perakin-Metabolisierung dargestellt.



**Abbildung 38: Mögliche Zwischen- und Endprodukte bei der Verstoffwechslung von Perakin in *RxR*-Zellsuspensionskulturen**

Der Nachweis der Neben- und Zwischenprodukte in den entnommenen Proben gelang mit Hilfe der HPLC bisher noch nicht. Die möglichen Produkte zeigen unter den angewandten Bedingungen sehr ähnliche Retentionszeiten. Um Aussagen über die Bildung der Zwischenprodukte machen zu können, müsste für die Alkaloide ein spezielles HPLC-System entwickelt werden, in dem alle möglichen End- und Zwischenprodukte besser aufgetrennt werden. Dies ist bisher noch nicht gelungen.

Die Bildung des hydroxylierten Derivates konnte nicht beobachtet werden. Dieses hat mit dem verwendeten HPLC-Gradienten aufgrund der polaren Hydroxylgruppe eine kürzere Retentionszeit im Vergleich übrigen Substanzen. Ein Grund für die nicht beobachtete Bildung kann in zu einer kurzen Inkubationsdauer begründet sein. Die Metabolisierung des Perakins wurde nur über eine Woche beobachtet.

Nach Applikation von 2.37 mg Perakin zu ca. 15 ml einer *RxR*-Kultur (Startkonzentration: 380  $\mu$ mol) konnten Perakin und ein Transformationsprodukt in einer Meßzeit von 5 h (Scans 128, Recycle time 1.334 s und 128 Datenpunkte in F1) an einem 500 MHz CryoProbe<sup>TM</sup> nachgewiesen werden. Die Konzentration eines Alkaloids muß demnach bei weniger als 200  $\mu$ M gelegen haben und ist beinahe im physiologischen Bereich. Für *in vivo* Verfolgungen von Transformationen ist dieser Konzentrationsbereich jedoch noch zu gering,

da die Meßzeit bei über 5 h lag. Für das Verfolgen von Biotransformationen sollten möglichst kurze Meßzeiten angestrebt werden. Denn zu lange Meßzeiten stellen keinen konkreten Zeitpunkt der betreffenden Reaktion dar, sondern eher eine Summe von Reaktionen innerhalb einer Zeitspanne.

## 7 Schlußfolgerung und Ausblick

Für *nicht-invasive* Studien an lebenden und intakten biologischen Systemen ist die NMR-Spektroskopie als Verfahren prädestiniert. Neben dem Verfolgen von Metabolismen unter Einsatz von  $^{13}\text{C}$ -markierten Präkursoren gelang es in den letzten Jahren durch Einführung immer leistungsstärkerer Spektrometer auch *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen an pflanzlichen Zellkulturen mit unmarkierten Substanzen durchzuführen. Die Meßzeiten lagen an einem 400 MHz Spektrometer und einer Startkonzentration des Präkursors von 8 mM jedoch nicht unter 2 h [111]. Durch Anwendung der invers korrelierten NMR-Spektroskopie konnten die Meßzeiten an einem 600 MHz Instrument bei einer Startkonzentration des Substrates von 6 mM auf 20 - 40 min gesenkt werden [112]. Jedoch wurde diese Methodik bisher nur für die Beobachtung von Biotransformationen exogener Substanzen eingesetzt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung von Biotransformationen und Naturstoffbiosynthesesequenzen in pflanzlichen Zellkulturen mit Hilfe der 2D inverse korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an einem 500 MHz CryoProbe-Spektrometer im Bereich ab 5 ppm bzw. 80 ppm mit unmarkierten Substanzen bei einer Startkonzentration von  $\sim 2$  mM und einer Meßzeit von nur 40 min pro Spektrum routinemäßig möglich. An einem gewöhnlichen 700 oder 800 MHz Spektrometer sind bei gleicher Startkonzentration des Substrates Meßzeiten von ca. 80 min nötig.

Für das erfolgreiche Verfolgen der Metabolismen ist jedoch Bedingung, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der betreffenden Reaktion nicht unterhalb der Meßzeit liegt und es zu einer ausreichenden Akkumulation der Intermediate und Produkte kommt. Falls dies nicht gegeben ist, kann nur noch das Endprodukt der untersuchten Reaktionen in den Zellen detektiert werden. Zudem müssen sich Edukte, Intermediate und Produkte der Biosynthesesequenz



bezüglich ihrer chemischen Verschiebungen in dem obengenannten ppm-Bereich unterscheiden.

Insbesondere Metabolismen von einer Alkaloid-Klasse zu einer andern können mit dieser Methode gut verfolgt werden, da die verschiedenen Alkaloid-Typen häufig ein unterschiedliches aromatisches Grundsystem aufweisen.

Identifizierungsprobleme bezüglich der Pro- und Edukte gibt es allerdings, falls sich die Strukturen der Alkaloide oder der Biotransformationsprodukte nur im aliphatischen Grundgerüst unterscheiden. Diese aliphatischen Signale, die meist eine chemische Verschiebung im Bereich von 0.5 - 4.5 und 0 - 70 ppm aufweisen, sind stark von den Signalen der endogenen Aminosäuren und Kohlenhydrate überlagert. Um genauere Identifizierungen von Alkaloiden eines Alkaloid-Typs durchzuführen, ist dieser Bereich jedoch sehr wichtig. Die Verwendung immer empfindlicherer NMR-Geräte ist für dieses Problem nicht die einzige Lösung, denn durch die höhere Sensitivität der Spektrometer werden neben den zu untersuchenden Substanzen auch die Signale der endogenen Primärstoffe besser erfaßt.

Daher ist es in der Zukunft unerlässlich die Hintergrundsignale der Zucker und Aminosäuren zu reduzieren, um weitere aliphatische C-H-Signale der Biosyntheseverbindungen zu detektieren und zu identifizieren.

Die Kultivierung von Pflanzenzellen in einem deuterierten Nährmedium war nicht erfolgreich. Ein Einbau von Deuterium in Primärstoffe konnte aufgrund der geringen Kultivierungsdauer nicht festgestellt werden. Zudem ist bei Kultivierung von Pflanzenzellen in einem deuterierten Nährmedium mit einem Einbau von Deuterium in die Kohlenhydrate nicht zu rechnen, da Pflanzenzellkulturen keine Photosynthese durchführen. Deswegen könnte vielleicht der Einsatz vollständig deuterierter Zucker den Hintergrund reduzieren. Jedoch ist fraglich, ob diese von den Zellkulturen akzeptiert werden.

Der Einsatz von kohlenhydratfreien Medien brachte eine deutliche Reduzierung der Zuckersignale. Biotransformationsversuche in „zuckerfreien“ Kulturen konnten *invasiv* erfolgreich verfolgt werden. Bei *in vivo* NMR-Messungen konnten jedoch keine Metabolisierung des Substrats festgestellt werden. Nachteil war, daß die Kulturen für die NMR-Messungen einem langen Transport ausgesetzt waren und während den Messungen nicht unter

optimalen Bedingungen kultiviert werden konnten. Dies ist ein möglicher Grund für das Aussetzen des Alkaloidmetabolismus. Wichtig ist, daß die Kulturen neben dem Kohlenhydratmangel nicht noch zusätzlichem Streß unterliegen. Deswegen ist es notwendig, diese Experimente nochmals ohne Transport der Zellen zu wiederholen, um zu sehen, ob die Reduzierung der Kohlenhydratsignale ausreichend ist, um weitere Signale im aliphatischen Bereich eindeutig nachzuweisen.

Des weiteren kann versucht werden durch Variation von Nährmedien und physiologischen Bedingungen die Konzentrationen von Aminosäuren und Kohlenhydraten zu reduzieren.

Eine weitere Möglichkeit Hinweise auf die Strukturänderungen im aliphatischen Bereich zu bekommen, wären parallele Untersuchungen mit  $^{13}\text{C}$ - (oder auch  $^{15}\text{N}$ -) markierten und unmarkierten Präkursoren. Die markierte Gruppe kann wegen ihrer höheren Empfindlichkeit mit der NMR-Spektroskopie besser als die endogenen Stoffe erfaßt werden. Neben Änderung der chemischen Verschiebung während der Metabolisierung, könnten vielleicht mit Hilfe von 2D NMR-Techniken, wie TOCSY oder HMBC, Veränderungen der Kopplungen und der chemischen Umgebung bezüglich der markierten Gruppe nachgewiesen werden [104], [105]. Auf diese Weise ist es vielleicht möglich genügend Informationen zu erhalten, um die einzelnen Alkaloide einer Alkaloidklasse genauer zu identifizieren.

Problematisch könnte sich jedoch die Einführung eines markierten Kohlen- oder auch Stickstoffes in das Substrat gestalten. Eine Markierung durch eine Totalsynthese des betreffenden Stoffes zu erhalten, ist in vielen Fällen zu zeit- und kostenintensiv. Zudem bringen Totalsynthesen von Alkaloiden im allgemeinen nur sehr geringe Ausbeuten. Deswegen kommen für *in vivo* NMR-spektroskopische Untersuchungen mit markierten Präkursoren eher Alkaloide in Betracht, bei denen durch eine Partialsynthese ein markierter Kohlenstoff oder Stickstoff eingeführt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zum Erhalt markierter Alkaloide wären vielleicht auch Kultivierungen von Pflanzenzellen oder Wurzelkulturen in Nährmedien mit käuflich erhältlichen markierten Präkursoren des Primär- oder Sekundärstoffwechsels. Die Darstellung von markierten Anthocyaninen in *Vitis vinifera*-Zellkulturen ist z.B. auf diese Weise gelungen [160].

---

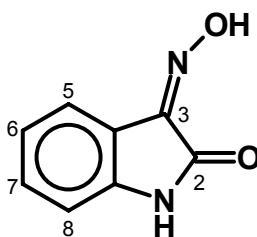
Die auf diese Art erhaltenen Verbindungen könnte aufgereinigt, bei Bedarf partialsynthetisch verändert und anschließend für *in vivo* NMR-Experimente verwendet werden.

Ein weiteres Problem, daß sich bei den *in vivo* NMR-Messungen zeigte ist die schlechtere Auflösung der Signale im Vergleich zu NMR-Spektren von Extrakten. Dadurch, daß die Messungen nicht mehr in einer idealen Flüssigkeit stattfinden, sondern in einem partiellen Festkörper kann die Linienverbreiterung auf die Anisotropie der chemischen Verschiebung zurückgeführt werden. Durch die Anwendung von Festkörper-NMR-Untersuchungen (HR-MAS) könnte dieses Problem beseitigt werden. Diese Methode ist schon erfolgreich bei Messungen an Pflanzensamen und Gewebearten von Pflanzen mit dicker Zellwand angewandt worden und brachte eine wesentlich bessere Auflösung der Signale mit sich [105]. Fraglich ist jedoch, ob auch Pflanzenzellkulturen den rigorosen Bedingungen des HR-MAS standhalten.

**V SPEKTROSKOPISCHE DATEN****Isatin-3-oxim**Summenformel:  $C_8H_6N_2O_2$ 

Molekulargewicht: 162

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.86 (FM 4, siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 18.6 min (siehe II.5.2.1, Gradient I)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

162 (100), 145 (53), 134 (8), 117 (56), 102 (14), 90 (35), 77 (13)

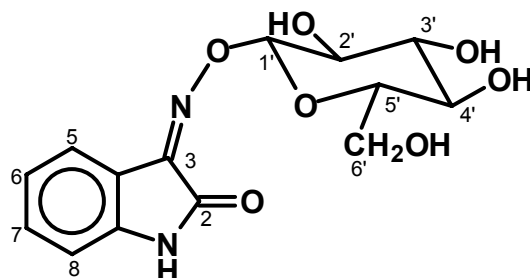
 $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :

10.68 (s, 1H, NH), 7.93 (d, 1H,  $J_{H-5/H-6}$  7.8, H-5), 7.25 (t, 1H,  $J_{H-7/H-6}$  7.8,  $J_{H-7/H-8}$  7.8, H-7), 7.00 (t, 1H,  $J_{H-6/H-7}$  7.8,  $J_{H6-/H-5}$  7.8, H-6), 6.85 (d, 1H,  $J_{H-8/H-7}$  7.8, H-8), 3.74 (s, 1H, OH)

**Isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosid**Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Molekulargewicht: 324

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.55 (FM 4, siehe II.5.1)

SR 2-Färbung: rot (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 11.9 min (siehe II.5.2.1)

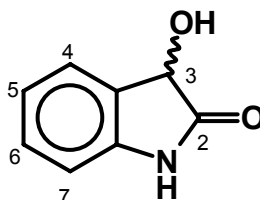
EI-MS m/z (rel. Int. %) des Tetraacetyl-isatin-3-oxim-O-β-D-glucopyranosids:  
379 (3), 331 (7), 273 (6), 169 (100), 144 (46), 118 (29), 109 (72)<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ:8.05 (d, 1H, J<sub>H-5/H-6</sub> 7.8, H-5), 7.56 (t, 1H, J<sub>H-7/H-6</sub> 7.8, J<sub>H-7/H-8</sub> 7.8, H-7), 7.23 (t, 1H, J<sub>H-6/H-7</sub> 7.8, J<sub>H-6/H-5</sub> 7.8, H-6), 7.06 (d, 1H, J<sub>H-8/H-7</sub> 7.8, H-8), 5.43 (d, 1H, J<sub>H-1'/H-2'</sub> 7.8, H-1'), 4.03 (d, 1H, J<sub>H-6'α/H-6'β</sub> 11.6, H-6'α), 3.87 - 3.54 (m, 5H, H-6'β - H-2')<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ:

161.3 (C-2), 148.1 (C-3), 143.5 (C-4), 135.1 (C-7), 129.5 (C-5), 124.5 (C-6), 116.0 (C-9), 112.3 (C-8), 106.3 (C-1'), 77.5 (C-3'), 76.7 (C-5'), 72.5 (C-2'), 70.2 (C-4'), 61.5 (C-6')

**Dioxindol (3-Hydroxy-2-oxoindol)**Summenformel:  $C_8H_7NO_2$ 

Molekulargewicht: 149

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.79 (FM 4, siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 12.8 min (siehe II.5.2.1, Gradient I), ~ 16.7 min (siehe II.5.2.1, Gradient II)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

149 (55), 133 (13), 121 (25), 98 (30), 92 (100), 81 (30), 77 (30)

 $^1\text{H-NMR}$  (800 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :

10.22 (s, 1H, NH), 7.27 (d, 1H,  $J_{\text{H-4/H-5}}$  7.5, H-4), 7.19 (t, 1H,  $J_{\text{H-6/H-5}}$  7.5,  $J_{\text{H-6/H-7}}$  7.5, H-6), 6.96 (t, 1H,  $J_{\text{H-5/H-6}}$  7.5,  $J_{\text{H-5/H-4}}$  7.5, H-5), 6.78 (d, 1H,  $J_{\text{H-7/H-6}}$  7.7, H-7), 6.14 (d, 1H,  $J_{\text{OH-3/H-3}}$  7.9, OH-3), 4.82 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/OH-3}}$  7.9, H-3)

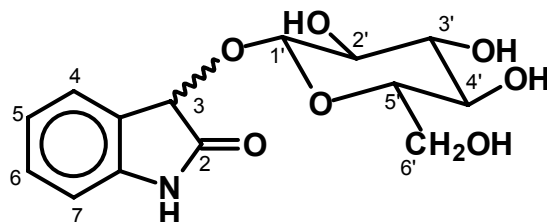
Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum. $^{13}\text{C-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):

129 (C-6), 125 (C-4), 122 (C-5), 111 (C-7), 70 (C-3)

**Dioxindol-O-β-D-glucopyranosid**Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>7</sub>

Molekulargewicht: 311

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.48 (FM 4, siehe II.5.1)

SR 2-Färbung: rot (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 10.7 und 10.9 min (siehe II.5.2.1, Gradient I), ~ 15.4 und ~ 15.8 min (siehe II.5.2.1, Gradient II)

EI-MS m/z (rel. Int. %) des Tetraacetyl-dioxindol-O-β-D-glucopyranosids:

331 (10), 252 (13), 225 (20), 209 (30), 169 (90), 148 (10), 133 (100), 109 (65)

Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Hauptkomponente. Gut voneinander separierte Signale des zweiten Steromers sind einzeln aufgelistet und mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O) δ:

7.43 (d, 1H, J<sub>H-4/H-5</sub> 7.5, H-4), 7.29 (t, 1H, J<sub>H-6/H-5</sub> 7.5, J<sub>H-6/H-7</sub> 7.5, H-6), 7.07 (t, 1H, J<sub>H-5/H-6</sub> 7.5, J<sub>H-5/H-4</sub> 7.5, H-5), 6.90 (d, 1H, J<sub>H-7/H-6</sub> 7.5, H-7), 5.29 (s, 1H, H-3\*), 5.21 (s, 1H, H-3), 4.74 (d, 1H, J<sub>H-1'/H-2'</sub> 7.9, H-1'\*), 4.64 (d, 1H, J<sub>H-1'/H-2'</sub> 7.9, H-1'), 3.80 (dd, 1H, J<sub>H-6'α/H-6'β</sub> 11.8, J<sub>H-6'α/H-5'</sub> 1.8, H-6'α\*), 3.72 (dd, 1H, J<sub>H-6'α/H-6'β</sub> 11.8, J<sub>H-6'α/H-5'</sub> 1.8, H-6'α), 3.65 (dd, 1H, J<sub>H-6'β/H-6'α</sub> 11.8, J<sub>H-6'β/H-5'</sub> 5.3, H-6'β\*), 3.61 (dd, 1H, J<sub>H-6'β/H-6'α</sub> 11.8, J<sub>H-6'β/H-5'</sub> 5.3, H-6'β), 3.37 - 3.27 (m, 4H H-2' - H-5')

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C}$ -NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

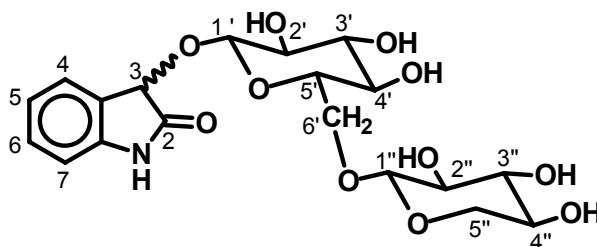
131 (C-6), 127 (C-4), 123 (C-5), 112 (C-7), 98 (C-1'), 77 (C-3'), 76 (C-3), 76 (C-5'), 72 (C-2'), 69 (C-4'), 61 (C-6')

### Dioxindol-6-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranosid

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_{11}$

Molekulargewicht: 443

Summenformel:



Rf-Wert: 0.23 (FM 4, siehe II.5.1)

SR 2-Färbung: braun (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~11.1 und ~ 11.3 min (siehe II.5.2.1, Gradient I), ~ 17.3 und ~ 17.4 min (siehe II.5.2.1, Gradient II)



Die chemischen Verschiebungen beziehen sich die Hauptkomponente. Gut voneinander separierte Signale des zweiten Stereomers sind einzeln aufgelistet und mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7.43 (d, 1H,  $J_{\text{H-4/H-5}}$  7.3, H-4), 7.29 (t, 1H,  $J_{\text{H-6/H-5}}$  7.3,  $J_{\text{H-6/H-7}}$  7.3, H-6), 7.07 (t, 1H,  $J_{\text{H-5/H-6}}$  7.3,  $J_{\text{H-5/H-4}}$  7.3, H-5), 6.90 (d, 1H,  $J_{\text{H-7/H-6}}$  7.9, H-7), 5.32 (s, 1H, H-3\* Signal von Verunreinigung überlagert), 5.21 (s, 1H, H-3), 4.76 (d, 1H,  $J_{\text{H-1'}/\text{H-2'}}$  7.9, H-1'\*), 4.64 (d, 1H,  $J_{\text{H-1'}/\text{H-2'}}$  7.9, H-1'), 4.44 (d, 1H,  $J_{\text{H-1''}/\text{H-2''}}$  7.9, H-1''\*), 4.35 (d, 1H,  $J_{\text{H-1''}/\text{H-2''}}$  7.9, H-1''), 4.03 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}'\alpha/\text{H-6}'\beta}$  11.6,  $J_{\text{H-6}'\alpha/\text{H-5}'}$  1.5, H-6' $\alpha$ \*), 3.99 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}'\alpha/\text{H-6}'\beta}$  11.6,  $J_{\text{H-6}'\alpha/\text{H-5}'}$  1.5, H-6' $\alpha$ ), 3.85 (m, 1H, 5'e von Verunreinigung überlagert), die Signalzuordnung der weiteren Signale erfolgte über ein HSQC-Spektrum, 3.75 (H-6' $\beta$ ), 3.65 (H-5''a), 3.55 (H-4''), 3.55 (H-3''), 3.45 (H-5'), 3.40 (H-4'), 3.40 (H-3'), 3.35 (H-2'), 3.30 (H-2'')

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

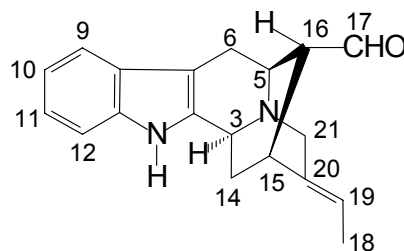
131 (C-6), 127 (C-4), 123 (C-5), 112 (C-7), 101 (C-1'), 104 (C-1''), 77 (C-3'), 77 (C-3''), 76 (C-5'), 75 (C-3), 72 (C-2'), 72 (C-2''), 69 (C-4'), 69 (C-4''), 68 (C-6'), 62 (C-5'')

## Vellosimin

Summenformel:  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_7$

Molekulargewicht: 292

Strukturformel:



Rf-Werte: 0.46 (FM 3, siehe II.5.1), 0.61 (FM 6, siehe II.5.1)

CAS-Färbung: grau (VIS) (siehe II.5.1)  
Retentionszeit: ~ 10.6 und 11.9 min (siehe II.5.2.2), ~ 13.5 und 13.8 min  
siehe II.5.2.3, Gradient I)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

292 (38), 277 (6), 263 (80), 249 (18), 235 (13), 182 (25), 169 (100), 154 (20),  
143 (10), 128 (15), 115 (23)

Das Spektrum ist aufgrund der geringen Konzentration von Vellosoimin in der Probe nicht vollständig auswertbar.

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

9.47 (deformiert, 1H, H-17), 7.47 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.7, H-9), 7.37 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.7, H-12), 7.12 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.7,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.7, H-11), 7.04 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.7,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.7, H-10), 5.45 (deformiert, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  ~ 6.5, H-19), 4.46 (deformiert, 1H, H-3), ~ 3.73 (deformiert, 2H, H-21 $\alpha$ , H-21 $\beta$ )\*, 2.91 (deformiert, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  ~ 15, H-6 $\alpha$ )\*, 2.81 (deformiert, 1H, H-16)\*, 2.72 (deformiert, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  ~ 15, H-6 $\beta$ )\*, 2.17 (deformiert, 1H, H-14 $\alpha$ )\*, 1.63 (deformiert, 1H, H-14 $\beta$ )\*, 1.52 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.5, H-18)

\*vermutete Zuordnung

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 9.57 (s, 1H, H-17), 7.35 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.7, H-9), 7.28 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.7, H-12), 7.01 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.7,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.7, H-11), 6.93 (t,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.7,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.7, H-10), 5.23 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  6.5, H-19), 4.11 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha}$  9.8, H-3), 3.49 (d, 1H,  $J_{\text{H-21}\beta/\text{H-21}\alpha}$  16.0, H-21 $\beta$ ), ~ 3.33 (1H, H-21 $\alpha$ , liegt unter  $\text{D}_2\text{O}$ -Signal), 3.14 (deformiert, 1H, H-15)\*, 2.89 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  14.5,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-5}}$  4.5, H-6), 2.44 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  14.5, H-6 $\beta$ ), 2.42 (d, 1H,  $J_{\text{H-16/H-15}}$  7.3, H-16), 1.97 (ddd 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  12.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-3}}$  10.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-15}}$  1.9, H-14 $\alpha$ ), 1.69 (dt, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  12.2,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  3.1,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-3}}$  3.1, 14 $\beta$ ), 1.55 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.5, H-18)

\*vermutete Zuordnung

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum. Die Löslichkeit des Alkaloids in  $\text{D}_2\text{O}$  war zu gering, so daß aufgrund der geringen Konzentration von Vellosoimin in der Probe nur die Signale der Aromaten mit dem angewandten Pulsprogramm detektiert wurden.

$^{13}\text{C}$ -NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

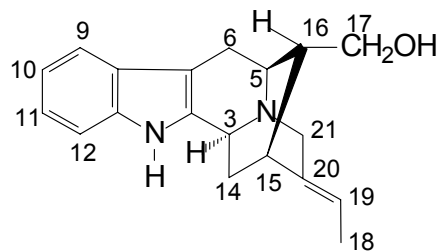
124 (C-11), 121 (C-10), 119 (C-9), 112 (C-12)

### Vellosoimol

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

Molekulargewicht: 294

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.71 (FM4, siehe II.5.1)

CAS-Färbung: grau (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 7.1 min (siehe II.5.2.2), ~ 13.1 min (siehe II.5.2.3, Gradient I), ~ 11.0 min (siehe II.5.2.3, Gradient III)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

294 (37), 293 (43), 279 (8), 263 (30), 249 (10), 235 (6), 182 (17), 168 (100), 169 (98), 156 (12), 143 (10), 129 (10), 115 (18)

Die Zuordnung erfolgte unter Verwendung der NMR-Daten von LOUNASMAA [161].

Das Spektrum ist aufgrund der geringen Konzentration von Vellosimol in der gemessenen Probe nicht vollständig auswertbar.

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7.47 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.7, H-9), 7.37 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.7, H-12), 7.12 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.7,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.7, H-11), 7.04 (dd, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.7,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.7, H-10), 5.46 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  6.6, H-19), 4.38 (deformiert, 1H, H-3), 3.67 (deformiert, 1H, H-21 $\beta$ ), 3.64 (deformiert, 1H, H-21 $\alpha$ ), 3.43 (m, 2H, H-17 $\beta$ , H-17 $\alpha$ ), 3.02 (deformiert, 2H, H-15\*, H-6 $\alpha$ ), 2.85 (deformiert, 1H, H-5\*), 2.71 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  15.2, H-6 $\beta$ ), 2.15 (deformiert, 1H, H-14 $\alpha$ ), 1.76 (deformiert, 2H, H-14 $\beta$ , H-16), 1.52 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.6, H-18)

\* vermutete Zuordnung

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum. Die Löslichkeit des Alkaloids in  $\text{D}_2\text{O}$  war zu gering, so daß aufgrund der geringen Konzentration von Vellosimol in der Probe nur die Signale der Aromaten mit dem angewandten Pulsprogramm detektiert wurden.

$^{13}\text{C-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

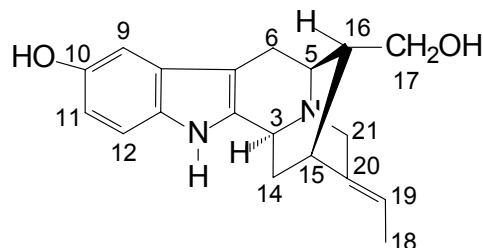
122 (C-11), 120 (C-10), 120 (C-19), 119 (C-9), 112 (C-12)

## Sarpagin

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulargewicht: 310

Strukturformel:



CAS-Färbung: violett (VIS) (siehe II.5.1)

Rf-Wert: 0.61 (FM 4, siehe II.5.1)  
Retentionszeit: ~ 3.8 min (siehe II.5.2.2), ~ 10.1 min (siehe II.5.2.3),  
~ 6.7 min (siehe II.5.2.3, Gradient III)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

310 (60), 309 (63), 279 (45), 265 (13), 251 (10), 237 (5), 198 (17), 185 (100),  
171 (20), 155 (23), 146 (10), 129 (13)

Die Zuordnung erfolgte unter Verwendung der NMR-Daten von LOUNASMAA [161].

Das Spektrum ist aufgrund der geringen Konzentration von Sarpagin in der gemessenen Probe nicht vollständig auswertbar.

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7.22 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.8, H-12), 6.86 (s, 1H, H-9), 6.67 (d, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.8, H-11), 5.45 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  6.6, H-19), 4.32 (deformiert, 1H, H-3), 3.62 (deformiert, 1H, H-21 $\beta$ ), 3.58 (deformiert, 1H, H-21 $\alpha$ ), 3.41 (m, 2H, H-17), 3.02 (deformiert, 2H, H-6 $\alpha$ , H-15\*), 2.81 (deformiert, 1H, H-5\*), 2.61 (deformiert, 1H, dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  ~ 15,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5}}$  ~ 1, H-6 $\beta$ ), 2.15 (deformiert, 1H, 14 $\alpha$ ), 1.76 (deformiert, 1H, H-16), 1.70 (deformiert, d, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  ~ 12, H-14 $\beta$ ), 1.51 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.7, H-18)

\*vermutete Zuordnung

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ :

10.4 (s, 1H, OH-10), 7.03 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  8.5, H-12), 6.95 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-11}}$  2.2, H-9), 6.50 (dd, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  8.5,  $J_{\text{H-11/H-9}}$  2.2, H-11), 5.30 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  6.7, H-19), 3.96 (dd, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha}$  10.2,  $J_{\text{H-3/H-14}\beta}$  1.9, H-3), 3.43 (d, 1H,  $J_{\text{H-21}\beta/\text{H-21}\alpha}$  16, H-21 $\beta$ ), 3.33 (1H, H-21 $\alpha$ , liegt unter  $\text{D}_2\text{O}$ -Signal), 3.28 (m, 1H, H-17), 3.23 (m, 1H, H-17), 2.71 (dd, 2H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  14.5,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-5}}$  4.5, H-15\*, H-6 $\alpha$ , ), 2.39 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  14.5, H-6 $\beta$ ), 1.90 (ddd 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  12.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-3}}$  10.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-15}}$  2, H-14 $\alpha$ ), 1.62 (q, 1H,  $J_{\text{H-16/H-17}\alpha}$  7.3,  $J_{\text{H-16/H-17}\beta}$  7.3, H-16), 1.56 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.7, H-18), 1.53 (dt, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$ , 12.2,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  3.1,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-3}}$  3.1, H-14 $\beta$ )

\*vermutete Zuordnung

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum. Die Löslichkeit des Alkaloids in  $\text{D}_2\text{O}$  war zu gering, so daß aufgrund der geringen Konzentration von Sarpagin in der Probe nur die Signale der Aromaten mit dem angewandten Pulsprogramm detektiert wurden.

$^{13}\text{C}$ -NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

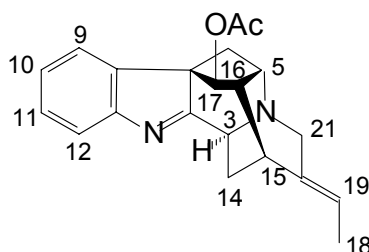
116 (C-19), 112 (C-12), 111 (C-10), 103 (C-9)

### Vinorin

Summenformel:  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$

Molekulargewicht: 334

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.80 (FM 3, siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 14.8 (siehe II.5.2.3, Gradient I), ~ 13.8 min (siehe II.5.2.3, Gradient III)

EI-MS  $m/z$  (rel. Int. %):

334 (28), 291 (31), 275 (33), 247 (10), 233 (8), 206 (5), 182 (28), 168 (100), 154 (12), 140 (10), 115 (14)

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der Daten von PFITZNER [162].

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.47 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}} 7.7$ , H-9), 7.46 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}} 7.7$ , H-12), 7.35 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-11/H-10}} 7.7$ , H-11), 7.22 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-10/H-9}} 7.7$ , H-10), 5.28 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}} 6.9$ , H-19), 4.03 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha} 9.9$ , H-3), 3.43 - 3.38 (m, 3H, H-21 $\alpha$ , H-21 $\beta$ , H-5), 3.15 (H-15 liegt unter dem MeOD-d<sub>4</sub>-Signal), 2.75 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha} 12.8$ ,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5}} 4.6$ , H-6 $\beta$ ), 2.49 (t, 1H,  $J_{\text{H-16/H-17}} 6.3$ ,  $J_{\text{H-16/H-5}} 6.3$ , H-16), 2.06 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.89 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta} 14.3$ ,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-3}} 9.9$ , H-14 $\alpha$ ), 1.81 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha} 14.3$ ,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}} 4.9$ , H-14 $\beta$ ), 1.51 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}} 6.9$ , H-18), 1.42 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta} 12.8$ , H-6 $\alpha$ ), das Signal H-17 liegt in dem ppm-Bereich (~ 5 ppm) der Wasserunterdrückung

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOH-d}_4$ )  $\delta$ :

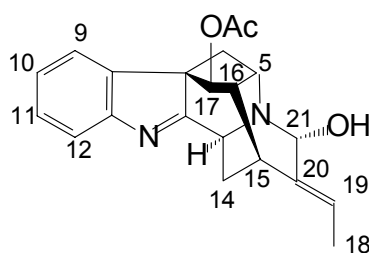
129 (C-11), 126 (C-10), 124 (C-9), 120 (C-12), 116 (C-19), 78 (C-17), 58 (C-5), 55 (C-3), 52 (C-21), 48 (C-16), 36 (C-6), 27 (C-15), 25 (C-14), 20 (-OCOCH<sub>3</sub>), 12 (C-18)

### Vomilenin

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$

Molekulargewicht: 350

Strukturformel:



Retentionszeit: ~ 14.4 min (siehe II.5.2.3, Gradient I), ~ 9.5 min (siehe II.5.2.3, Gradient III)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

350 (10), 333 (3), 322 (3), 307 (6), 291 (5), 267 (4), 247 (3), 234 (2), 219 (3),  
207 (5), 182 (14), 169 (100), 156 (8), 128 (4), 115 (7)

Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte mit Hilfe der Daten von TAKAYAMA [138] und BATISTA [163].

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.51 (d, 2H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.5,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.5, H-12, H-9), 7.37 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.5,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.5, H-11), 7.23 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.5,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.5, H-10), 5.65 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  6.3, H-19), 5.07 (s, 1H, H-21), 5.01 (s, 1H, H-17), 4.27 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha}$  9.7, H-3), 3.30 (t, 1H,  $J_{\text{H-5/H-6}\beta}$  5.2,  $J_{\text{H-5/H-16}}$  5.2, H-5), 2.89 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  12.2,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5}}$  5.2, H-6 $\beta$ ), 2.59 (t, 1H,  $J_{\text{H-16/H-15}}$  5.2,  $J_{\text{H-16/H-5}}$  5.2, H-16), 2.09 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.86 (deformiert, 1H, H-14 $\alpha$ ), 1.79 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  14.9,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  5.2, H-14 $\beta$ ), 1.59 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.3, H-18), 1.45 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  12.2, H-6 $\alpha$ ), H-15 liegt unter dem MeOD-d<sub>4</sub>-Signal

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

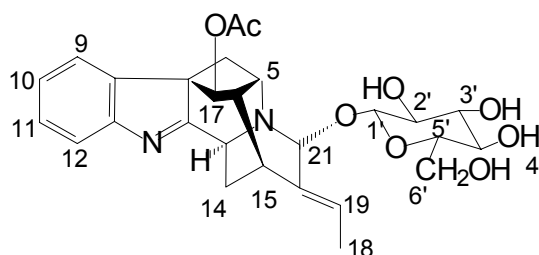
129 (C-11), 126 (C-10), 124 (C-9), 121 (C-19), 120 (C-12), 92 (C-21), 78 (C-17), 55 (C-3), 51 (C-5), 48 (C-16), 36 (C-6), 27 (C-15), 25 (C-14), 20 (-OCOCH<sub>3</sub>), 12 (C-18)

## Raucaffricin

Summenformel:  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8$

Molekulargewicht: 512

Strukturformel:





Retentionszeit: ~ 12.3 min (siehe II.5.2.3, Gradient I), ~ 4.2 min (siehe II.5.2.3, Gradient III)  
Rf-Wert: 0.48 (FM 4, siehe II.5.1)  
CAS-Färbung: rot (VIS) (siehe II.5.1)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

379 (8), 351 (22), 333 (8), 307 (20), 291 (18), 279 (13), 273 (11), 246 (10), 171 (20), 169 (100), 156 (25), 146 (10), 127 (14), 115 (13)

Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte unter Einbeziehung der Daten von SCHÜBEL [136].

$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7.54 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.5, H-9), 7.53 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.5, H-12), 7.40 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.5,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.5, H-11), 7.25 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.5,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.5, H-10), 5.72 (q, 1H,  $J_{\text{H-19/H-18}}$  7.1, H-19), 5.06 (s, 1H, H-21), 4.98 (s, 1H, H-17), 4.63 (d, 1H,  $J_{\text{H-1'/H-2'}}$  7.9, H-1'), 4.38 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha}$  9.5, H-3), 3.81 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  12.5,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-5'}}$  2, H-6' $\alpha$ ), 3.63 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  12.5,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5'}}$  6.1, H-6' $\beta$ ), 3.30 (m, 3H, H-5', H-4', H-3'), 3.24 (t, 1H,  $J_{\text{H-2'/H-3'}}$ ,  $J_{\text{H-2'/H-1'}}$  8.0, H-2'), 3.20 (m, 2H, H-15, H-5), 2.84 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  12.5,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5}}$  4.3, H-6' $\beta$ ), 2.53 (t, 1H,  $J_{\text{H-16/H-17}}$  6.1,  $J_{\text{H-16/H-5}}$  6.1, H-16), 2.12 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.94 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta}$  14.8,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-3}}$  9.5, H-14 $\alpha$ ), 1.84 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  14.8,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  4.9, H-14 $\beta$ ), 1.64 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  7.1, H-18), 1.55 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  12.5, H-6' $\alpha$ )

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

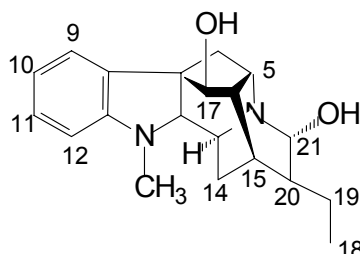
$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  + 10% MeOD- $d_4$ )  $\delta$ :

129 (C-11), 126 (C-10), 126 (C-19), 124 (C-9), 120 (C-12), 100 (C-1'), 92 (C-21), 78 (C-17), 77 (C-3'), 76 (C-5'), 72 (C-2'), 69 (C-4'), 61 (C-6'), 57 (C-3), 51 (C-5), 48 (C-16), 36 (C-6), 26 (C-15), 25 (C-14), 20 (-OCOCH<sub>3</sub>), 12 (C-18)

**Ajmalin**Summenformel:  $C_{20}H_{26}N_2O_2$ 

Molekulargewicht: 326

Strukturformel:



CAS-Färbung: rot (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 15 min (siehe II.5.2.3, Gradient III), ~ 17.8 min (siehe II.5.2.4)

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der Daten von JOKELA [164] und DANIELI [165].

Die Bestimmung der Kopplungskonstanten war aufgrund der schlechten Auflösung des Protonenspektrums nicht bei jedem Signal möglich.

 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.34 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}} 7.5$ , H-9), 7.08 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}} 7.5$ ,  $J_{\text{H-11/H-10}} 7.5$ , H-11),  
 6.74 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}} 7.5$ ,  $J_{\text{H-10/H-9}} 7.5$ , H-10), 6.67 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}} 7.5$ , H-12),  
 4.43 (s, 2H, H-21, H-17), 3.65 (deformiert, 1H, H-3), 3.16 (deformiert, 1H,  
 H-5), 2.63 (s, 3H,  $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 2.57 (deformiert, 1H, H-2), 2.31 (deformiert, 1H,  
 H-15), 2.11 (deformiert, 1H, H-16), 1.85 (deformiert, 2H, H-6) 1.79 (deformiert,  
 1H, H-14 $\alpha$ ), 1.62 (deformiert, 1H, H-14 $\beta$ ), 1.55 (deformiert, 1H, H-20), 1.39  
 (deformiert, 2H, H-19 $\beta$ , H-19 $\alpha$ ), 0.88 (t, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}\beta} 7.5$ ,  $J_{\text{H-18/H-19}\alpha} 7.5$ , H-18)

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

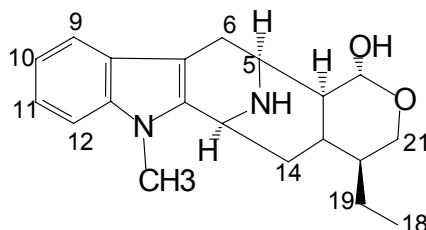
 $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

128 (C-11), 123 (C-9), 120 (C-10), 110 (C-12), 87 (C-21), 78 (C-2), 77 (C-17),  
 53 (C-5), 49 (C-20), 44 (C-16), 43 (C-3), 34 ( $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 34 (C-6), 30 (C-14),  
 28 (C-15), 24 (C-19), 11 (C-18)

**Raumaclin**Summenformel:  $C_{20}H_{26}N_2O_2$ 

Molekulargewicht: 326

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.61 (FM 6, siehe II.5.1)

CAS-Färbung: grün-grau (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 24.5 min (siehe II.5.2.4)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

326 (18), 237 (4), 224 (10), 196 (8), 183 (100), 168 (23), 153 (7), 144 (9), 115 (5)

Die Zuordnung der Daten erfolgte mit Hilfe der Daten von POLZ [141].

 $^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.46 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.7, H-9), 7.35 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.7, H-12), 7.16 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.7,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.7, H-11), 7.05 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.7,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.7, H-10), 4.73 (1H, H-3, liegt unter dem Wassersignal), 4.56 (d, 1H,  $J_{\text{H-17/H-16}}$  8.9, H-17), 3.91 (m, 1H, H-5), 3.80 (dd, 1H,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-21}\beta}$  11.6,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-20}}$  4.1, H-21 $\alpha$ ), 3.57 (s, 3H,  $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 3.07 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  16.7,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-5}}$  7.1, H-6 $\alpha$ ), 3.03 (t, 1H,  $J_{\text{H-21}\beta/\text{H-21}\alpha}$  11.6,  $J_{\text{H-21}\beta/\text{H-20}}$  11.6, H-21 $\beta$ ), 2.86 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  16.7, H-6 $\beta$ ), 2.01 (d, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta}$  12.5, H-14 $\alpha$ ), 1.69 (m, 1H, H-16), 1.63 (td, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  12.5,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  12.5,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-3}}$  4.1, H-14 $\beta$ ), 1.26 (m, 2H, H-20, H-19 $\alpha$ ), 1.13 (m, 1H, H-15), 0.69 (sep, 1H,  $J_{\text{H-19}\alpha/\text{H-19}\beta}$  14.0,  $J_{\text{H-19}\alpha/\text{H-20}}$  7.5,  $J_{\text{H-19}\beta/\text{H-18}}$  7.5, H-19 $\beta$ ), 0.52 (t, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}\beta}$  7.5,  $J_{\text{H-18/H-19}\alpha}$  7.5, H-18)

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C}$ -NMR (176 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  + 10% MeOD- $d_4$ )  $\delta$ :

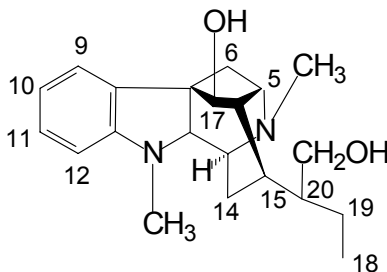
122 (C-11), 119 (C-10), 118 (C-9), 110 (C-12), 96 (C-17), 69 (C-21), 49 (C-16), 47 (C-5), 46 (C-3), 41 (C-20), 33 (C-15), 31 (C-14), 29 ( $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 20 (C-6), 20 (C-19), 10 (C-18)

### **$\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin**

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulargewicht: 342

Strukturformel:



Retentionszeit: ~ 18.4 min (siehe II.5.2.4)

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Verwendung der Daten von ENDREß [166].

Die Bestimmung einiger Kopplungskonstanten war nicht möglich, da das Spektrum Verunreinigungen mit Ajmalin aufweist. Deshalb kam es zu Überlagerungen von Signalen. Die genaue ppm-Zuordnung gelang über ein HSQC-Spektrum.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.27 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}} 7.7$ , H-9), 7.02 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-11/H-10}} 7.7$  H-11), 6.68 (dd, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-10/H-9}} 7.7$ , H-10), 7.05 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}} 7.7$ , H-12), 3.87 (s, 1H, H-17), 3.64 (dd, 1H,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-21}\beta} 12$ ,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-20}} 4$ , H-21 $\alpha$ ), 3.46 (m, H-21 $\beta$  überlagert von Signal einer Verunreinigung), 3.31 (dd, 1H,  $J_{\text{H-5/H-16}} 7.6$ ,  $J_{\text{H-5/H-6}\beta} 4.1$ , H-5), 3.25 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha} 7.1$ , H-3), 2.54 (s, 3H,  $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 2.32 (s, 3H,  $\text{N}_\beta$ -Methyl), 2.21 (m 4H, H-16, H-15, H-6 $\alpha$ , H-2), 2.02 (m, 2H, H-14 $\alpha$ , H-6 $\beta$ ), 1.70 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha} 13.5$ ,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}} 12.7$ , H-14 $\beta$ ), 1.40 (deformiert, 1H, H-20), 1.33 (sep, 1H,  $J_{\text{H-19}\alpha/\text{H-19}\beta} 14.3$ ,  $J_{\text{H-19/H-20}} 7.3$ ,  $J_{\text{H-19/H-18}} 7.3$ , H-19), 1.07 (m, 1H, H-19), 0.77 (t, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}\beta} 7.3$ ,  $J_{\text{H-18/H-19}\alpha} 7.3$ , H-18)

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

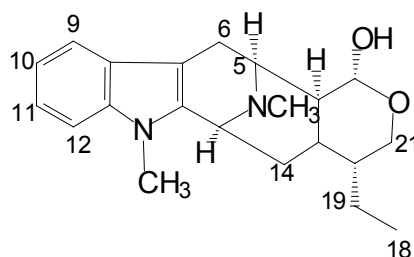
128 (C-11), 123 (C-9), 120 (C-10), 110 (C-12), 84 (C-17), 76 (C-2), 63 (C-21), 57 (C-5), 51 (C-3), 49 (C-16), 48 (C-20), 39 ( $\text{N}_\beta$ -Methyl), 36 (C-15), 35 (C-14), 34 ( $\text{N}_\alpha$ -Methyl), 28 (C-6), 23 (C-19), 12 (C-18)

### $\text{N}_\beta$ -Methyl-iso-raumaclin

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulargewicht: 340

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.75 (FM 6, siehe II.5.1)  
 CAS-Färbung: grün-grau (VIS) (siehe II.5.1)  
 Retentionszeit: ~ 24.3 min (siehe II.5.2.4)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

340 (33), 309 (2), 291 (3), 239 (5), 224 (8), 210 (7), 197 (100), 182 (30), 170 (12), 158 (8), 144 (11), 119 (9), 98 (5), 86 (15)

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Verwendung der Daten von ENDREß [137] und SCHROEDER [122].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

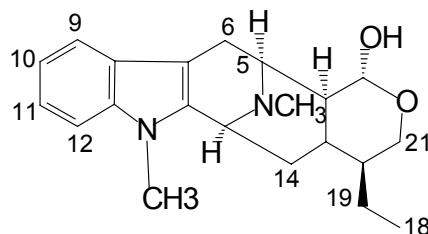
7.41 (d, 1H, J<sub>H-9/H-10</sub> 7.5, H-9), 7.35 (d, 1H, J<sub>H-12/H-11</sub> 7.5, H-12), 7.06 (t, 1H, J<sub>H-11/H-12</sub> 7.5, J<sub>H-11/H-10</sub> 7.7, H-11), 6.97 (t, 1H, J<sub>H-10/H-11</sub> 7.5, J<sub>H-10/H-9</sub> 7.5, H-10), 6.44 (d, 1H, J<sub>OH-17/H-17</sub> 6.0, OH-17), 4.32 (t, 1H, J<sub>H-17/H-16</sub> 6.0, J<sub>H-17/OH-17</sub> 6.0, H-17), 4.00 (s breit, 1H, H-3), 3.67 (d, 1H, J<sub>H-21α/H-21β</sub> 11.6, H-21α), 3.59 (s, 3H, N<sub>α</sub>-Methyl), 3.20 (m, 2H, H-5, H-21β), 2.84 (dd, 1H, J<sub>H-6α/H-6β</sub> 17.2, J<sub>H-6α/H-5</sub> 6.9, H-6α), 2.47 (H-6β liegt unter dem DMSO-d<sub>6</sub>-Signal), 2.20 (s, 3H, N<sub>β</sub>-Methyl), 1.91 (d, 1H, J<sub>H-14α/H-14β</sub> 12.5, H-14α), 1.60 (m, 1H, H-16), 1.70 (m, 1H, H-16), 1.42 (m, 3H, H-14β, H-15, H-19), 0.93 (m, 1H, H-20), 0.84 (t, 3H, J<sub>H-18/H-19β</sub> 7.5, J<sub>H-18/H-19α</sub> 7.4, H-18)

### N<sub>β</sub>-Methyl-raumaclin

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulargewicht: 340

Strukturformel:



Rf-Wert: 0.66 (FM 6, siehe II.5.1)

CAS-Färbung: grün-grau (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 26.4 min (siehe II.5.2.4)

El-MS m/z (rel. Int. %):

340 (30), 309 (1), 291 (2), 239 (4), 224 (8), 210 (5), 197 (100), 182 (25), 170 (13), 158 (9), 144 (10), 119 (7), 98 (5), 86 (17)

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Einbeziehung der Daten von SCHROEDER [122].

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

7.46 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.7, H-9), 7.35 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.7, H-12), 7.16 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.7,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.7, H-11), 7.05 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.7,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.7, H-10), 4.51 (d, 1H,  $J_{\text{H-17/H-16}}$  8.9, H-17), 4.13 (s breit, 1H, H-3), 3.78 (dd, 1H,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-21}\beta}$  11.6,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-20}}$  4.5, H-21 $\alpha$ ), 3.55 (s, 3H, N $\alpha$ -Methyl), 3.32 (deformiert, 1H, H-5), 3.01 (t, 1H,  $J_{\text{H-21}\beta/\text{H-21}\alpha}$  11.6,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-20}}$  11.6, H-21 $\beta$ ), 2.94 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-6}\beta}$  17.0,  $J_{\text{H-6}\alpha/\text{H-5}}$  6.6, H-6 $\alpha$ ), 2.59 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  17.0, H-6 $\beta$ ), 2.29 (s, 3H, N $\beta$ -Methyl), 1.91 (d, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta}$  12.5, H-14 $\alpha$ ), 1.60 (m, 1H, H-16), 1.55 (td, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta}$  12.5,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-15}}$  12.5,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-3}}$  4.1, H-14 $\beta$ ), 1.22 (m, 2H, H-20, H-19 $\alpha$ ), 0.98 (m, 1H, H-15), 0.67 (sep, 1H,  $J_{\text{H-19}\beta/\text{H-19}\alpha}$  14.3,  $J_{\text{H-19}\beta/\text{H-20}}$  7.5,  $J_{\text{H-19}\beta/\text{H-18}}$  7.5, H-19 $\beta$ ), 0.52 (t, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}\beta}$  7.5,  $J_{\text{H-18/H-19}\alpha}$  7.5, H-18)

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

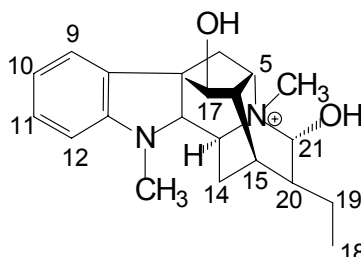
$^{13}\text{C-NMR}$  (175 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

122 (C-11), 119 (C-10), 118 (C-9), 110 (C-12), 96 (C-17), 69 (C-21), 53 (C-3), 52 (C-5), 49 (C-16), 41 (C-20), 40 (N $\beta$ -Methyl), 32 (C-15), 31 (C-14), 29 (N $\alpha$ -Methyl), 20 (C-19), 16 (C-6), 9 (C-18)

**N<sub>6</sub>-Methyl-ajmalin**Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulargewicht: 340

Strukturformel:

R<sub>f</sub>-Wert: 0.66 (FM 6, siehe II.5.1)

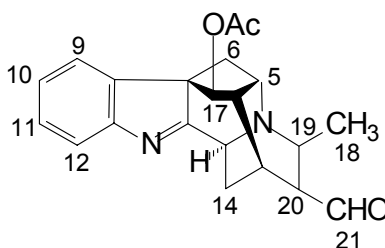
CAS-Färbung: rot verblässend (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 20.3 min (siehe II.5.2.4)

**Perakin**Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulargewicht: 350

Strukturformel:



CAS-Färbung: grau (VIS) (siehe II.5.1)

Retentionszeit: ~ 15.3 min (siehe II.5.2.4)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

350 (48), 321 (13), 307 (10), 291 (8), 279 (9), 263 (13), 251 (20), 238 (10),  
221 (13), 196 (30), 180 (25), 168 (100), 154 (13), 140 (11), 128 (9), 115 (17)



Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der Daten von BATISTA [163].

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

9.58 (s, 1H, H-21), 7.43 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}} 7.7$ , H-9), 7.41 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}} 7.7$ , H-12), 7.29 (t, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-11/H-10}} 7.7$ , H-11), 7.15 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}} 7.7$ ,  $J_{\text{H-10/H-9}} 7.7$ , H-10), 4.86 (s, 1H, H-17), 3.92 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha} 9.9$ , H-3), 3.66 (deformiert, 1H, H-5), 3.19 (H-19, ist teilweise von MeOD- $d_4$  Signal verdeckt), 2.77 (dd, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha} 12.5$ ,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-5}} 4.5$ , H-6 $\beta$ ), 2.71 (m, 2H, H-15, H-16), 2.31 (deformiert, 1H, H-20), 2.06 (s, 3H,  $-\text{OCOCH}_3$ ), 1.94 (deformiert, 1H, H-14 $\alpha$ ), 1.35 (m, 2H, H-14 $\beta$ , H-6 $\alpha$ ), 1.17 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}} 6.3$ , H-18)

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Werte erfolgte über ein HSQC-Spektrum.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ )  $\delta$ :

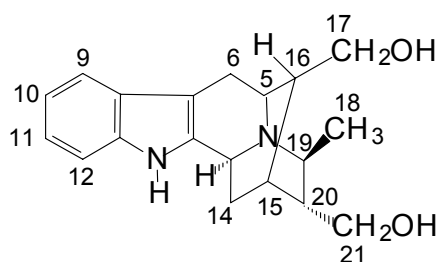
129 (C-11), 126 (C-10), 124 (C-9), 120 (C-12), 78 (C-17), 56 (C-3), 55 (C-20), 52 (C-16), 51 (C-5), 48 (C-19), 37 (C-6), 25 (C-15), 21 (C-14), 20 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 18 (C-18)

### 19(S),20(R)-Dihydroperaksin

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulargewicht: 311

Strukturformel:



Retentionszeit:  $\sim 12.5$  min (siehe II.5.2.4)

CAS-Färbung: grau (VIS)

EI-MS m/z (rel. Int. %):

312 (60), 311 (90), 281 (25), 239 (40), 208 (22), 197 (20), 181 (19), 168 (100),  
155 (20), 143 (12), 130 (14), 115 (20)

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der NMR-Daten von SHEDLUDKO [142].

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :

7.45 (d, 1H,  $J_{\text{H-9/H-10}}$  7.5, H-9) 7.33 (d, 1H,  $J_{\text{H-12/H-11}}$  7.5, H-12), 7.12 (td, 1H,  $J_{\text{H-11/H-12}}$  7.5,  $J_{\text{H-11/H-10}}$  7.5,  $J_{\text{H-11/H-9}}$  1.1, H-11), 7.04 (t, 1H,  $J_{\text{H-10/H-11}}$  7.5,  $J_{\text{H-10/H-9}}$  7.5,  $J_{\text{H-10/H-12}}$  1.1, H-10), 4.55 (d, 1H,  $J_{\text{H-3/H-14}\alpha}$  9.5, H-3), 3.87 (d, 1H,  $J_{\text{H-21}\alpha/\text{H-21}\beta}$  11.6, H-21 $\beta$ ), 3.67 (m, 3H, H-17 $\beta$ , H-17 $\alpha$ , H-5), 3.13 (m, 2H, H-6 $\alpha$ , H-15), 2.96 (d, 1H,  $J_{\text{H-6}\beta/\text{H-6}\alpha}$  16.1, H-6 $\beta$ ), 2.25 (ddd, 1H,  $J_{\text{H-14}\beta/\text{H-14}\alpha}$  12.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-3}}$  10.2,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-15}}$  2.0, H-14 $\alpha$ ), 2.12 (deformiert, 1H, H-16), 1.92 (H-20, überlagert von Verunreinigung), 2.11 (deformiert, 1H, H-16), 1.62 (dd, 1H,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-14}\beta}$  13.3,  $J_{\text{H-14}\alpha/\text{H-15}}$  2.2, H-14 $\alpha$ ), 1.46 (d, 3H,  $J_{\text{H-18/H-19}}$  6.7, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :

138.3 (C-2), 127.9 (C-8), 123.1 (C-11), 120.2 (C-10), 118.6 (C-9), 112.5 (C-12), 105.3 (C-7), 62.7 (C-17), 62.6 (C-21), 59.2 (C-19), 54.5 (C-3), 51.5 (C-5), 43.2 (C-16), 40.0 (C-20), 29.2 (C-14), 27.5 (C-6), 26.6 (C-15), 17.0 (C-18)

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Optimierung von *nicht-invasiven* 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Methoden zur Verfolgung von Biotransformationen und Biosynthesesequenzen in Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* und Zellhybriden von *Rauvolfia serpentina* x *Rhazya stricta* mit nicht markierten Vorstufen. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse.

- 1 Mit Biotransformationsversuchen an *R. serpentina*-Zellsuspensionskulturen wurde aus Isatin-3-oxim ein glucosyliertes Produkt erhalten, das als Isatin-3-oxim-O- $\beta$ -D-glucopyranosid identifiziert werden konnte. Dies ist die erste beschriebene Glucosylierungsreaktion eines Oxims durch Zellkulturen. Die Glucosylierung des Isatin-3-oxims konnte *in vivo* mit Hilfe der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an einem 800 MHz Spektrometer verfolgt werden. Es reichten 4 Scans (19 min Meßzeit) bei einer Startkonzentration des unmarkierten Substrates von 5.7 mM pro Spektrum aus, um Produkt und Edukt zu detektieren und zu identifizieren.
- 2 Mit Biotransformationsversuchen an *Rauvolfia serpentina*-Zellkulturen wurden aus Isatin die Produkte 3-Hydroxy-2-oxoindol, 3-Hydroxy-2-oxoindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, 3-Hydroxy-2-oxoindol-6-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranosid erhalten. Die *in vivo* Verfolgung der Reduktion von unmarkiertem Isatin zu 3-Hydroxy-2-oxoindol in diesen Zellen gelang mit der Protonenspektroskopie bei 800 MHz. Die anschließende Glucosylierung konnte bei einer Startkonzentration des Substrates von 4 mM mit Hilfe der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie anhand der natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit an einem 800 MHz Spektrometer verfolgt werden. Es reichten 4 Scans (19 min Meßzeit) pro Spektrum aus, um die Reaktion anhand der Änderung von sechs Signalen zu verfolgen.

- 3 Die Umsetzung des Indolalkaloids Vellosimin zu Sarpagin in Zellen von *R. serpentina* wurde mit Hilfe der invers korrelierten  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie anhand der natürlichen Häufigkeit des Kohlenstoffes an einem 800 MHz Instrument beobachtet. Pro Spektrum reichten bei einer Startkonzentration des Vellosimins von ca. 1 mM an einem 800 MHz Spektrometer 8 Scans (80 min Meßzeit) aus, um die Bildung des Sarpagins nachzuweisen. Dies ist die erste Biosynthesesequenz im pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die *in vivo* unmarkiert verfolgt werden konnte.
- 4 Biotransformationsversuche mit Vinorin in *Rauvolfia serpentina*- und *RxR*-Kulturen ergaben, daß das Alkaloid über zwei Metabolisierungswege transformiert wird. Zum einen wird es über Vomilenin zu Raucaffricin metabolisiert, zum anderen kommt es über eine Deacetylierungsreaktion zur der Bildung von Vellosimin, das weiter zu Sarpagin umgesetzt wird. Diese beiden Metabolisierungswege konnten auch *nicht-invasiv* mit Hilfe der Cryogenic Probe Technologie anhand der natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit nachvollzogen werden. Durch Anwendung der Cryo-NMR konnten auch erstmals Signale im Aliphatenbereich eines Metabolisierungsproduktes detektiert und identifiziert werden.
- 5 In *RxR*-Zellkulturen konnte der Metabolismus von unmarkiertem Ajmalin und  $\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin zu den Raumaclin-Alkaloiden unter den oben genannten Meßbedingungen *in vivo* nachgewiesen werden.
- 6 Es gelang die Metabolisierung von unmarkiertem Perakin in einer *RxR*-Zellkultur *in vivo* zu verfolgen. Die NMR-Untersuchungen ergaben, daß das Metabolisierungsendprodukt nicht wie angenommen Raucaffrinolin ist sondern ein Sarpagan-Alkaloid. Dieses Alkaloid konnte mit Fütterungsversuchen an *RxR*-Kulturen isoliert und mittels MS- und NMR-Messungen als 19(S),20(R)-Dihydroperaksin identifiziert werden.

---

**VII LITERATURVERZEICHNIS**

- 1 Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S. und Bollinger, W.H., *Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials*. Science, 1985. **228**: p. 1154-1160.
- 2 Harborne, J.B., *Biochemical aspects of plant and animal coevolution*. Vol. 15. 1978, London: Academic Press.
- 3 Haberlandt, G., *Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen*. Sitz Akad Wiss Wien, 1902. **111**: p. 69-92.
- 4 White, P.R., *Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium*. Plant Physiol, 1934. **9**: p. 585-600.
- 5 Gautheret, R.J., *Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissus de tubercules de carotte*. C R Acad Sci, 1939. **208**: p. 118-130.
- 6 Zenk, M.H., *Gewinnung von Naturstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen*, in *Forschung in der Bundesrepublik Deutschland*. 1983, Verlag Chemie: Weinheim.
- 7 Furuya, T. und Ushiyama, K., *Ginseng production in culture of Panax ginseng cells*, in *Biotechnological applications of plant cultures*, Shargool, P.D., et al., Editors. 1994, CRC Press: Cleveland, Ohio.
- 8 Ulbrich, B., Weisner, W. und Arens, R.H., in *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, Neumann, K.H., et al., Editors. 1985, Springer-Verlag: Berlin. p. 293-303.
- 9 Matsubara, K., Shigekazu, K., Yoshioka, T., Morimota, T., Fujita, Y. und Yamada, Y., *High density cultur of Coptis japonica cells increases berberin production*. J Chem Tech Biotech, 1989. **46**: p. 61-69.
- 10 Songstad, D.D., Glies, K.L., Novakovski, D., Epp, D. und Friesen, L., *Use of nurse cultures to select Papaver somniferum cell lines capable of enhanced sanguinarine production*. J Plant Physiol, 1990. **136**: p. 236-239.
- 11 Schneider, B., *Taxol ein Arzneistoff aus der Rinde der Eibe*. Deutsche Apotheker Zeitung, 1994. **134**: p. 3389-3400.
- 12 Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biediger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao,

- C., Vu, P., Tang, S., Zhang, P., Murthi, K.K., Gentile, L.N. und Liu, J.H., *First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring*. J Am Chem Soc, 1994. **116**: p. 1597-1598.
- 13 Holton, R.A., Kim, H.B., Somoza, C., Liang, F., Biediger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C., Vu, P., Tang, S., Zhang, P., Murthi, K.K., Gentile, L.N. und Liu, J.H., *First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings*. J Am Chem Soc, 1994: p. 1599-1600.
- 14 Denis, J.N., Greene, A.E., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Mangatal, L. und Potier, P., *A highly efficient, practical approach to natural taxol*. J Am Chem Soc, 1988. **110**: p. 5917-5919.
- 15 Mangatal, L., Adeline, M.T., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F. und Potier, P., *Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues*. Tetrahedron, 1989. **45**: p. 4177-4190.
- 16 Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. und Hara, Y., *Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in Taxus cell suspension cultures*. Nat Biotechnol, 1996. **14**: p. 1129-1132.
- 17 Petersen, M. und Alfermann, A.W., *The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **55**: p. 135-142.
- 18 Deus Neumann, B. und Zenk, M.H., *Instability of indole alkaloid production in Catharanthus roseus cell suspension cultures*. Planta Med, 1984. **50**: p. 427-431.
- 19 Gräther, G. und Schneider, B., *The metabolic diversity of plant cell and tissue cultures*. Progress in Botany, 2001. **62**: p. 266-304.
- 20 Suga, T., Izumi, S., Hirata, T. und Hamada, H., *Oxidoreduction between cycloalkanols and cycloalkanones in cultured cells of Nicotiana tabacum*. Chem Lett, 1987. **2**: p. 425-428.
- 21 Hirata, T., Izumi, S., Kido, T., Shimo, Y. und Ikeda, Y., *Enantioselective introduction of oxygen function into alkenes - oxidation of limonene by cultured suspension cells of Nicotiana tabacum*. Plant Tissue Cult Lett, 1993. **10**: p. 89-91.
- 22 Furuya, T., Sakamoto, K., Iida, K., Asada, Y., Yoshikawa, T., Sakai, S. und Aimi, N., *Biotransformation of tabersonine in cell suspension*

- cultures of Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 1992. **31**: p. 3065-3068.
- 23 Iwasa, K. und Kamigauchi, M., *13-Hydroxylation of tetrahydroberberine in cell suspension cultures of some Corydalis species*. *Phytochemistry*, 1996. **41**: p. 1511-1515.
- 24 Orihara, Y., Noguchi, T. und Furuya, T., *Biotransformation of (+)-camphor by cultured cells of Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, 1994. **35**: p. 941-945.
- 25 Alfermann, A.W., Schuller, I. und Reinhard, E., *Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of Digitalis lanata*. *Planta Med*, 1980. **40**: p. 169-175.
- 26 Kreis, W. und Reinhard, E., *12 $\beta$ -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured Digitalis lanata cells. Production of deacetyllanatoside C using a two-stage culture method*. *Planta Med*, 1988. **54**: p. 169-175.
- 27 Kreis, W. und Reinhard, E., *12  $\beta$ -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured Digitalis lanata cells: production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors*. *J Biotechnol*, 1992. **26(2-3)**: p. 257-273.
- 28 Kuschinsky, G. und Lüllmann, H., *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 1989, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- 29 Tang, Y.X. und Suga, T., *Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -ionones by immobilized cells of Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 1994. **37**: p. 737-740.
- 30 Lappin, G.J., Stride, J.D. und Tampion, J., *Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*, 1987. **26**: p. 995-997.
- 31 Villa, R., Molinari, F., Levati, M. und Aragozzini, F., *Stereoselective reduction of ketones by plant cell cultures*. *Biotechnol Lett*, 1998. **20**: p. 1105-1108.
- 32 Suga, T. und Hirata, T., *Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures*. *Phytochemistry*, 1990. **29**: p. 2393-2406.

- 
- 33 Kreuz, K., Tommasini, R. und Martinoia, E., *Old enzymes for a new job (herbicide detoxification in plants)*. Plant Physiol, 1996. **111**: p. 349-353.
- 34 Pflugmacher, S. und Sandermann, H., *Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics*. Phytochemistry, 1998. **49**: p. 507-511.
- 35 Sommer, J., Schroeder, C. und Stöckigt, J., *In vivo formation of vanillin glucoside*. Plant Tissue Organ Cult, 1997. **50**: p. 119-123.
- 36 Zweimüller, M., Antus, S., Kovács, T. und Sonnenbichler, J., *Biotransformation of the fungal toxin fomannoxin by Conifer cell cultures*. Biol Chem, 1997. **378**: p. 915-921.
- 37 Inomata, S., Yokoyama, M., Seto, S. und Yanagi, M., *High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of Catharanthus roseus plant cells*. Appl Microbiol Biotechnol, 1991. **36**: p. 315-319.
- 38 Lutterbach, R. und Stöckigt, J., *High-Yield formation of arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of Rauwolfia serpentina*. Helv Chim Acta, 1992. **75**: p. 2009-2011.
- 39 Yokoyama, M. und Yanagi, M., *High-level production of arbutin by biotransformation*, in *Plant cell cultures in Japan*, Komamine, A., et al., Editors. 1991, CMC Cob Ltd.: Tokyo.
- 40 Braemer, R., Tsoutsias, Y., Hurabielle, M. und Paris, M., *Biotransformations of quercetin and apigenin by a cell suspension culture of Cannabis sativa*. Planta Med, 1987. **53**: p. 225-226.
- 41 Orihara, Y., Miyatake, H. und Furuya, T., *Triglucosylation on the biotransformation of (+)-menthol by cultured cells of Eucalyptus perriniana*. Phytochemistry, 1991. **30**: p. 1843-1845.
- 42 Liu, Q., Liu, M., Mabry, T.J. und Dixon, R.A., *Flavonol glycosides from Cephalocereus senilis*. Phytochemistry, 1994. **36**: p. 229-231.
- 43 Lewinsohn, E., Berman, E., Mazur, Y. und Gressel, J., *Glucosylation and (1-6)rhamnosylation of exogenous flavonones by undifferentiated Citrus cell cultures*. Plant Sci, 1989. **61**: p. 23-28.
- 44 Orihara, Y. und Furuya, T., *Biotransformation of (-)-borneol by cultured cells of Eucalyptus perriniana*. Phytochemistry, 1993. **34**: p. 1045-1048.



- 
- 45 Orihara, Y., Furuya, T., Hashimoto, N., Deguchi, Y., Tokoro, K. und Kanisawa, T., *Biotransformation of isoeugenol and eugenol by cultured cells of Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, 1992. **31**: p. 827-831.
- 46 Furuya, T., Asada, Y., Matsuura, A., Mizibata, S. und Hamada, H., *Biotransformation of  $\beta$ -thujaplicin by cultured cells of Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, 1991. **30**: p. 1834-1845.
- 47 Ushiyama, M., Asada, Y., Yoshikawa, T. und T., F., *Biotransformation of aromatic carboxylic acids by root cultures of Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 1989. **28**.
- 48 Vederas, J.C., *The use of stable isotopes in biosynthetic studies*. *Nat Prod Rep*, 1987. **4**: p. 277-337.
- 49 Floss, H.G. und Beale, J.M., *Untersuchungen zur Biosynthese von Antibiotica*. *Angew Chem*, 1989. **101**: p. 147-179.
- 50 Eichinger, D., Bacher, A., Zenk, M.H. und Eisenreich, W., *Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: a retrobiosynthetic  $^{13}\text{C}$  NMR study on the monoterpene loganin*. *Phytochemistry*, 1999. **51**: p. 223-236.
- 51 Roberts, J.K.M., *NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants*. *Trends Plant Sci*, 2000. **5**: p. 30-34.
- 52 Grisebach, H. und Hahlbrock, K., *Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures*. *Recent Adv Phytochemistry*, 1974. **8**: p. 21-52.
- 53 Kochs, G. und Grisebach, H., *Enzymatic synthesis of isoflavones*. *Eur J Biochem*, 1986. **155**: p. 311-318.
- 54 Hashim, M.F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. und Sankawa, U., *Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis*. *FEBS Lett*, 1990. **271**: p. 219-222.
- 55 Kreis, W., Fulzele, D.P., Hoelz, H., Val, J. und Reinhard, E., *Production of cardenolides by Digitalis cell cultures - models and process options, in Plant cell tissue culture and gene manipulation for breeding and formation of phytochemicals*, Oono, K., et al., Editors. 1992, NIAR: Japan.

- 56 Hartmann, T. und Witte, L., *Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids*, in *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, Pelletier, S.W., Editor. 1995, Elsevier Science: Oxford.
- 57 Wink, M. und Hartmann, T., *Enzymology of quinolizidine alkaloid biosynthesis*. Stud Org Chem, 1985. **20**: p. 511-520.
- 58 Siddiqui, S. und Siddiqui, R.H., *Chemical examination of the roots of Rauwolfia serpentina Benth. ex Kurz*. J Indian Chem Soc, 1931. **8**: p. 667-680.
- 59 Kleinsorge, H., *Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Rauwolfia Alkaloids Ajmalin bei Herzrhythmus-Störungen, insbesondere bei Extrasystolie*. Med Klin, 1959. **54**: p. 409-412.
- 60 Robinson, R., *Further observations on the chemistry of ajmaline*. Chem Ind, 1955: p. 285-286.
- 61 Woodward, R.B., *Neuere Entwicklungen in der Chemie der Naturstoffe*. Angew Chem, 1956. **68**: p. 13-20.
- 62 Bartlett, M.F., Sklar, R., Taylor, W.I., Schlitter, E., Amai, R.L.S., Beak, P., Bringti, N.V. und Wenkert, E., *Rauwolfia alkaloids XXXVIII. Stereospecific degradations leading to the absolute configurations and structures of ajmaline, sarpagine and corynantheidine*. J Am Chem Soc, 1962. **84**: p. 622-630.
- 63 Masamune, S., Ang, S.K., Egli, C., Nakatsuka, N., Sarkar, S.K. und Yasunari, Y., *The synthesis of ajmaline*. J Am Chem Soc, 1967. **89**: p. 2506-2507.
- 64 Mashimo, K. und Sato, Y., *On the synthesis of ajmaline*. Tetrahedron Lett., 1969. **11**: p. 905-906.
- 65 Van Tamelen, E.E. und Olivier, L.K., *The biogenetic type total synthesis of ajmaline*. J Am Chem Soc, 1970. **92**: p. 2136-2137.
- 66 Wang, T., Qingge, X., Yu, P., Xiaoxiang, L. und Cook, J.M., *Stereocontrolled total synthesis of alkaloid G via the oxy-anion cope rearrangement and improved total synthesis of (+)-ajmalin*. Org Lett, 2000. **3**: p. 345-348.
- 67 Stöckigt, J., Pfitzner, A. und Firl, J., *Indole alkaloids form cell suspension cultures of Rauwolfia serpentina Benth*. Plant Cell Rep, 1983. **1**: p. 36-39.

- 68 Schübel, H., Ruyter, C.M. und Stöckigt, J., *Improved production of raucaffricine by cultivated Rauwolfia cells*. *Phytochemistry*, 1989. **28**: p. 491-494.
- 69 Stöckigt, J., Lansing, A., Falkenhagen, H., Endreß, S. und Ruyter, C.M., *Plant cell cultures - a source of novel phytochemicals and enzymes*, in *Plant tissue cultures and gene manipulation for breeding and formation of phytochemicals*, Oono, K., et al., Editors. 1992, Niar: Japan.
- 70 Pfitzner, A. und Stöckigt, J., *Polyneuridine aldehyde esterase: an unusually specific enzyme involved in the biosynthesis of sarpagine type alkaloids*. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1983: p. 459-460.
- 71 Pfitzner, A. und Stöckigt, J., *Characterization of polyneuridine aldehyde esterase, a key enzyme involved in the biosynthesis of sarpagine/ajmaline type alkaloids*. *Planta Med*, 1983. **48**: p. 221-227.
- 72 Pfitzner, A., Polz, L. und Stöckigt, J., *Properties of vinorine synthase - the Rauwolfia enzyme involved in the formation of the ajmaline skeleton*. *Z Naturforsch*, 1986. **41c**: p. 103-114.
- 73 Stöckigt, J., Pfitzner, A. und Keller, P.I., *Enzymatic formation of ajmaline*. *Tetrahedron Lett*, 1983. **24**: p. 2485-2486.
- 74 Polz, L., Schübel, H. und Stöckigt, J., *Characterisation of 2 $\beta$ -(R)-17-O-acetyljmalan acetylerase - a specific enzyme involved in the biosynthesis of the Rauwolfia alkaloid ajmaline*. *Z Naturforsch*, 1987. **42**: p. 333-342.
- 75 Falkenhagen, H. und Stöckigt, J., *Enzymatic biosynthesis of vomilenine, a key intermediate of the ajmaline pathway catalyzed by a novel cytochrome P450 dependent enzyme from plant cell cultures of Rauwolfia serpentina*. *Z Naturforsch*, 1995. **50c**: p. 45-53.
- 76 Falkenhagen, H., Polz, L., Takayama, H., Kitajima, M., Sakai, S.-I., Aimi, N. und Stöckigt, J., *Substrate specificity of vinorine hydroxylase, a novel membrane bound key enzyme of Rauwolfia indole alkaloid biosynthesis*. *Heterocycles*, 1995. **41**: p. 2683-2690.
- 77 Stöckigt, J., *Biosynthesis in Rauwolfia serpentina - modern aspects of an old medicinal plant*, in *The alkaloids*, Cordell, O.G.A., Editor. 1995, Academic Press: New York.

- 78 von Schumann, G., Gao, S. und Stöckigt, J., *Vomilenine reductase - a novel enzyme catalyzing a crucial step in the biosynthesis of the therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**: p. 1913-1918.
- 79 Warzecha, H., Obitz, P. und Stöckigt, J., *Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- $\beta$ -D-glucosidase from plant cell cultures of Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry*, 1999. **50**: p. 1099-1109.
- 80 Warzecha, H., Gerasimenko, I., Kutchan, T.M. und Stöckigt, J., *Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis*. *Phytochemistry*, 2000. **54**: p. 657-666.
- 81 Gerasimenko, I., Sheludko, Y., Ma, X. und Stockigt, J., *Heterologous expression of a Rauwolfia cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**: p. 2204-2213.
- 82 Dogru, E., Warzecha, H., Seibel, F., Haebel, S., Lottspeich, F. und Stockigt, J., *The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the  $\alpha/\beta$  hydrolase super family*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**: p. 1397-1406.
- 83 Kutchan, T.M., Hampp, N., Lottspeich, F., Beyreuther, K. und Zenk, M.H., *The cDNA clone for strictosidine synthase from Rauwolfia serpentina. DNA sequence determination and expression in Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1988. **237**: p. 40-44.
- 84 Kutchan, T.M., *Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant Rauwolfia serpentina in Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1989. **257**: p. 127-130.
- 85 Kutchan, T.M., Bock, A. und Dittrich, H., *Heterologous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture*. *Phytochemistry*, 1994. **35**: p. 353-360.
- 86 Kutchan, T.M., *Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene*. *Phytochemistry*, 1993. **32**: p. 493-506.

- 87 Bayer, A., et al., unpublished.
- 88 Ruppert, M., et al., unpublished.
- 89 Roberts, J.K.M., *Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy*. Ann Rev Plant Physiol, 1984. **35**: p. 375-386.
- 90 Morris, P.G., *NMR-Spectroscopy in living systems*, in *Annual reports on NMR spectroscopy*, Webb, G.A., Editor. 1988, Academic Press: San Diego.
- 91 Moon, R.B. und Richards, J.H., *Determination fo intracellular pH by  $^{31}\text{P}$  magnetic resonance*. J Bio Chem, 1973. **248**: p. 7276-7278.
- 92 Navon, G., Ogawa, S., Shulman, R.G. und Yamane, T., *High-resolution  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance studies of metabolism in aerobic Escherichia coli cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**: p. 888-891.
- 93 Agris, P.F. und Campbell, I.D., *Proton nuclear magnetic resonance of intact Friend leukemia cells: phosphorylcholine increase during differentiation*. Science, 1982. **216**: p. 1325-1327.
- 94 Rabenstein, D.L.,  *$^1\text{H}$  NMR methods for the noninvasive study of metabolism and other processes involving small molecules in intact erythrocytes*. J Biochem Biophys Methods, 1984. **9**: p. 277-306.
- 95 Fan, T.W.M., Higashi, R.M. und Lane, A.N., *Monitoring of hypoxic metabolism in superfused plant tissues by in vivo  $^1\text{H}$ -NMR*. Arch Biochem Biophys, 1986. **251**: p. 674-687.
- 96 Ford, Y.Y., Fox, G.G., Ratcliffe, R.G. und Robins, R.J., *In vivo  $^{15}\text{N}$  NMR studies of secondary metabolism in transformed root cultures of Datura stramonium and Nicotiana tabacum*. Phytochemistry, 1994. **36**: p. 333-339.
- 97 Ford, Y.Y., Ratcliffe, R.G. und Robins, R.J., *In vivo nuclear-magnetic-resonance analysis of polyamine and alkaloid metabolism in transformed root cultures Datura stramonium L.: evidence for the involvement of putrescine in phytohormone-induced de-differentiation*. Planta, 1996. **205**: p. 205-213.
- 98 Gout, E., Bligny, R., Genix, P., Tissut, M. und Douce, R., *Effect of glyphosate on plant cell metabolism.  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR studies*. Biochimie, 1992. **74**: p. 875-882.

- 
- 99 Gout, E., Bligny, R., Pascal, N. und Douce, R., *<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 3986-3992.
- 100 Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A.A. und Douce, R., *Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies*. Plant Physiol, 2000. **123**: p. 287-296.
- 101 Rijhwani, S.K., Ho, C.H. und Shanks, J.V., *In vivo <sup>31</sup>P and multilabel <sup>13</sup>C NMR measurements for evaluation of plant metabolic pathways*. Metab Eng, 1999. **1**: p. 12-25.
- 102 Bastianoni, S., Donati, A., Gastaldelli, A., Marchettini, N., Martini, S. und Rossi, C., *A modellistic view of the kinetics of metabolic processes: differences in the glucose and xylose degradation pathway*. Chem Phys Lett, 1999. **310**: p. 38-42.
- 103 Schneider, B., *In-vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy of low-molecular-weight compounds in plant cells*. Planta, 1997. **203**: p. 1-8.
- 104 Shachar-Hill, Y., *Nuclear magnetic resonance and plant metabolic engineering*. Metab Eng, 2002. **4**: p. 90-97.
- 105 Ratcliffe, R.G. und Shachar-Hill, Y., *Probing Plant Metabolism with NMR*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2001. **52**: p. 499-526.
- 106 Lutterbach, R. und Stöckigt, J., *In vivo investigation of plant-cell metabolism by means of natural abundance <sup>13</sup>C-NMR-Spectroscopy*. Helv Chim Acta, 1994. **77**: p. 2153-2161.
- 107 Lutterbach, R. und Stöckigt, J., *Dynamics of the biosynthesis of methylursubin in plant cells employing in vivo <sup>13</sup>C-NMR without labelling*. Phytochemistry, 1995. **40**: p. 801-806.
- 108 Schroeder, C., Lutterbach, R. und Stöckigt, J., *Preparative biosynthesis of natural glucosides and fluorogenic substrates for  $\beta$ -glucosidases followed by in vivo <sup>13</sup>C-NMR with high density plant cell cultures*. Tetrahedron, 1996. **52**: p. 925-934.
- 109 Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E. und Germann, M.W., *Following plant metabolism in vivo and in extracts with heteronuclear two-dimensional*

- nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Anal Biochem, 1996. **243**: p. 110-118.
- 110 Kessler, H., Gehrke, M. und Griesinger, C., *Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente*. Angew Chem, 1988. **100**: p. 507-554.
- 111 Sommer, J., *Pflanzliche Glucosyltransferase-Reaktionen: Präperative Synthese isotopenmarkierter UDP-Glucose und Glucosetransfer in vivo und in vitro auf Vanillin und Vomilenin*, Dissertation, 1996, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 112 Schroeder, C., Sommer, J., Humpfer, E. und Stöckigt, J., *Inverse correlated  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  in vivo NMR as a probe to follow the metabolism of unlabeled vanillin by plant cell cultures*. Tetrahedron, 1997. **53**: p. 927-934.
- 113 Serber, Z. und Dotsch, V., *In-cell NMR spectroscopy*. Biochemistry, 2001. **40**: p. 14317-14323.
- 114 Moskau, D., Richter, C., Kovacs, H., Salzmann, M., Baselgia, L., Häberli, M., Marek, D. und Schett, O., *Highest sensitivity for cutting-edge NMR applications: 600 MHz CryoProbes<sup>TM</sup>*. BRUKER Report, 2001. **149**: p. 19-21.
- 115 <http://www.bruker-biospin.com/nmr/products/lcrp.html>
- 116 Serber, Z., Richter, C., Moskau, D., Boehlen, J.M., Gerfin, T., Marek, D., Häberli, M., Baselgia, L., Laukien, F., Stern, A.S., Hoch, J.C. und Dötsch, V., *New carbon-detected protein NMR experiments using CryoProbes*. J Am Chem Soc, 2000. **112**: p. 3354.
- 117 Bringmann, G., Wohlfahrt, M., Rischer, H., Grüne, M. und Schlauer, J., *A new biosynthetic pathway to alkaloids in plants: acetogenic isoquinolines*. Angew Chem Int Ed, 2000. **39**: p. 1464-1466.
- 118 Linsmaier, E.M. und Skoog, F., *Organic growth factor requirements of Tobacco tissue cultures*. Physiol Plant, 1965. **18**: p. 100-127.
- 119 Gamborg, O.L., Miller, R.A. und Ojima, K., *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp Cell Res, 1968. **50**: p. 151-158.

- 
- 120 Still, W.C., Kahn, M. und Mitra, A., *Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution*. J Org Chem, 1978. **43**: p. 2923-2929.
- 121 Lutterbach, R. und Stöckigt, J., *p-Hydroxyphenyl-O- $\beta$ -D-primeveroside, a novel glykoside formed from hydroquinone by cell suspension cultures of Rauwolfia serpentina*. J Nat Prod, 1993. **56**: p. 1421-1422.
- 122 Schroeder, C., *Enzymatische Umsetzungen, Biotransformationen und in vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen mit pflanzlichen und tierischen Zellen*, Dissertation, 1998, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- 123 Hesse, M., H. Meier, H. und Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*. 1987, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- 124 Glover, V., Halket, J.M., Watkins, P.J., Clow, A., Goodwin, B.L. und Sandler, M., *Isatin: identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin*. J Neurochem, 1988. **51**: p. 656-659.
- 125 Kumar, R., Bansal, R.C. und Mahmood, A., *Isatin, an inhibitor of acetylcholinesterase activity in rat brain*. Biogenic Amines, 1993. **9**: p. 281-289.
- 126 Medvedev, A.E., Clow, A., Sandler, M. und Glover, V., *Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines?* Biochem Pharmacol, 1996. **52**: p. 385-391.
- 127 Glover, V., Bhattacharya, S.K., Chakrabarti, A. und Sandler, M., *The psychopharmacology of isatin: a brief review*. Stress med, 1998. **14**: p. 225-229.
- 128 Akerfeldt, S., Westin, G. und Jansson, T., *Aromatic sulfonic acids as viral inhibitors. Structure-activity study using rhino, adeno 3, herpes simplex, and influenza viruses*. J Med Chem, 1971. **14**: p. 595-600.
- 129 Popp, F.D., *The chemistry of isatin*, in *Advances in heterocyclic chemistry*, Katrizky, A.R., et al., Editors. 1975, Academic Press: New York.
- 130 Pandeya, S.N., Sriram, D., Nath, G. und De Clercq, E., *Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of isatin derivatives with 3-amino-2-methylmercapto quinazolin-4(3H)-one*. Pharm Acta Helv, 1999. **74**: p. 11-17.



- 131 Pandeya, S.N., Sriram, D., Nath, G. und DeClercq, E., *Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide*. Eur J Pharm Sci, 1999. **9**: p. 25-31.
- 132 Popp, F.D., Parson, R. und Donigan, B.E., *Synthesis of potential anticonvulsants: condensation of isatins with acetone and related ketones*. J Pharm Sci, 1980. **69**: p. 1235-1237.
- 133 Tomchin, A.B., Zhmykhova, I.L., Ponomareva, M.M., Pastushenkov, L.G. und Gromova, E.G., *Heterocyclic semicarbazones and thiosemicarbazones. XLIX. Antiinflammatory activity of isatin thiosemicarbazones and their cyclization products*. Pharm Chem J, 1986. **20**: p. 619-624.
- 134 Thompson, A.M., Rewcastle, G.W., Terzel, M., Dobrusin, E.M., Fry, D.W., Kraker, A.J. und Denny, W.A., *Tyrosine kinase inhibitors. 1. Structure-activity relationships for inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by 2,3-dihydro-2-thioxo-1H-indole-3-alkanoic acids and 2,2'-dithiobis(1H-indole-3-alkanoic acids)*. J Med Chem, 1993. **36**: p. 2459-2469.
- 135 Usami, N., Kitahara, K., Ishikura, S., Nagano, M., Sakai, S. und Hara, A., *Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite*. Eur J Biochem, 2001. **268**: p. 5755-5763.
- 136 Schübel, H., Treiber, A. und Stöckigt, J., *Structure revision of the Rauwolfia alkaloid raucaffricine*. Helv Chim Acta, 1984. **67**: p. 2078-2081.
- 137 Endreß, S., Takayama, H., Suda, S., Kitajima, M., Aimi, N. und Sakai, S.-I., *Alkaloids from Rauwolfia serpentina cell cultures treated with ajmaline*. Phytochemistry, 1993. **32**: p. 725-739.
- 138 Takayama, H., Kitajima, M., Suda, S., Aimi, N., Skai, S.-I., Endreß, S. und Stöckigt, J., *Structure and synthesis of a new indole alkaloid 19(S)-Hydroxy-N<sub>β</sub>-methylraumacline, obtained by the biotransformation of ajmaline in plant cell cultures*. Tetrahedron, 1992. **48**: p. 2627-2634.
- 139 Endreß, S., Suda, S., Takayama, H., Aimi, N., Sakai, S.-I. und Stöckigt, J., *Identification and chemical synthesis of 6 $\alpha$ -Hydroxyraumacline: a*

- novel alkaloid from cultivated Rauwolfia serpentina cells*. *Planta Med*, 1992. **58**: p. 410-412.
- 140 Obitz, P., Endreß, S. und Stöckigt, J., *Enzymatic biosynthesis of raumaclin*. *Phytochemistry*, 1995. **40**: p. 1407-1417.
- 141 Polz, L., Stöckigt, J., Takayama, H., Uchida, N., Aimi, N. und Sakai, S.-I., *Biotransformation of ajmaline in plant cell cultures of Rauwolfia serpentina Benth.: the new indole alkaloids raumacline and N<sub>β</sub>-Methyl-raumalcine*. *Tetrahedron Lett*, 1990. **31**: p. 6693-6696.
- 142 Sheludko, Y., Gerasimenko, I., Kolshorn, H. und Stockigt, J., *Isolation and structure elucidation of a new indole alkaloid from Rauwolfia serpentina hairy root culture: the first naturally occurring alkaloid of the raumacline group*. *Planta Med*, 2002. **68**: p. 435-439.
- 143 Hrazdina, J.B., *Purification and properties of a UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase from Hyppastrum petals*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **955**: p. 301-309.
- 144 Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K. und Stockigt, J., *Arbutin synthase, a novel member of the NRD1 $\beta$ -glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**: p. 1731-1741.
- 145 Eisenreich, W. und Bacher, A., *Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictive/predictive comparison of isotopomer patterns determined by NMR spectroscopy*. *Genet Eng (N Y)*, 2000. **22**: p. 121-153.
- 146 Eisenreich, W., Bacher, A., Berry, A., Bretzel, W., Humbelin, M., Lopez-Ulibarri, R., Mayer, A.F. und Yeliseev, A., *Biosynthesis of zeaxanthin via mevalonate in Paracoccus species strain PTA-3335. A product-based retrobiosynthetic study*. *J Org Chem*, 2002. **67**: p. 871-875.
- 147 Glawischnig, E., Gierl, A., Tomas, A., Bacher, A. und Eisenreich, W., *Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of amino acid biosynthesis and intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize kernels*. *Plant Physiol*, 2001. **125**: p. 1178-1186.
- 148 Guo, Y. und Chen, F., *TLC-UV-spectrophotometric and TLC-scanning determination of isatin in leaf of Isatis*. *Zhongcaoyao*, 1986. **17**: p. 8-11.
- 149 Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Sakurama, T., Matsuda, H., Nomura, M. und Kubo, M., *Novel indole S,O-bisdesmoside*,

- calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two Calanthe species (Orchidaceae)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1998. **46**: p. 886-888.
- 150 Bergman, J., Lindström, J.O. und Tilstam, U., *The structure and properties of some idolic constituents in Couroupita guianensis Aubl.* Tetrahedron, 1985. **41**: p. 2879-2881.
- 151 Wei, L., Wang, Q. und Liu, X., *Application of thin-layer chromatography in quality control of Chinese medicinal preparations. II. Qualitative analysis of some Chinese medicinal preparations of Chansu*. Yaowu Fenxi Zazhi, 1982. **2**: p. 288-291.
- 152 Kapadia, G.J., Shukla, Y.N., Basak, S.P., Schokloski, E.A. und Fales, H.M., *The Melosatins - a novel class of alkaloids from Melochia tomentosa*. Tetrahedron, 1980. **36**: p. 2441-2447.
- 153 Kapadia, G.J. und Shukla, Y.N., *Melosatin D: a new isatin alkaloid from Melochia tomentosa Roots*. Planta Med, 1993. **59**: p. 568.
- 154 Grafe, U. und Radics, L., *Isolation and structure elucidation of 6-(3'-methylbuten-2'-yl)isatin, an unusual metabolite from Streptomyces albus*. J Antibiot (Tokyo), 1986. **39**: p. 162-163.
- 155 Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G. und Prota, G., *A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions*. Biochim Biophys Acta, 1989. **990**: p. 297-302.
- 156 Halket, J.M., Watkins, P.J., Przyborowska, A., Goodwin, B.L., Clow, A., Glover, V. und Sandler, M., *Isatin (indole-2,3-dione) in urine and tissues. Detection and determination by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr, 1991. **562**: p. 279-287.
- 157 Fetzner, S., *Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline and their derivatives under different redox conditions*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998. **49**: p. 237-250.
- 158 Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. und Gierl, A., *Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants*. Int Rev Cytol, 2000. **198**: p. 319-346.

- 
- 159 Yu, B., Ruppert, M. und Stöckigt, J., *Deoxysarpagine hydroxylase-a novel enzyme closing a short side pathway of alkaloid biosynthesis in Rauwolfia*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**: p. 2479-2483.
- 160 Krisa, S., Téguo, P.W., Decendit, A., Deffieux, G., Vercauteren, J. und Mérillon, J.M., *Production of <sup>13</sup>C-labelled anthocyanins by Vitis vinifera cell suspension cultures*. *Phytochemistry*, 1999. **51**: p. 651-656.
- 161 Lounasmaa, M., Jokela, R., Tolvanen, A. und Kan, S.K., *A 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR study of seven sarpagine-type alkaloids*. *Planta Med*, 1985: p. 519-521.
- 162 Pfitzner, A. und Stöckigt, J., *Biogenic link between sarpagine and ajmaline type alkaloids*. *Tetrahedron Lett.*, 1983. **24**: p. 5197-5200.
- 163 Batista, C.V.F., Rech, S.B., Henriques, A.T., Schripsema, J. und Verpoorte, R., *Indole alkaloids from Rauwolfia sellowii*. *Phytochemistry*, 1996. **41**: p. 969-973.
- 164 Jokela, R. und Lounasmaa, M., *A <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Study of Seven Ajmaline-type Alkaloids*. *Planta Med*, 1996. **62**: p. 577-579.
- 165 Danieli, B., Palmisano, G. und Ricca, G.S., *<sup>13</sup>C-NMR of some Ajmaline-Alkaloids*. *Tetrahedron Lett*, 1981. **22**: p. 4007-4008.
- 166 Endreß, S., *Die Raumacline: Chemie und Physiologie einer neuen Alkaloidgruppe*, Dissertation, 1994, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

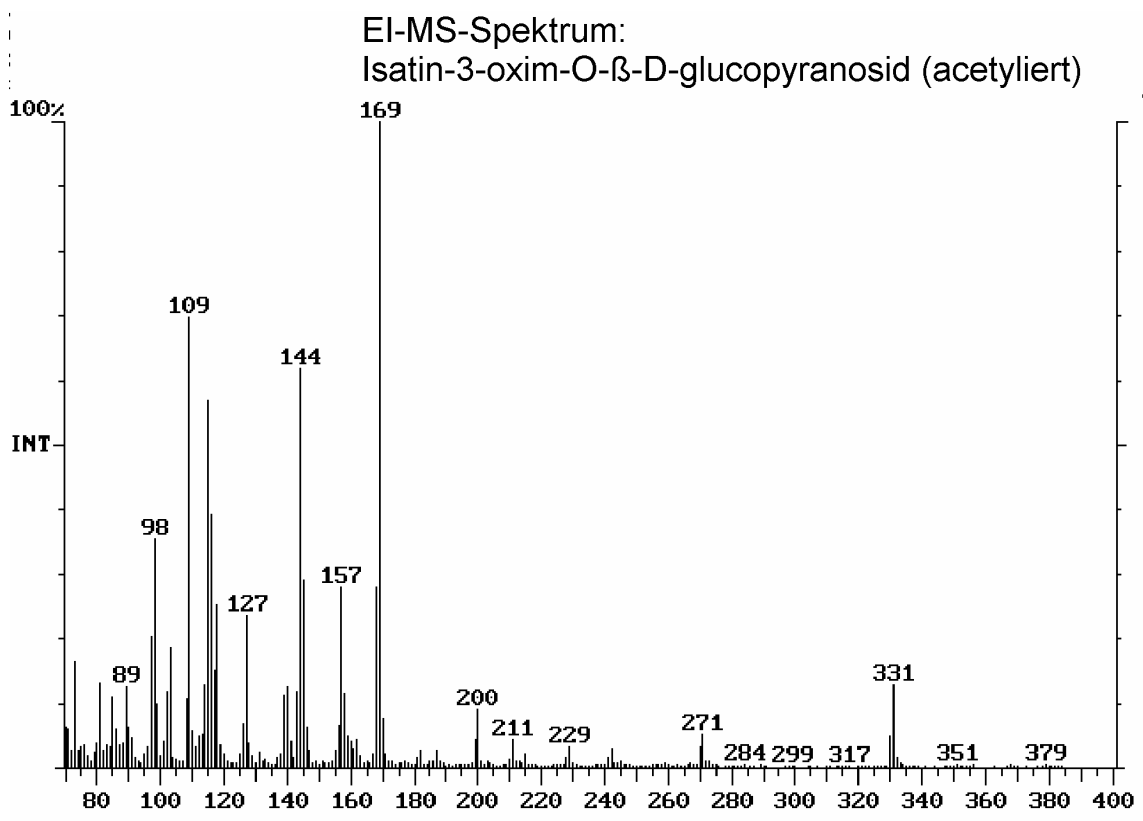
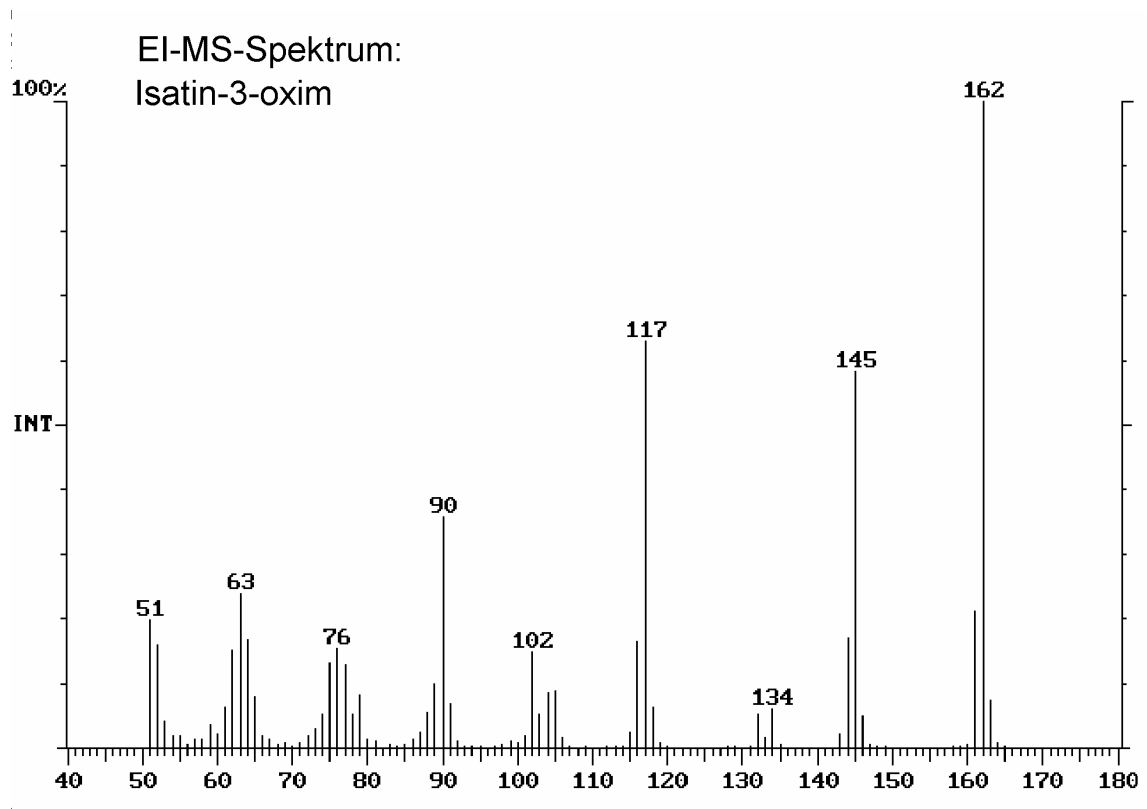
**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:**

- 1 Hinse, C., Unger, M., Provenzani, A. und Stöckigt, J., *Glucosylation of isatin-3-oxime followed by in situ NMR in plant cells at highest magnetic field without labelling*. J Nat Prod Lett, 2001. **15**: p. 119-124
- 2 Hinse, C., Sheludko, Y., Provenzani, A. und Stöckigt, J., *In vivo NMR at 800 MHz to monitor alkaloid metabolism in plant cell cultures without tracer labelling*. J Am Chem Soc, 2001. **123**: p. 5118-5119
- 3 Hinse, C., Richter, C., Provenzani, A. und Stöckigt, J., *Non-invasive monitoring of alkaloid metabolism in hybrid plant cell cultures by 2D Cryo-NMR without labelling*. Biorg Med Chem, akzeptiert.

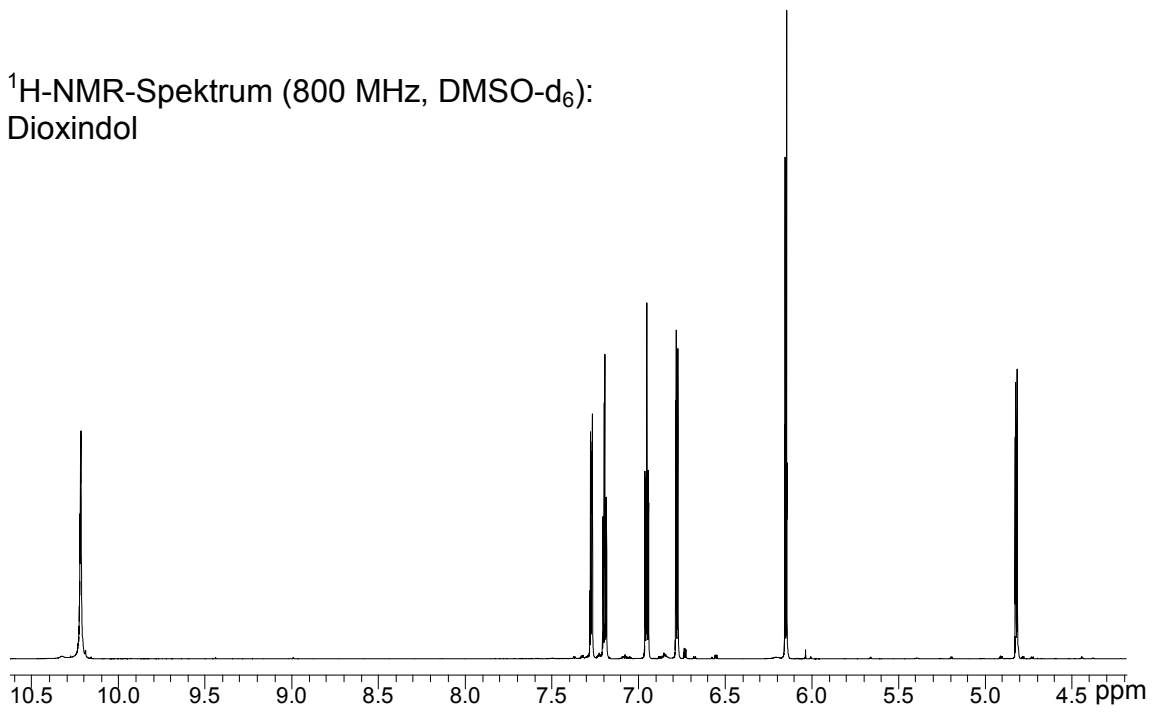
**Als Posterbeiträge sind erschienen:**

- 1 Hinse, C., Unger, M., Provenzani, A. und Stöckigt, J., *Plant cell metabolism and biotransformation followed by in vivo NMR at highest magnetic field strength*. XIX International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. August 20-25, 2000, Florenz, Italien
- 2 Hinse, C., Unger, M., Provenzani, A. und Stöckigt, J., *Plant cell metabolism and biotransformation followed by in vivo NMR at 800 MHz*. 4th LSF User Meeting. Oktober 6-8, 2000, Noordwijkerhout, Niederlande

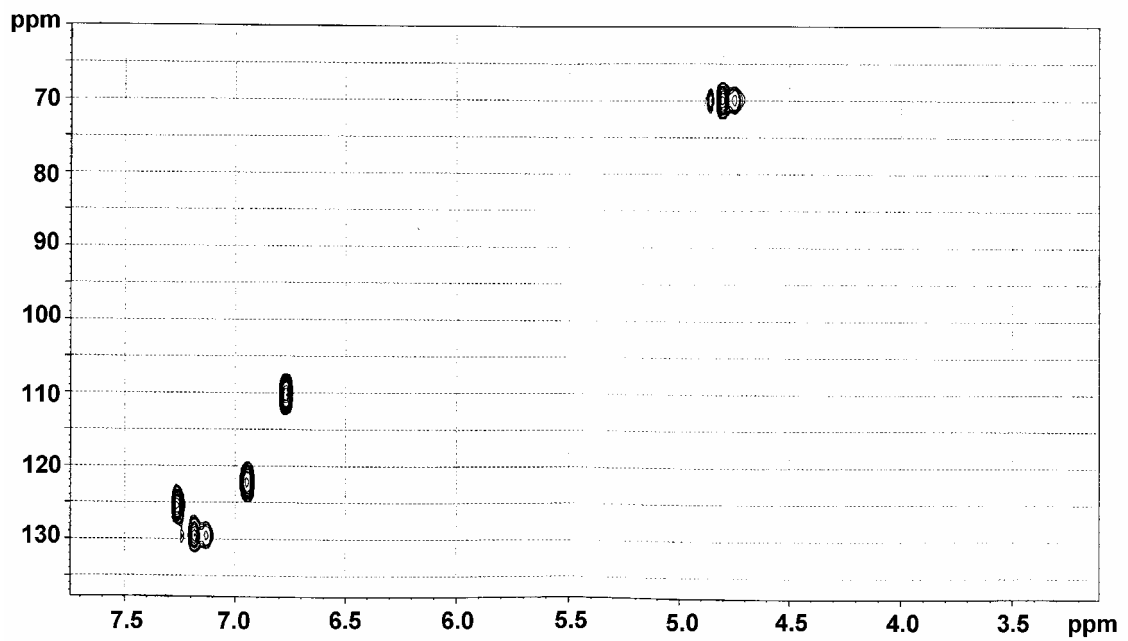
## VIII SPEKTROSKOPISCHER ANHANG



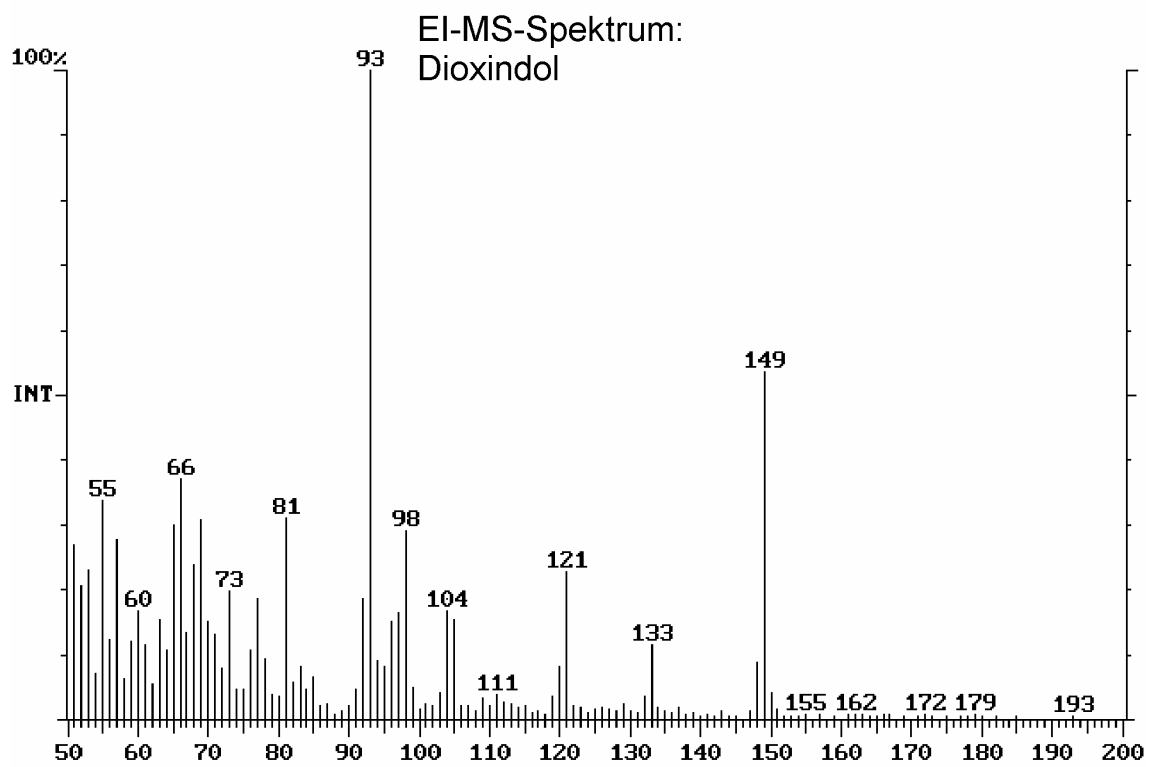
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (800 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
Dioxindol



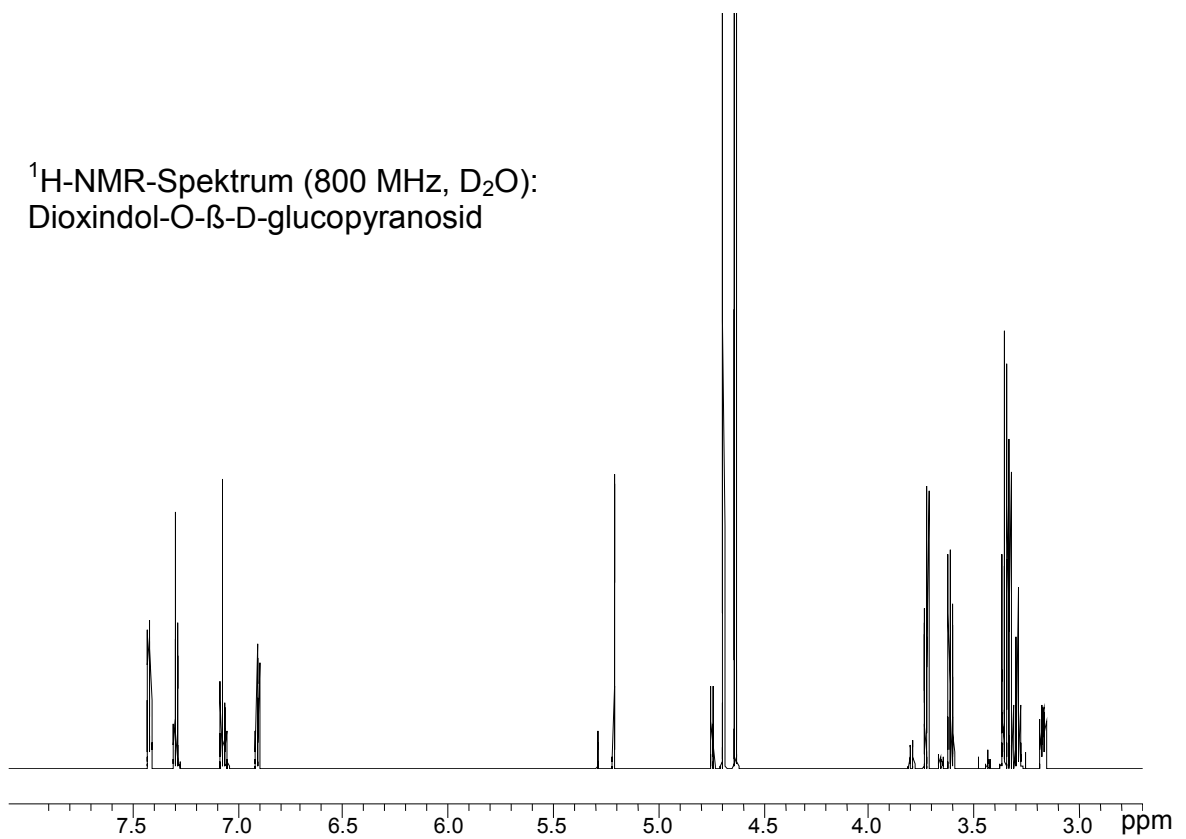
HSQC-Spektrum (800 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Dioxindol



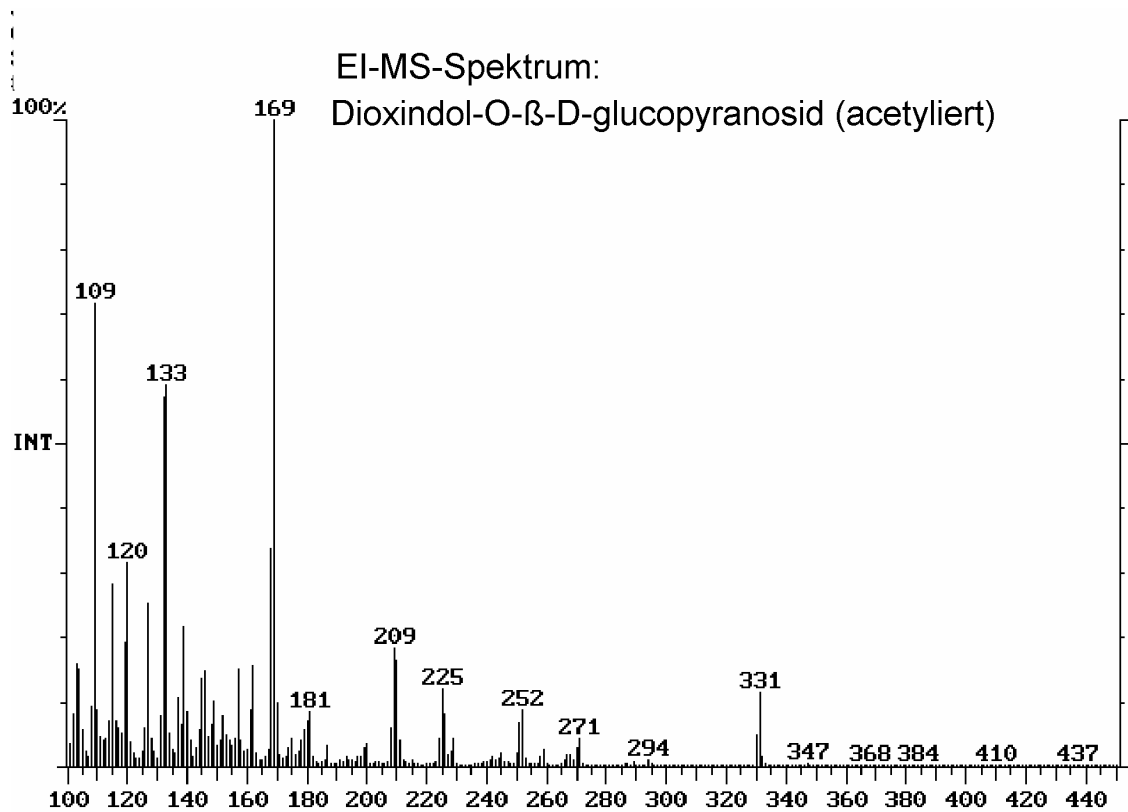
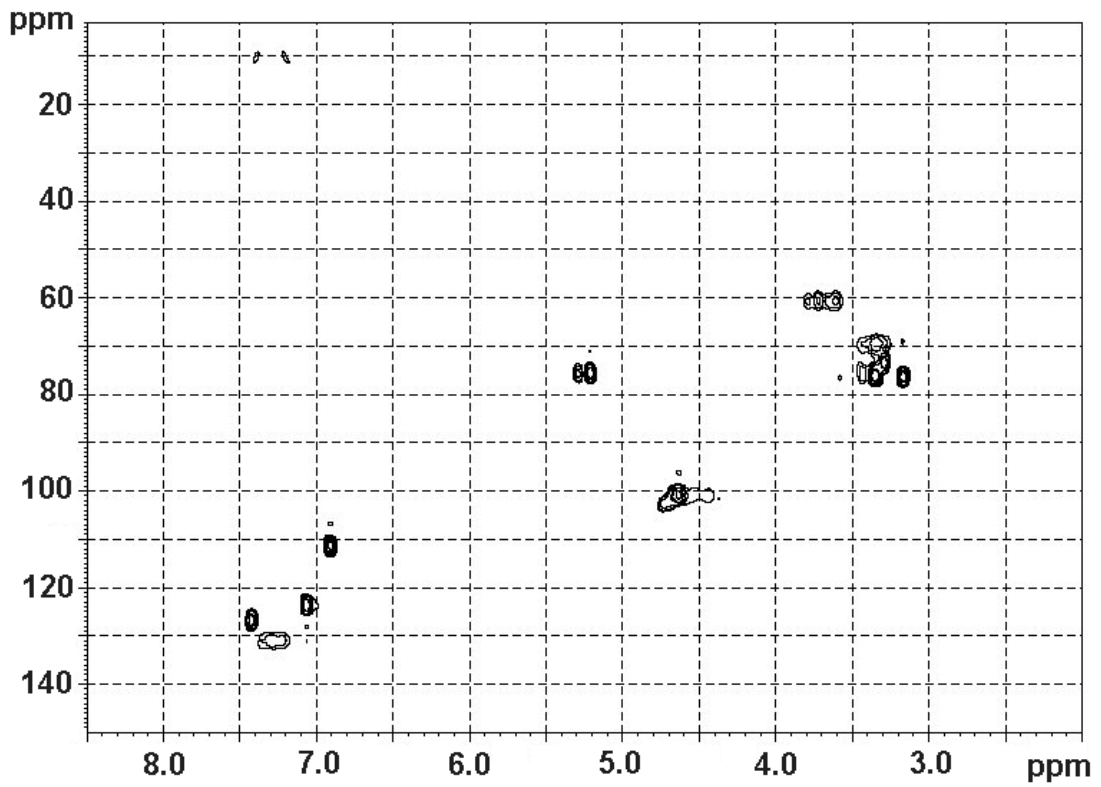




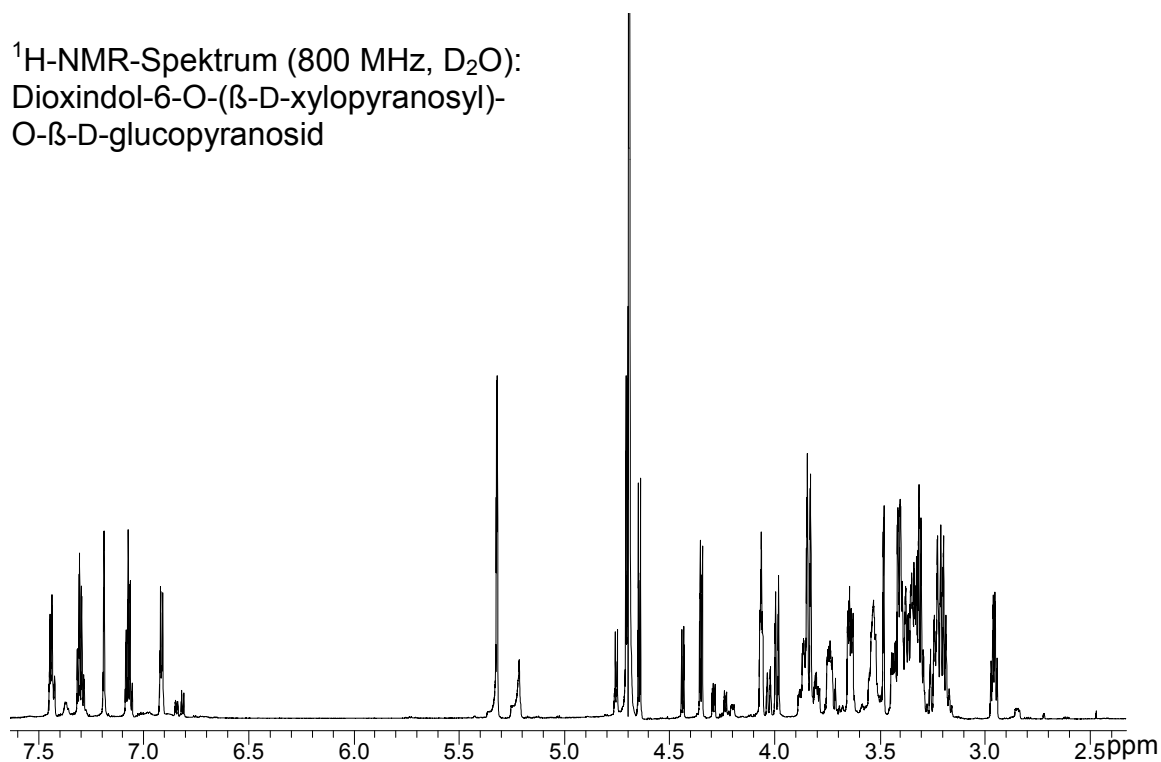
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  
Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid



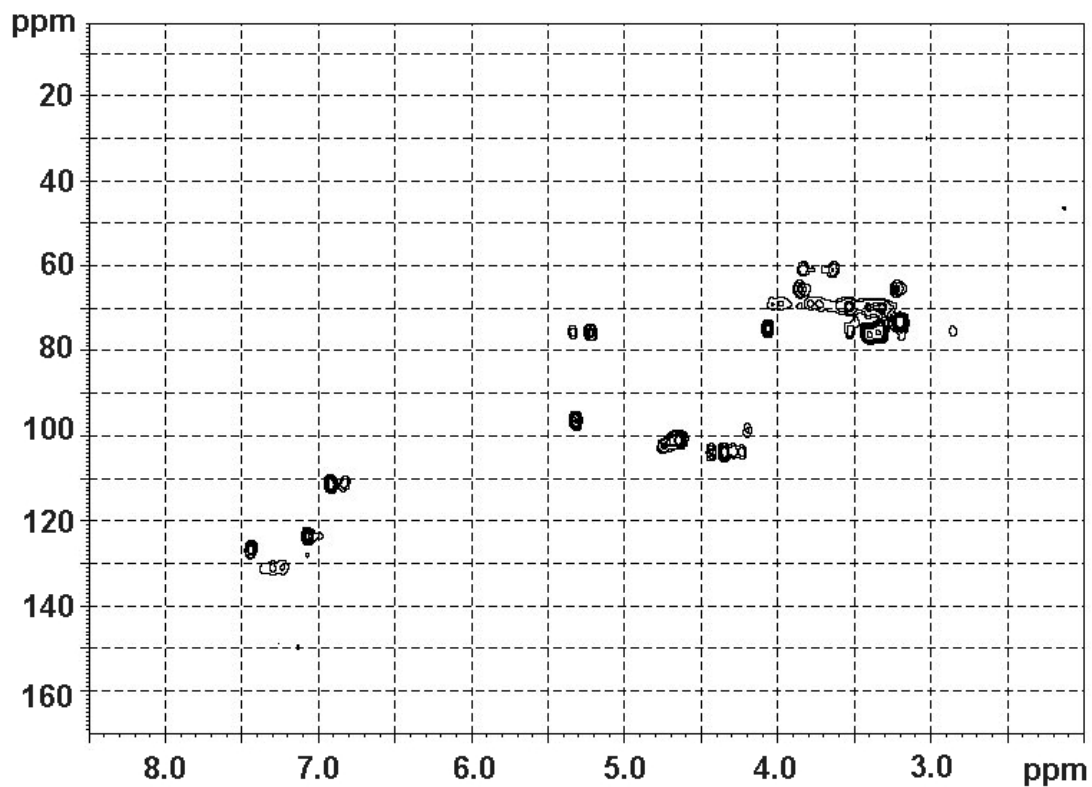
$^1\text{HSQC}$ -Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): Dioxindol-O- $\beta$ -D-glucopyranosid

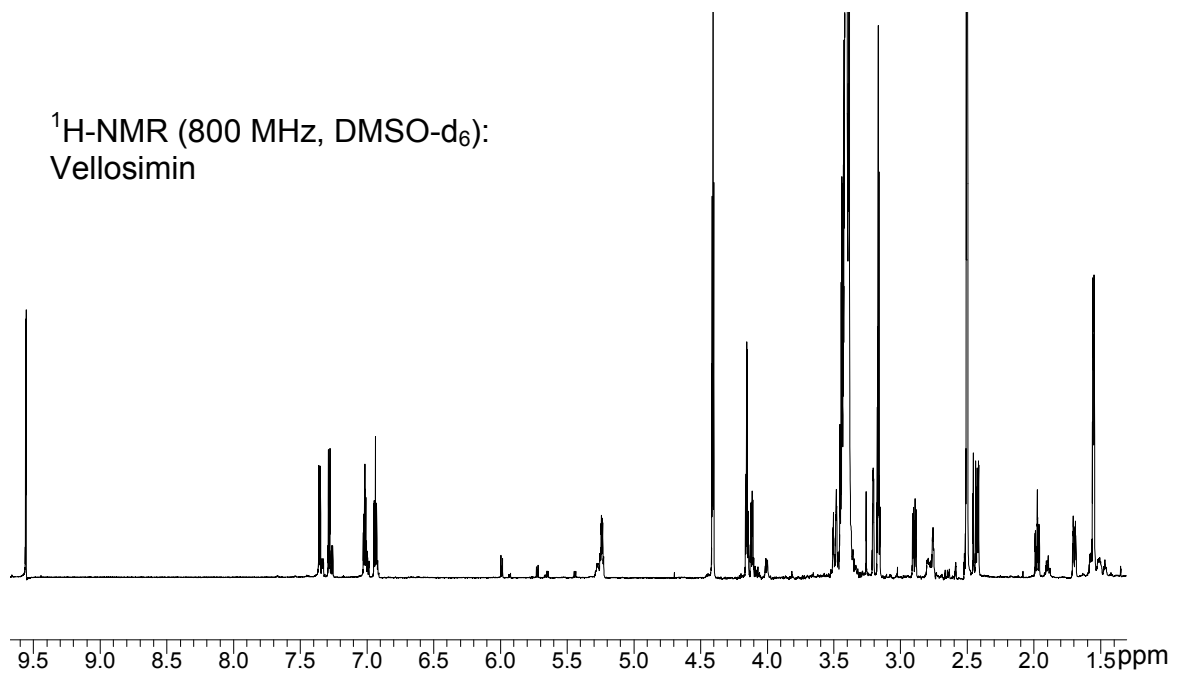
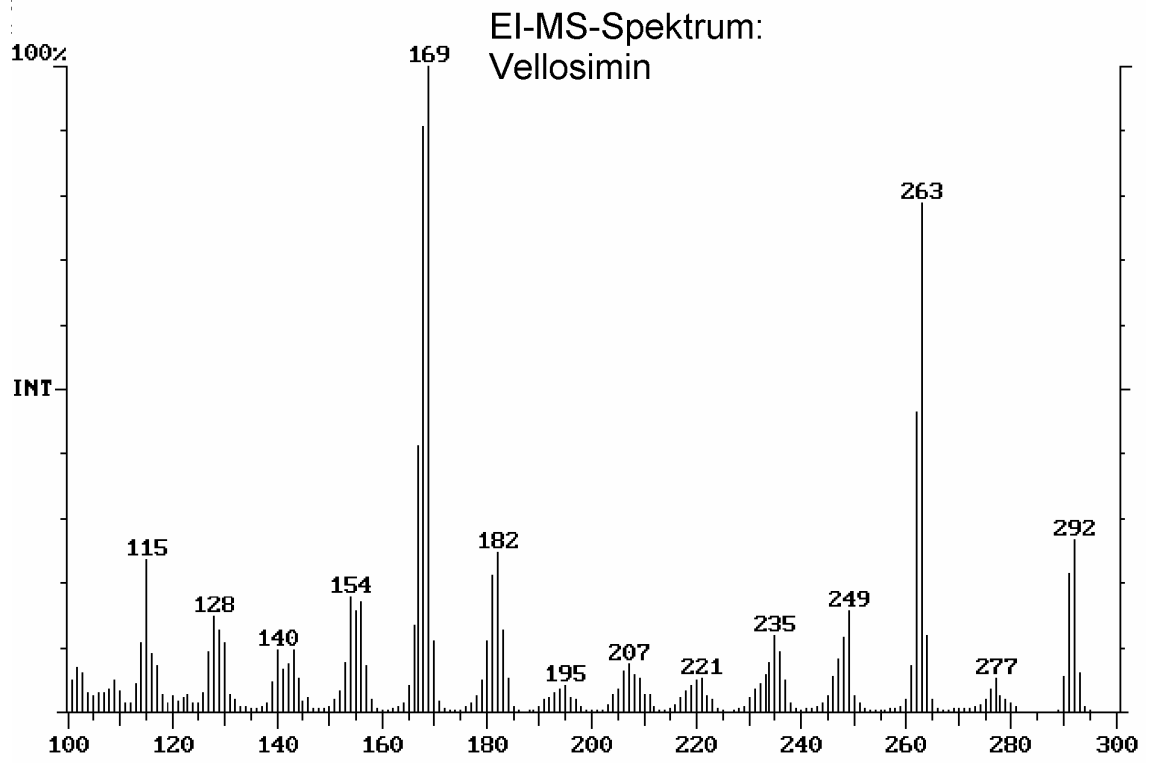


$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  
Dioxindol-6-O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-  
O- $\beta$ -D-glucopyranosid

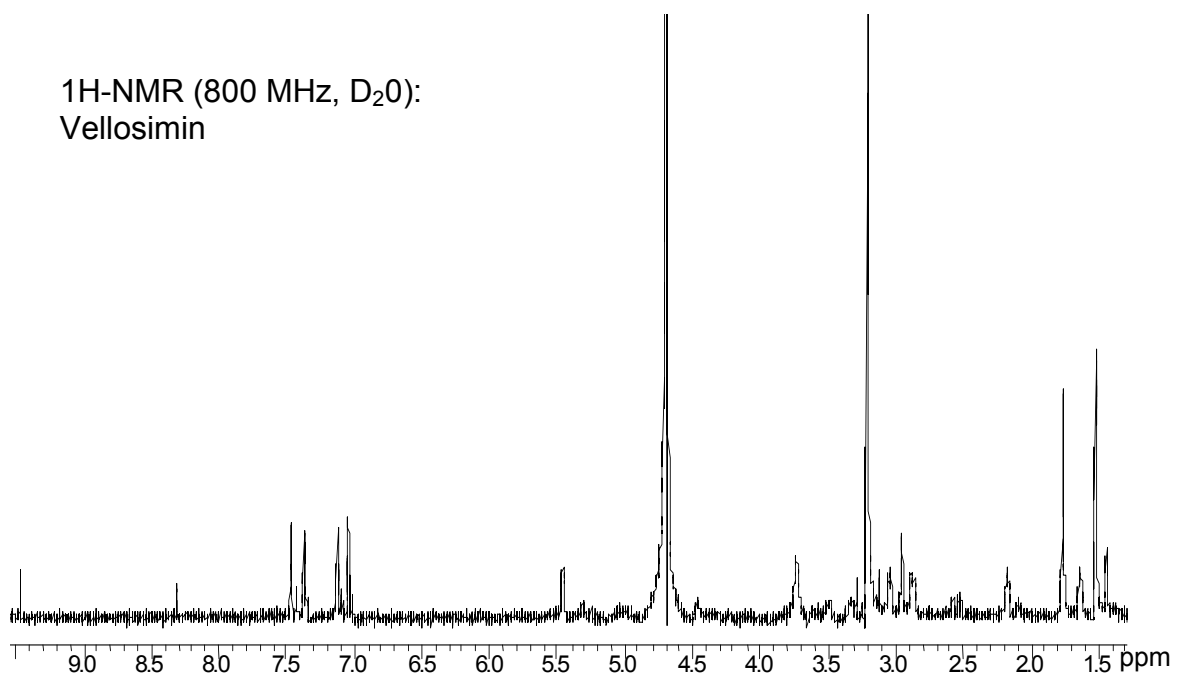


HSQC-Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  
Dioxindol-6O-( $\beta$ -D-xylopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranosid

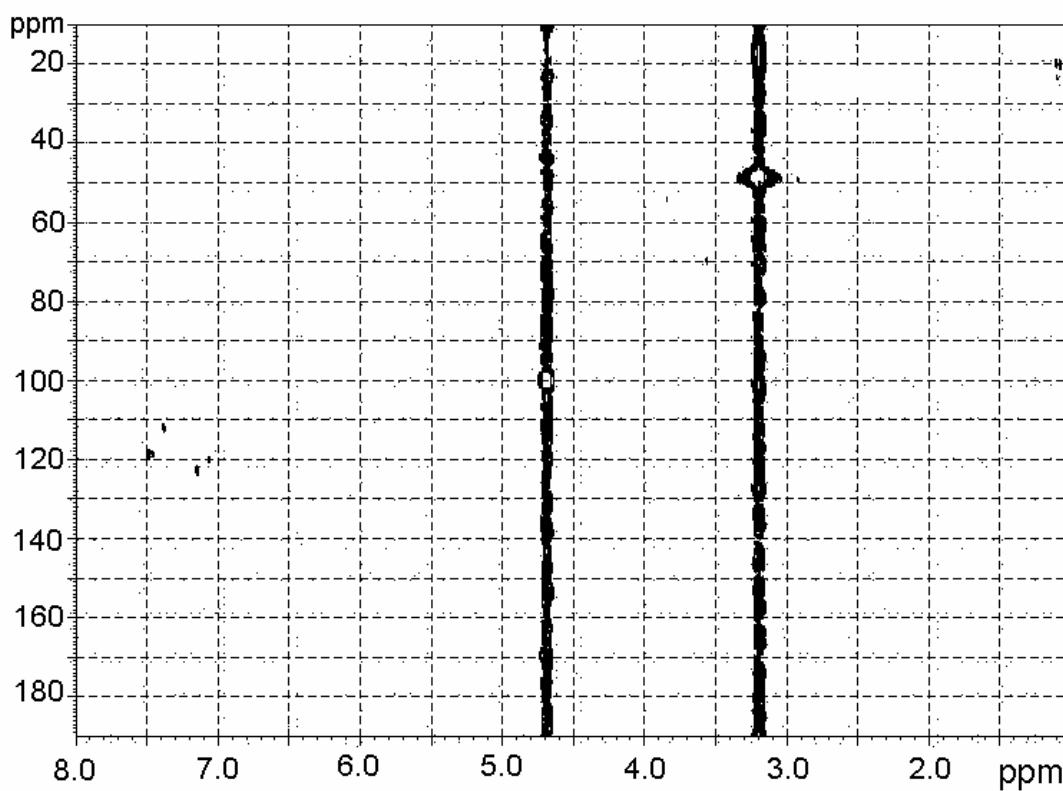




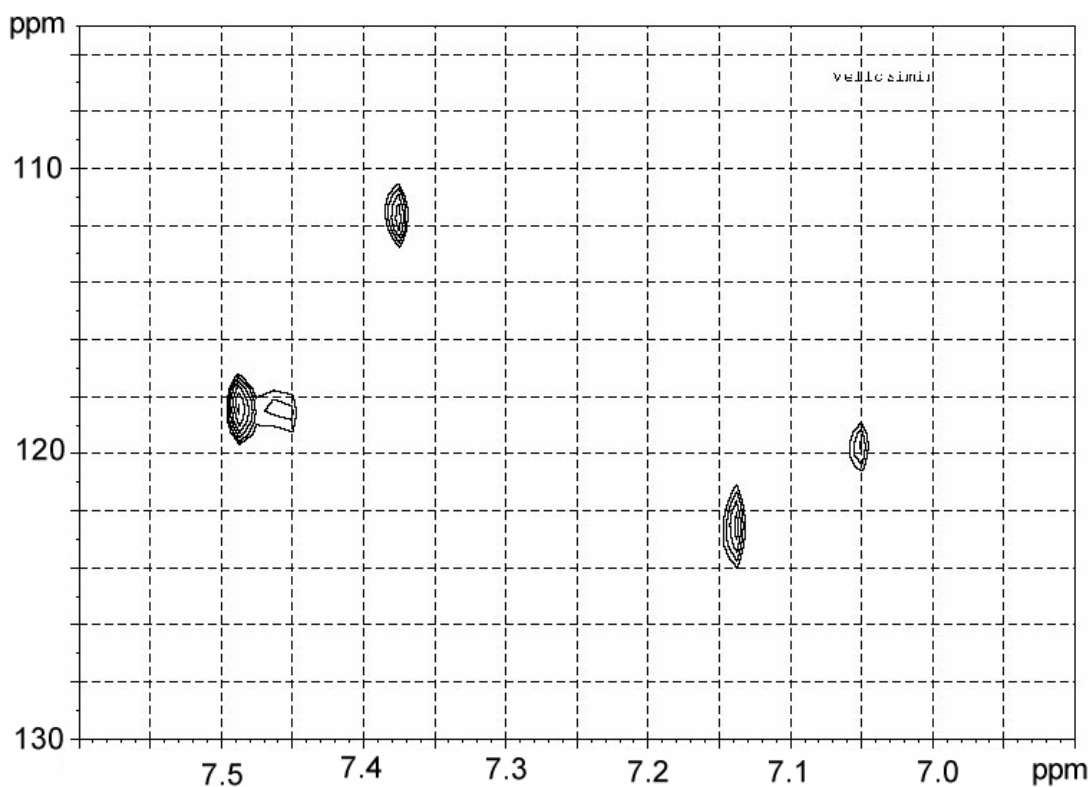
<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O):  
Vellosimin



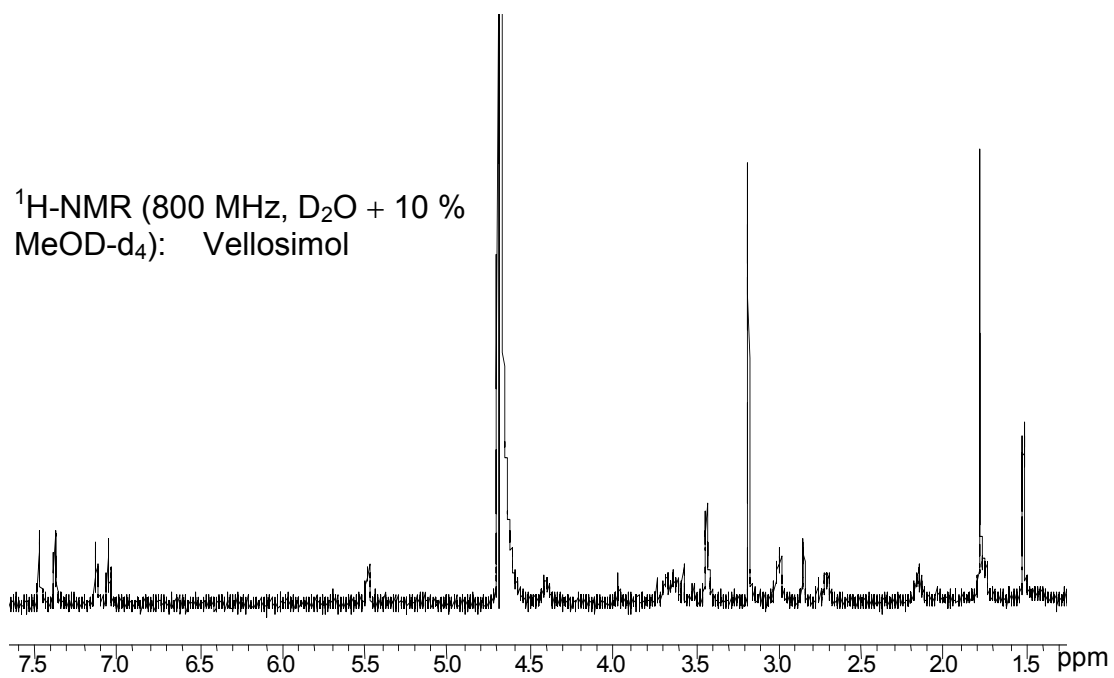
HSQC-Spektrum (800 MHz, D<sub>2</sub>O + MeOD-d<sub>4</sub>): Vellosimin



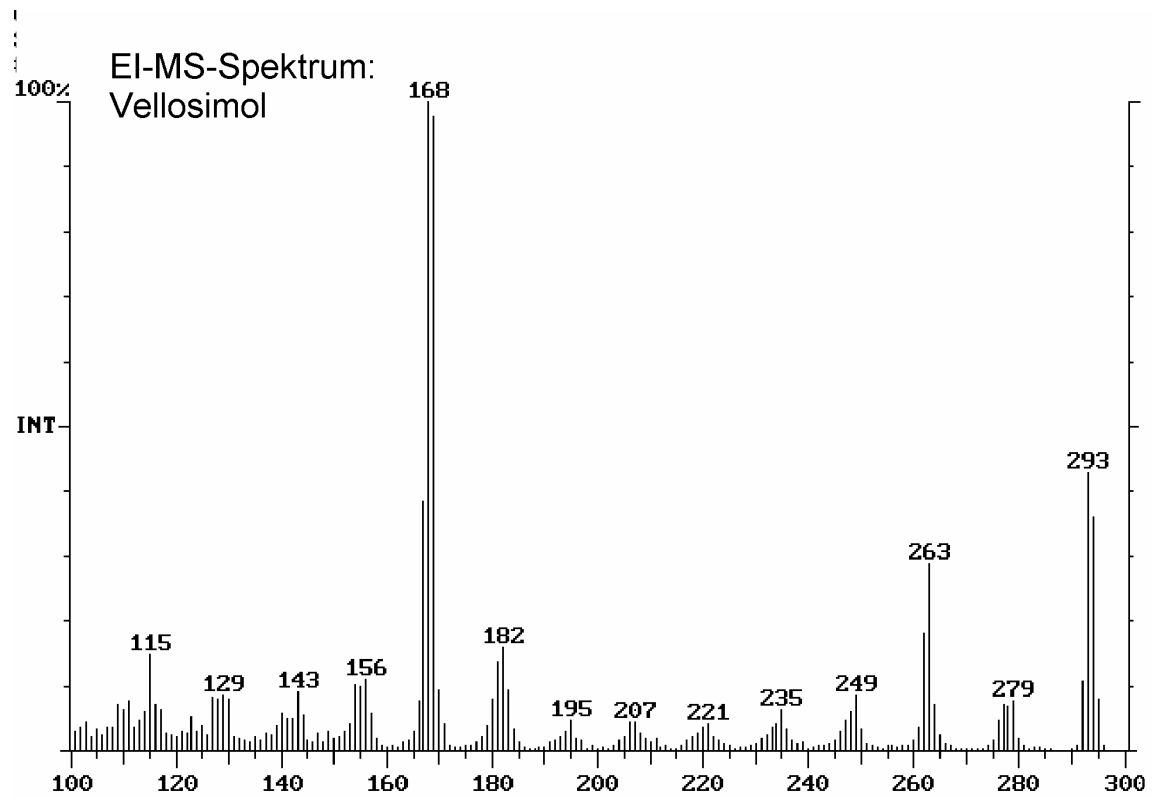
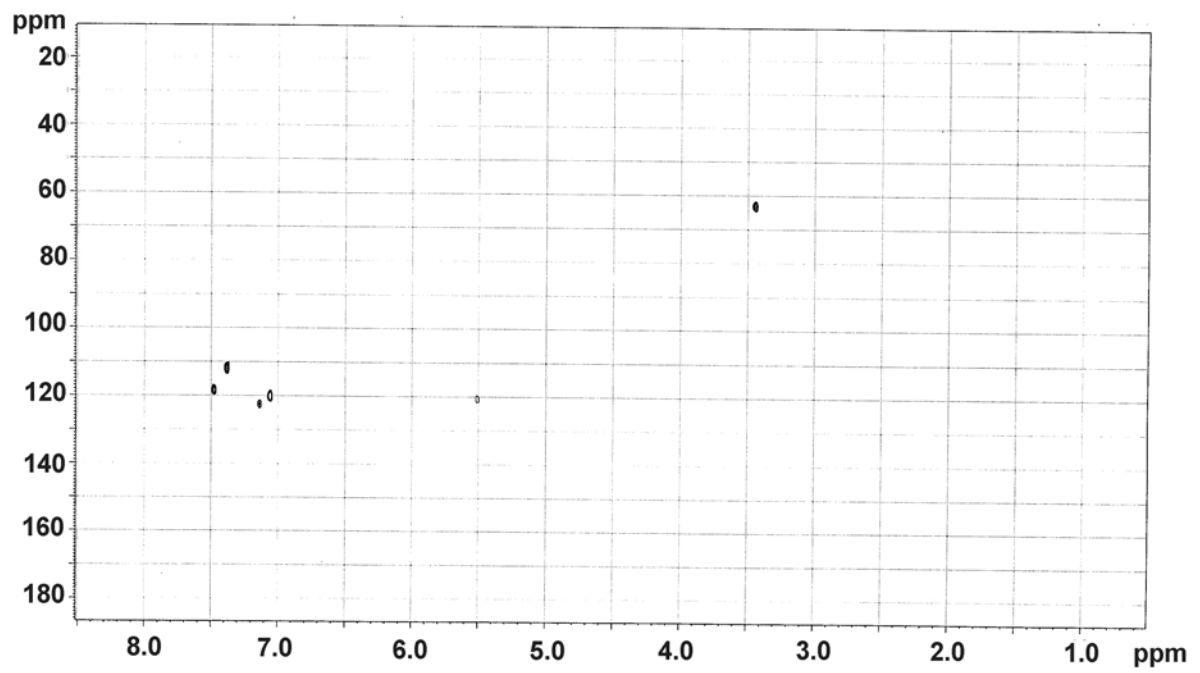
Ausschnitt der Aromatenregion des HSQC-Spektrums von Vellosimin



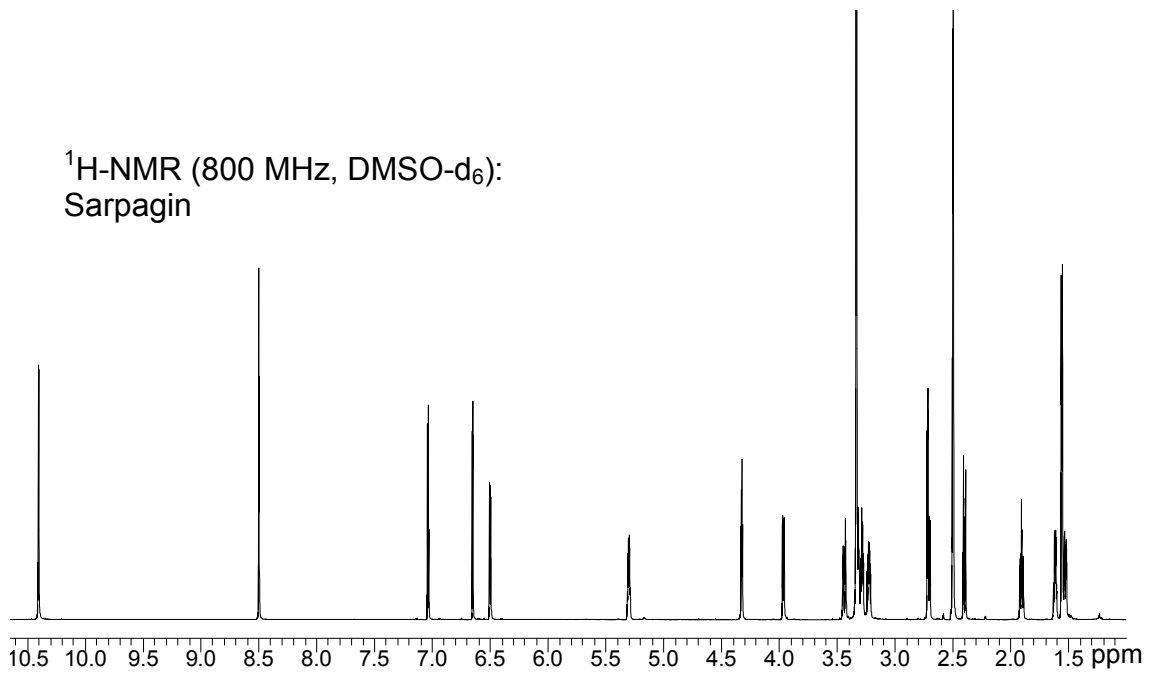
<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 %  
MeOD-d<sub>4</sub>): Vellosimol



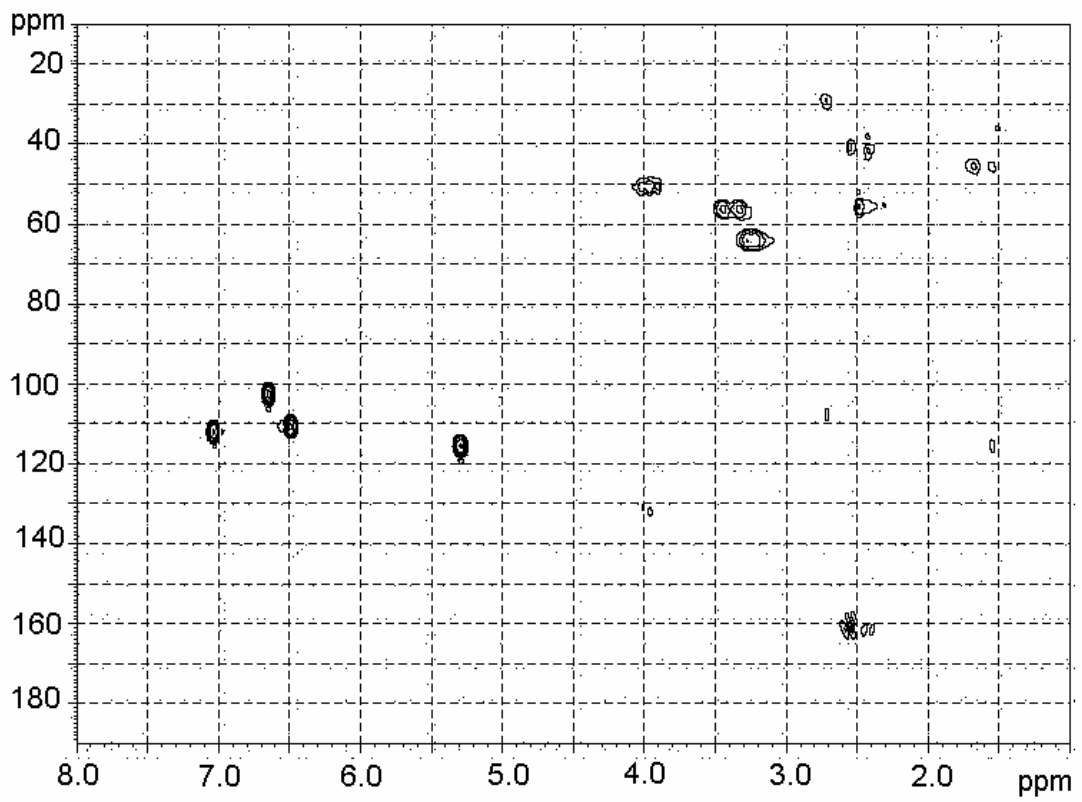
HSQC-Spektrum 800 MHz, D<sub>2</sub>O): Vellosimol



$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  
Sarpagin

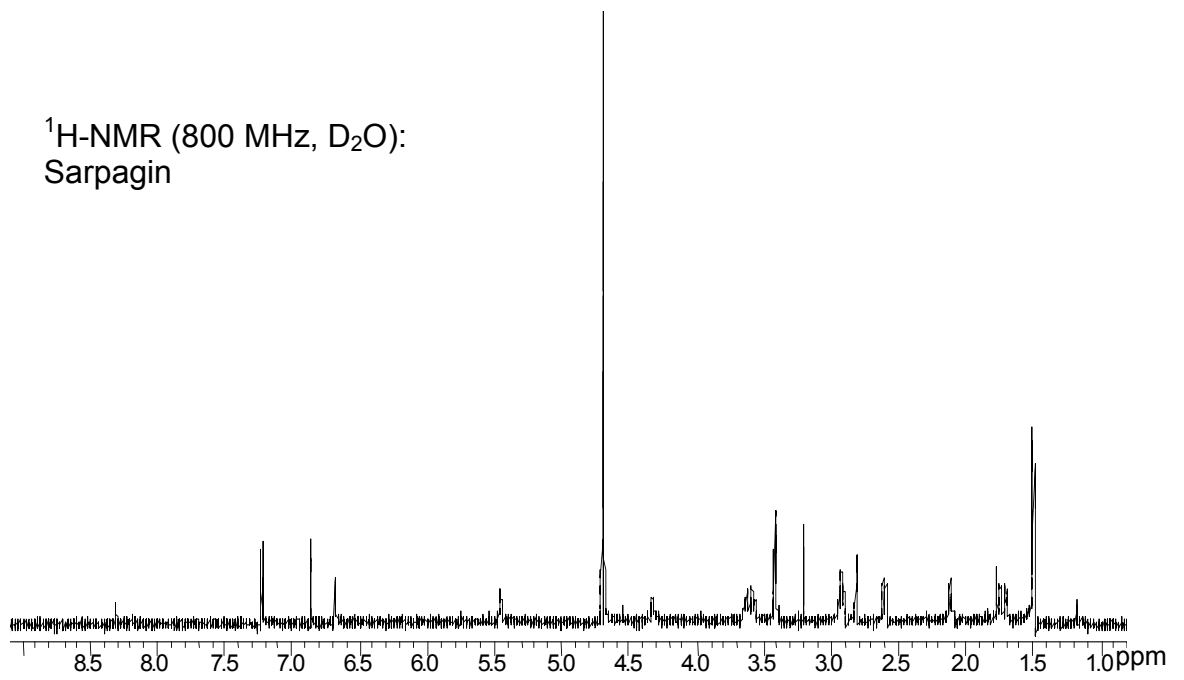


HSQC-Spektrum (800 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): Sarpagin

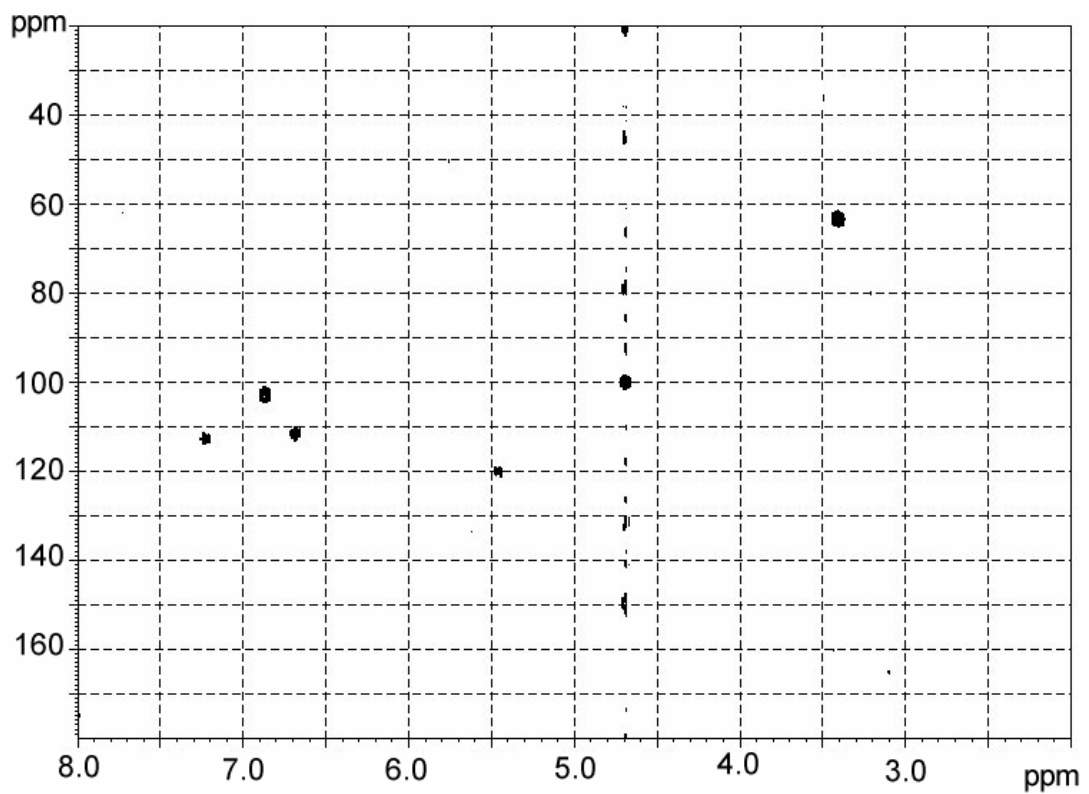


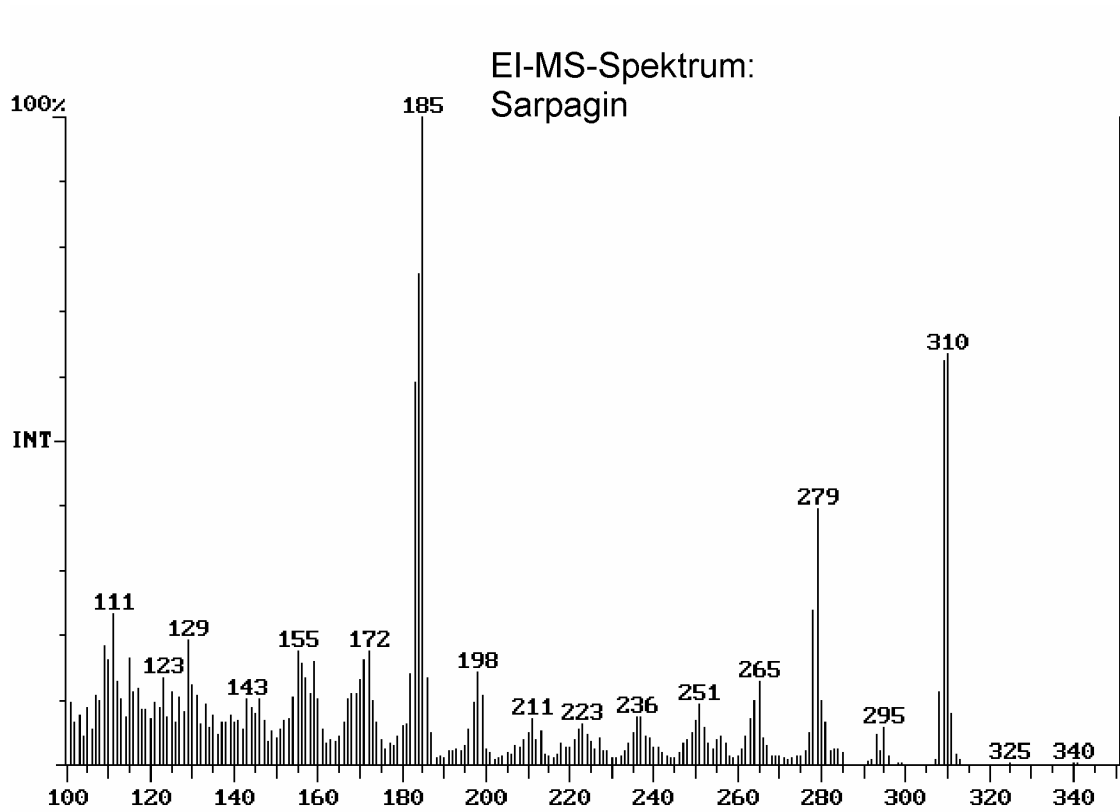


$^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  
Sarpagin

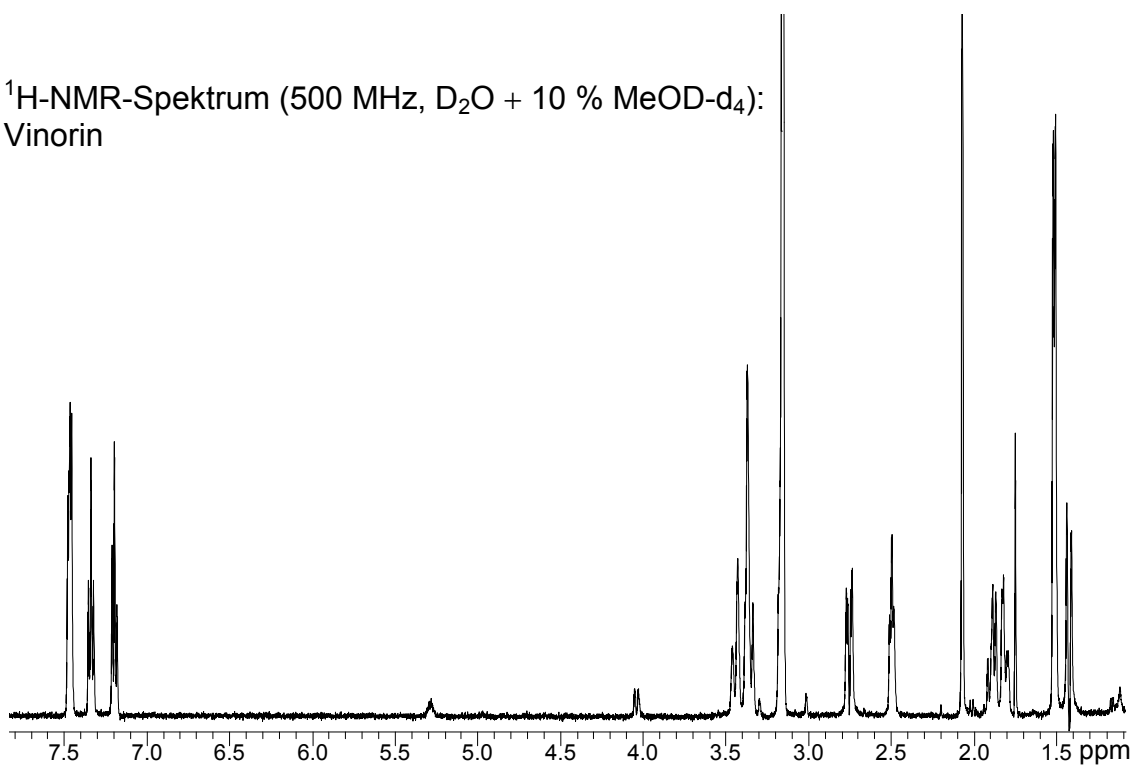


HSQC-Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): Sarpagin

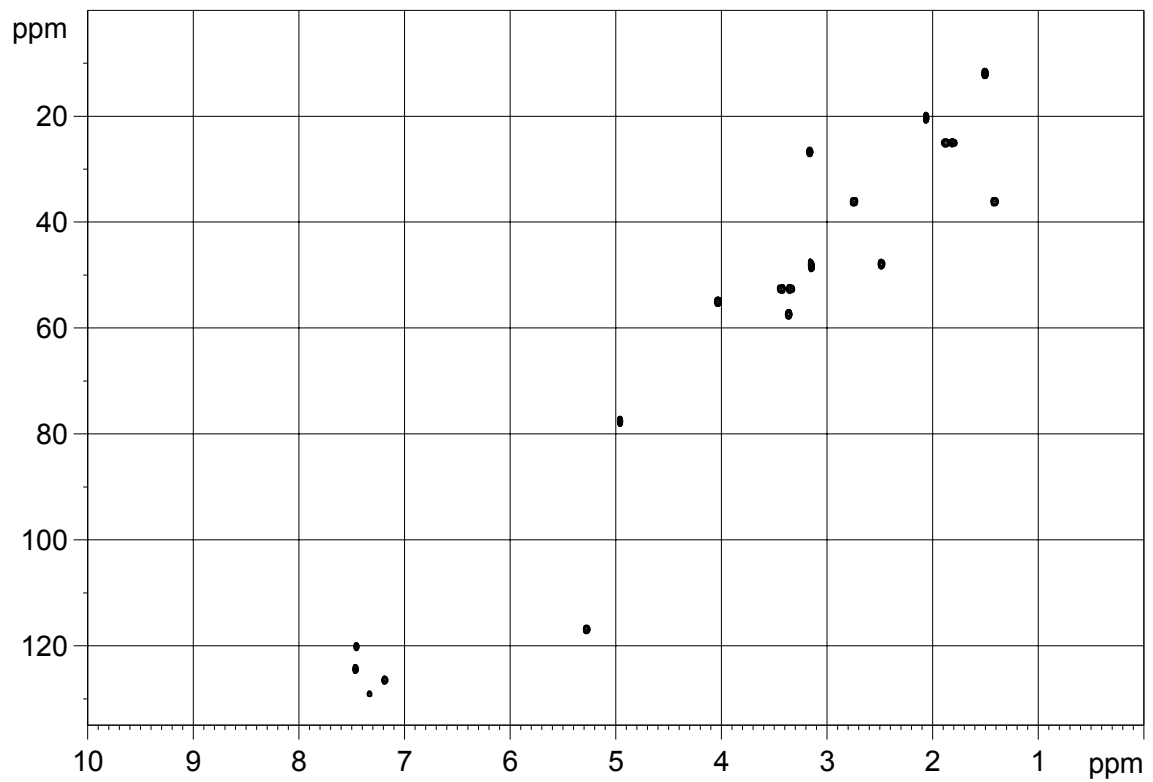




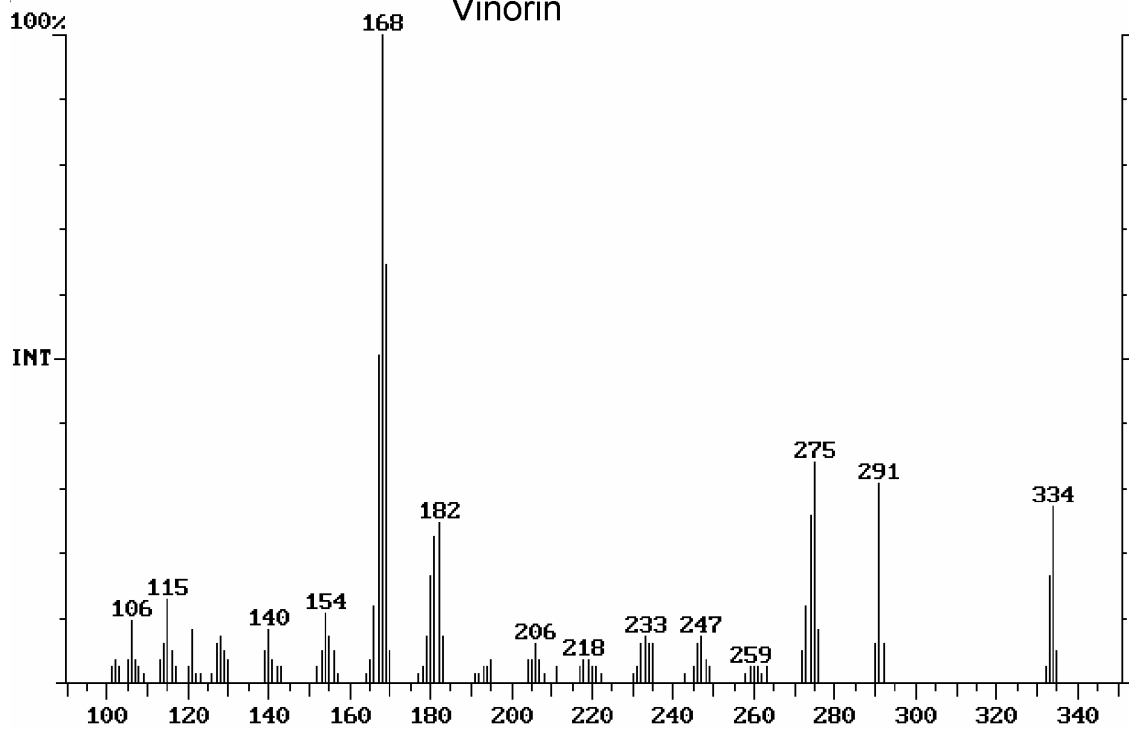
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{MeOD-d}_4$ ):  
Vinorin



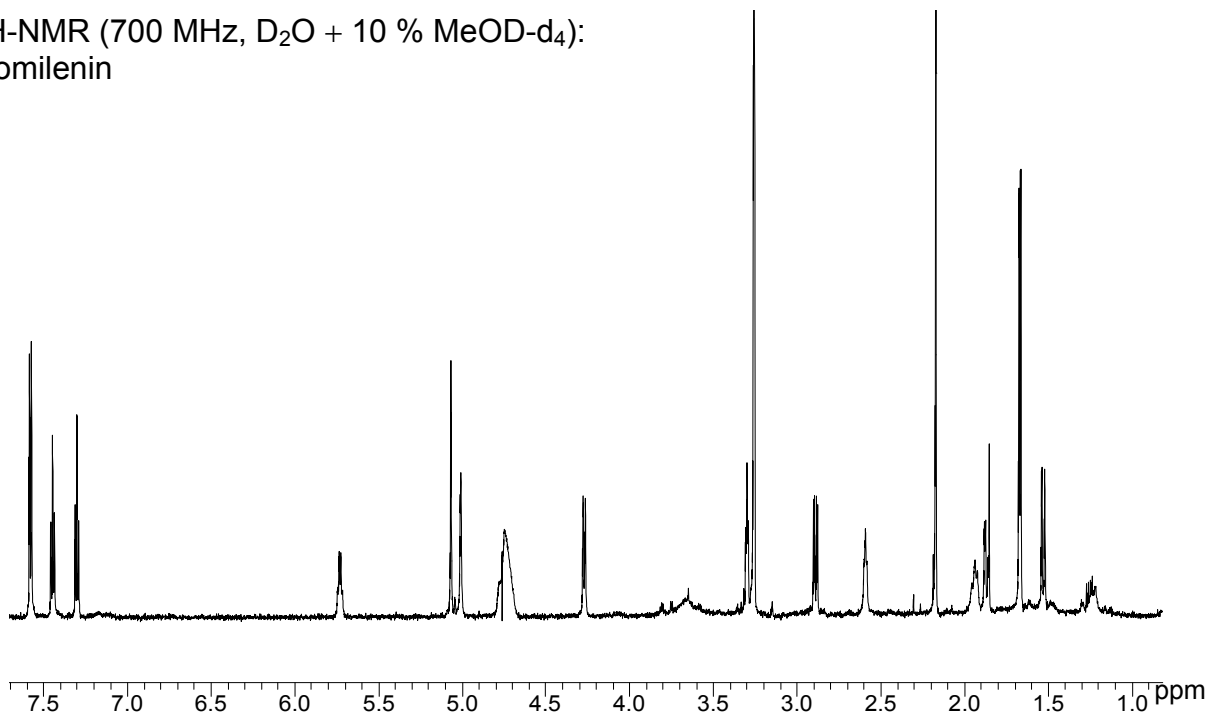
HSQC-Spektrum (500 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 % MeOD-d<sub>4</sub>): Vinorin



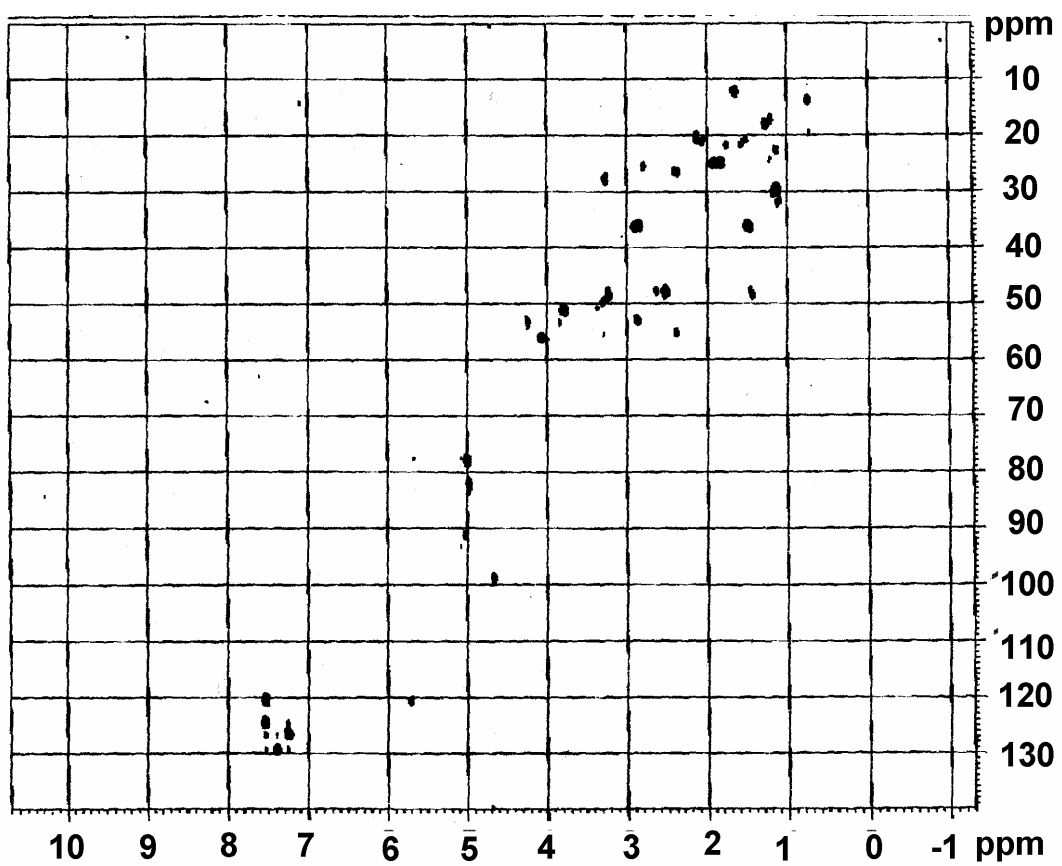
EI-MS-Spektrum:  
Vinorin

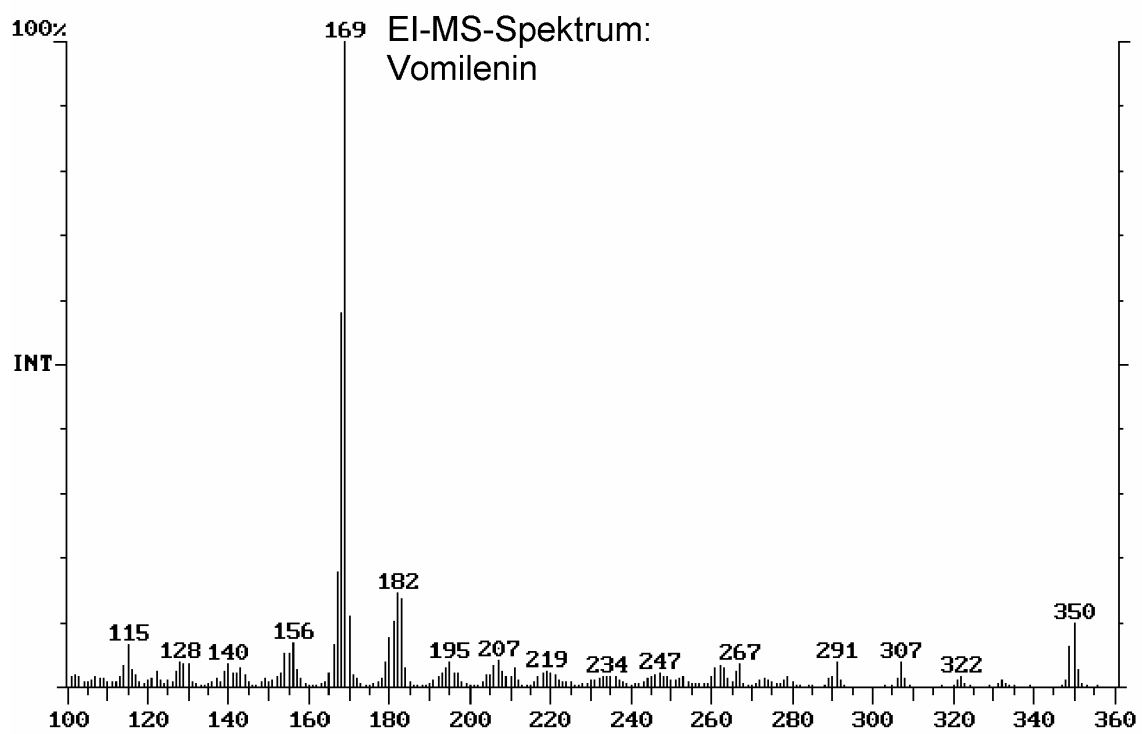


$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ ):  
Vomilenin

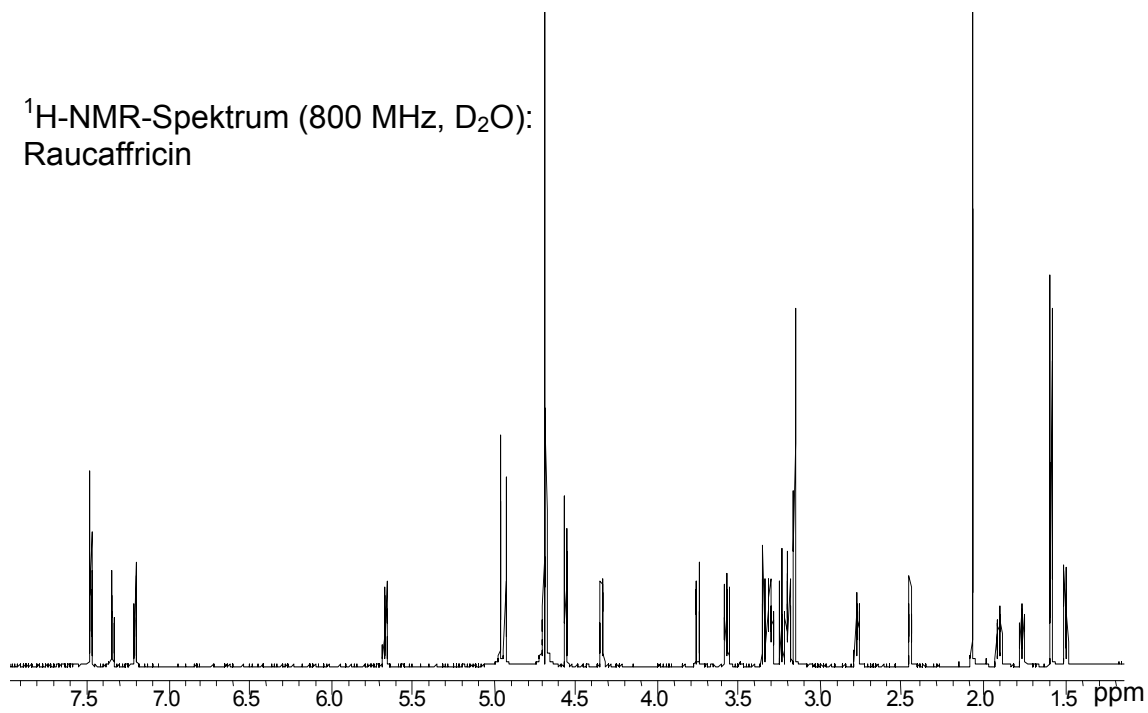


HSQC-Spektrum (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ ): Vomilenin

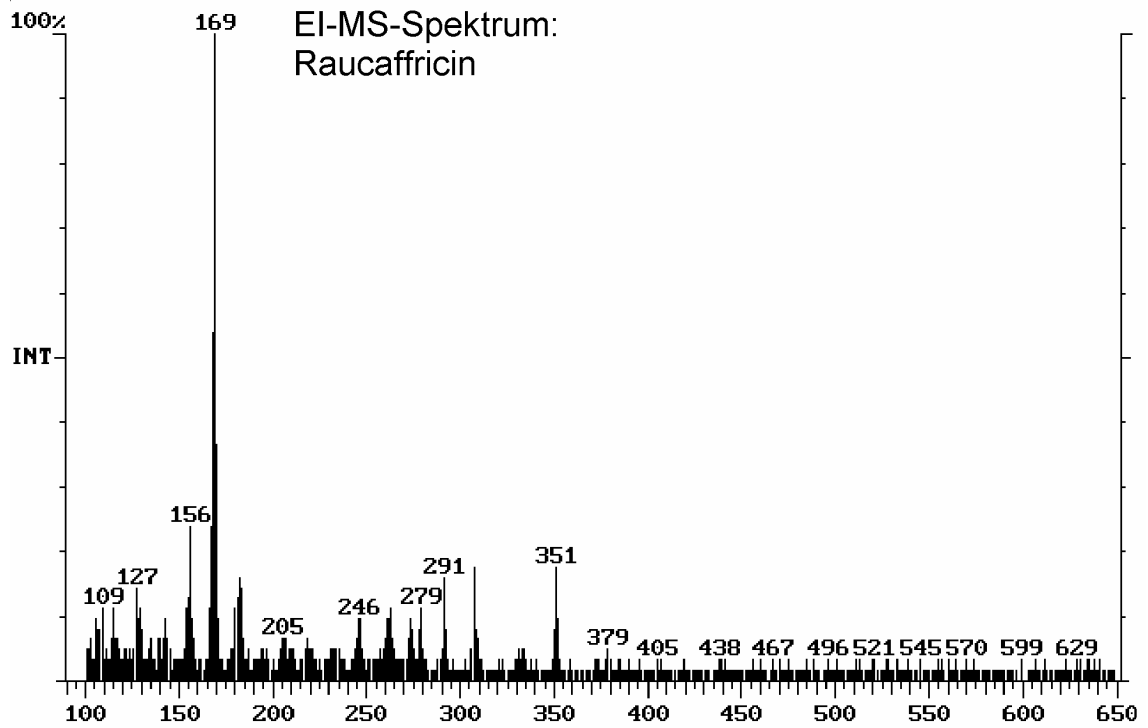
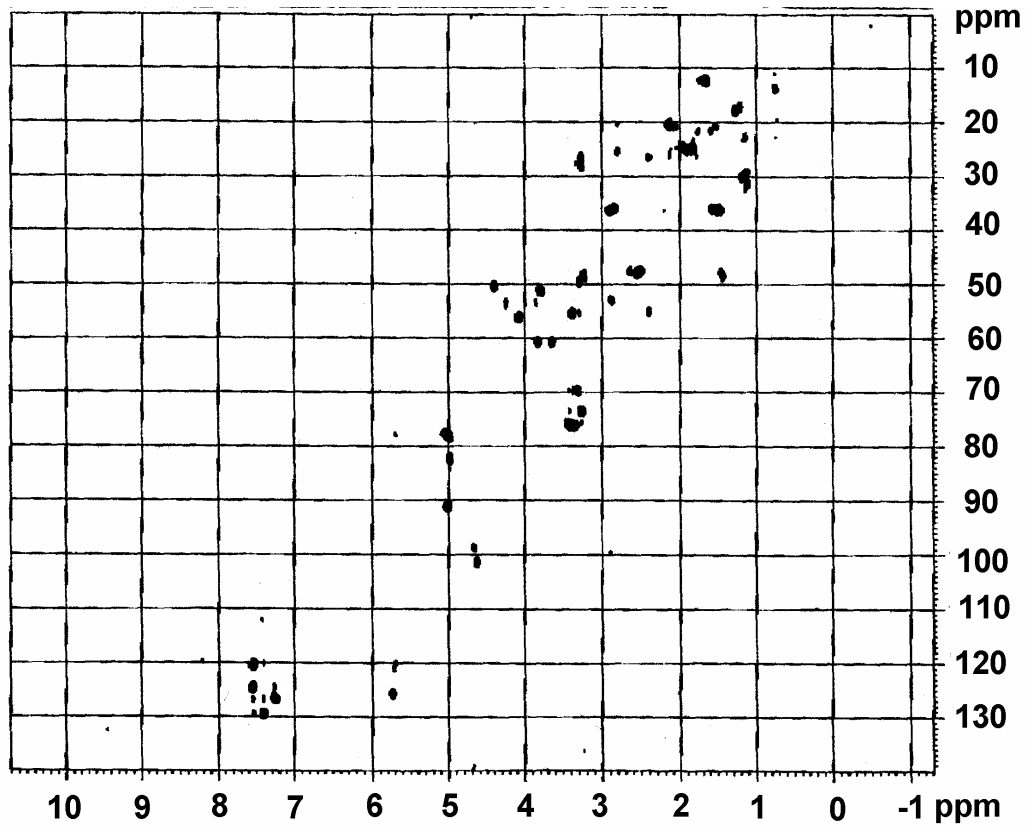




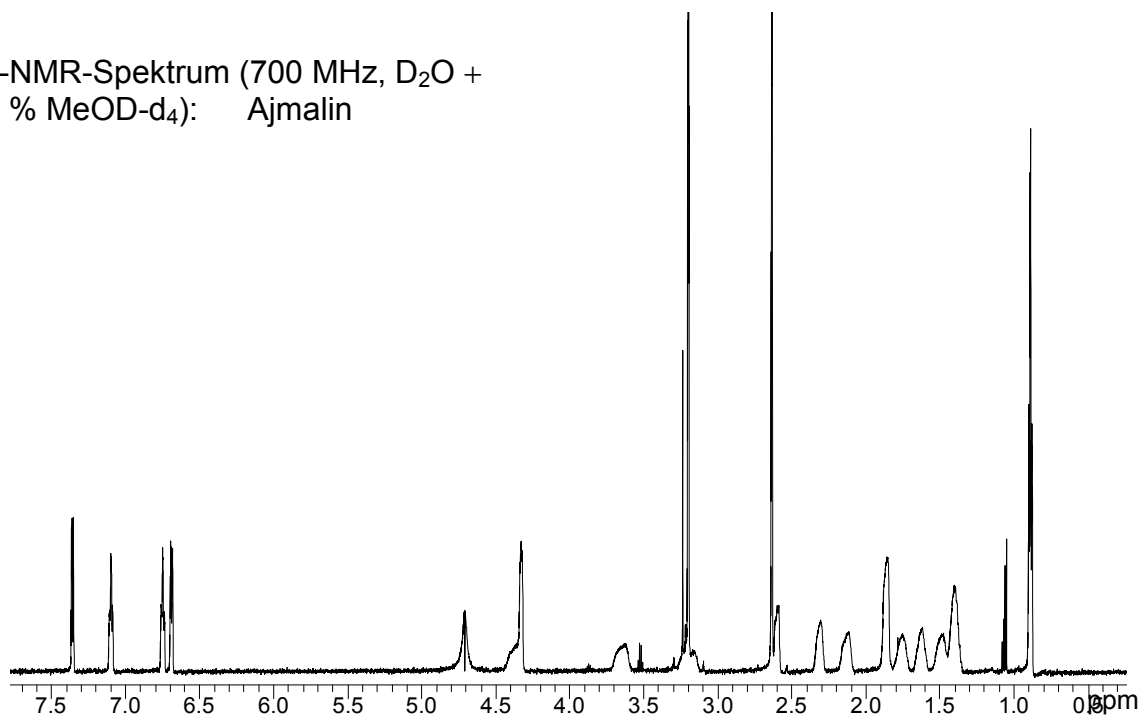
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (800 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  
Raucaffricin



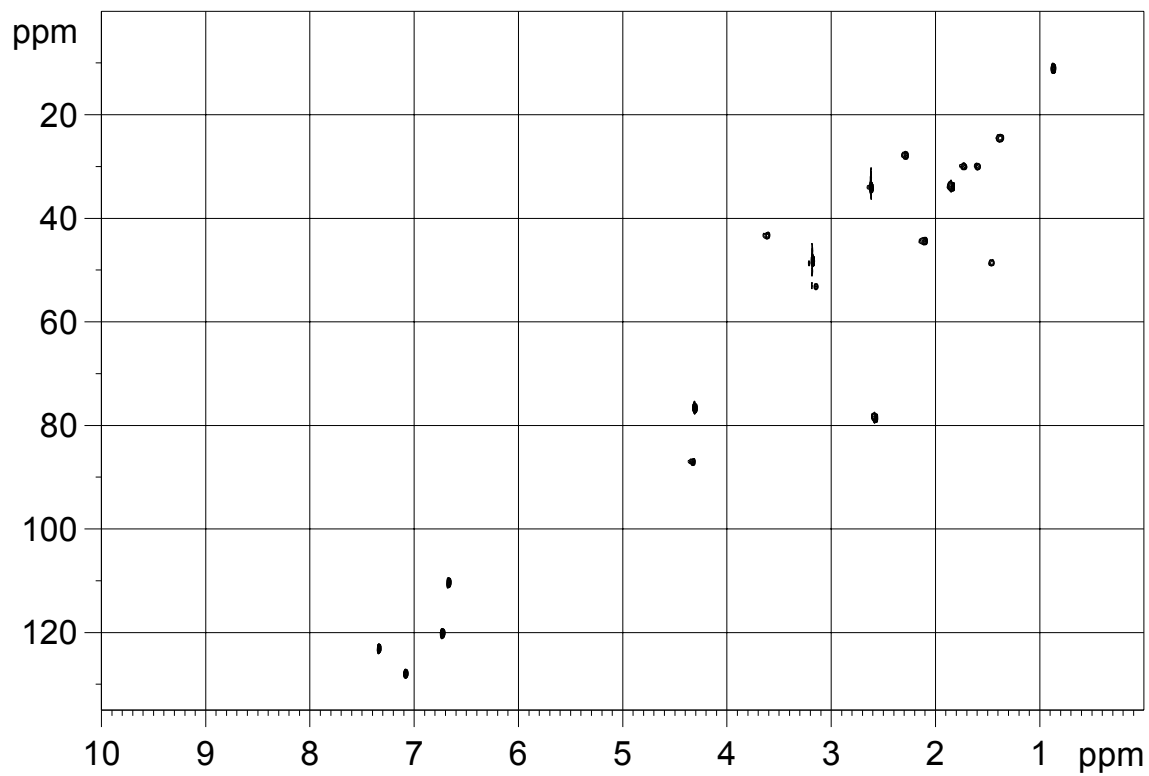
HSQC-Spektrum (500 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 % MeOD-d<sub>4</sub>):  
Vomilenin + Raucaffricin



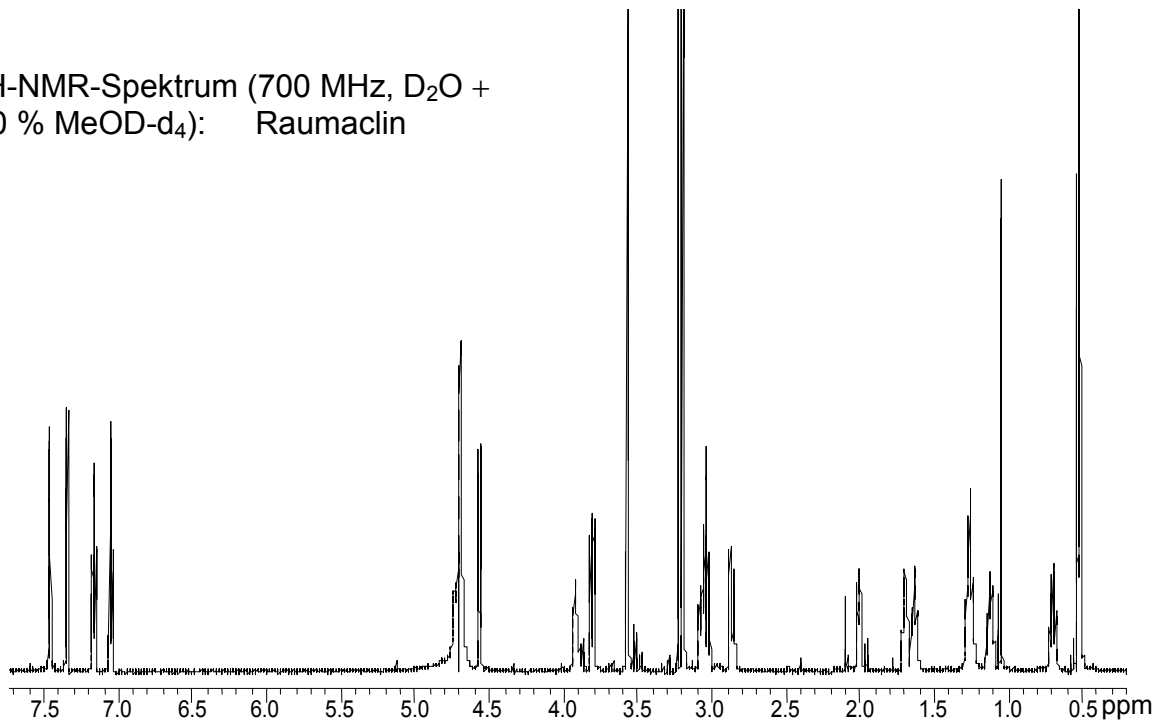
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (700 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 % MeOD-d<sub>4</sub>): Ajmalin



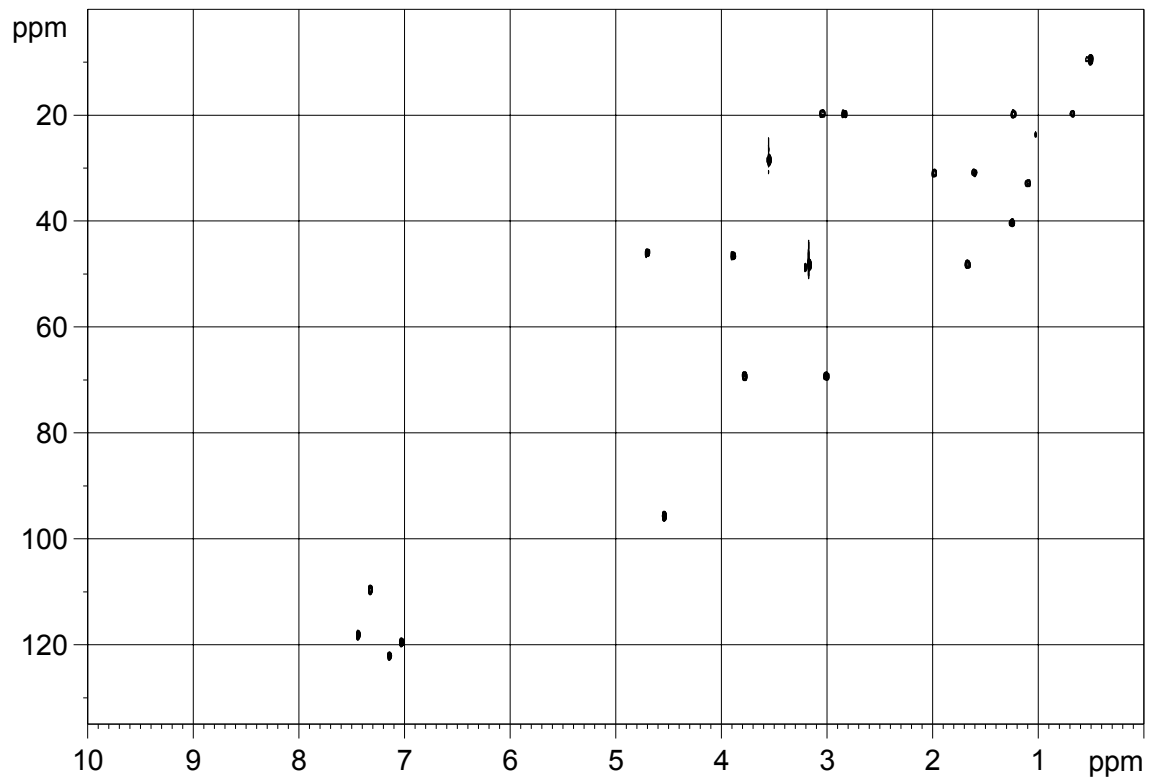
HSQC-Spektrum (700 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 % MeOD-d<sub>4</sub>): Ajmalin



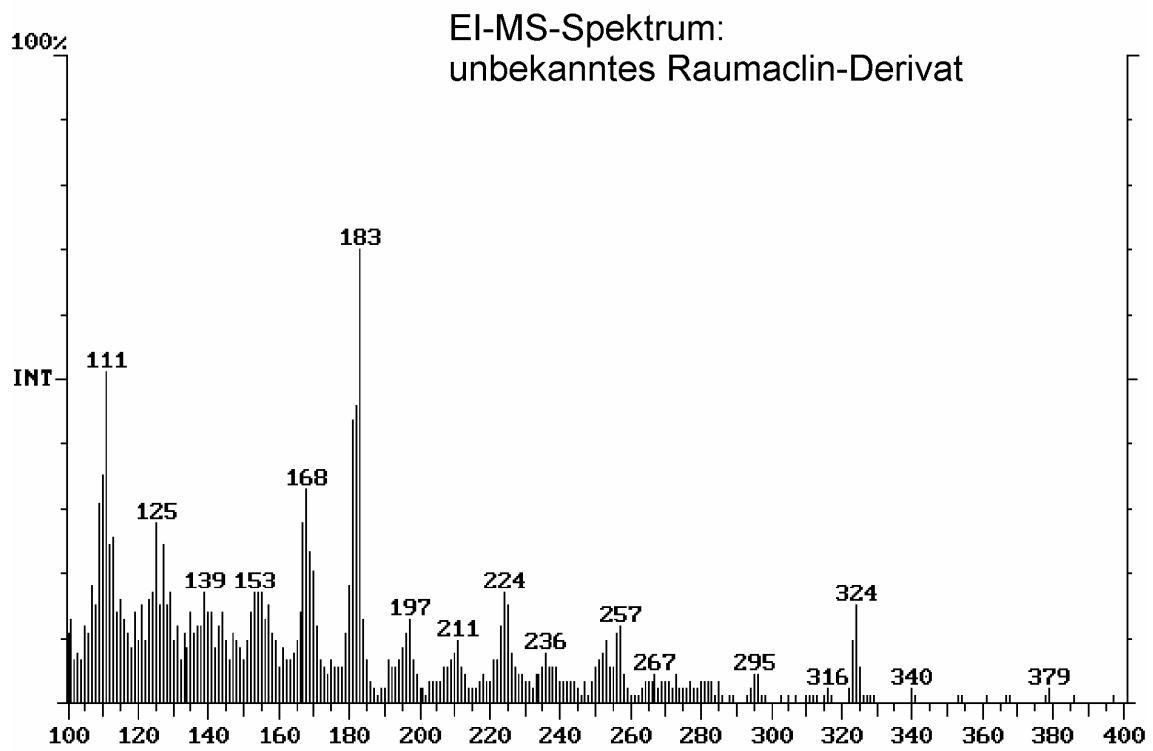
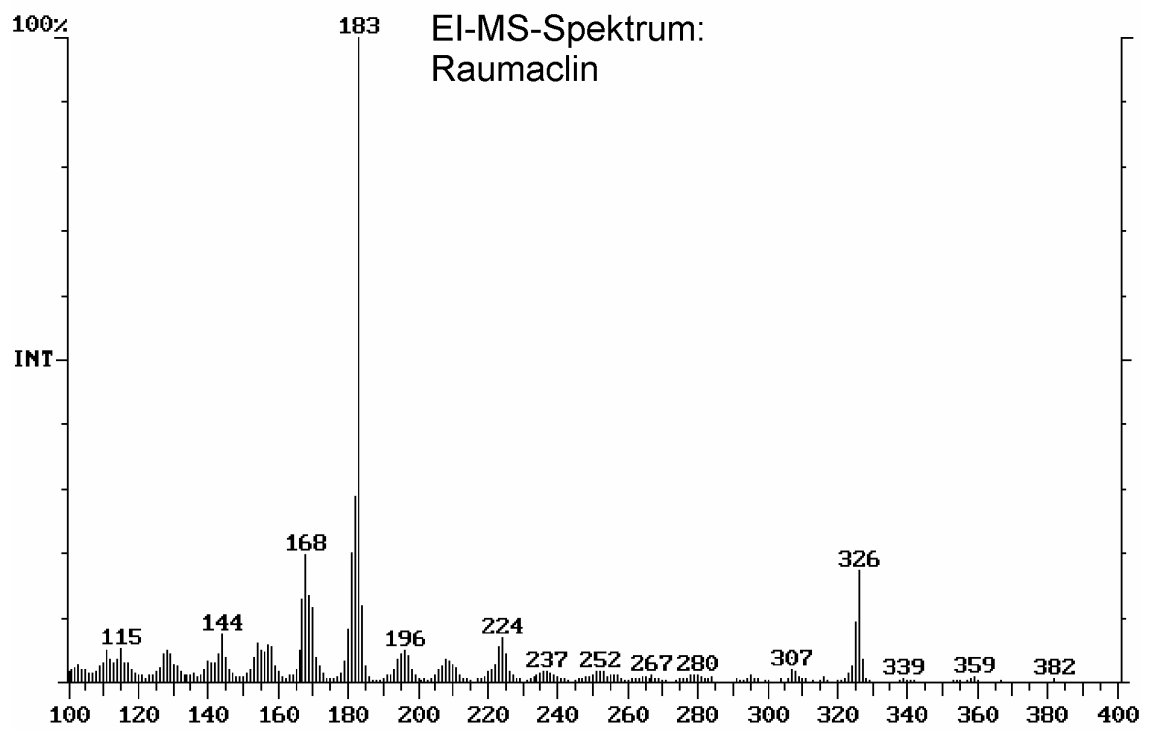
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ ): Raumaclin



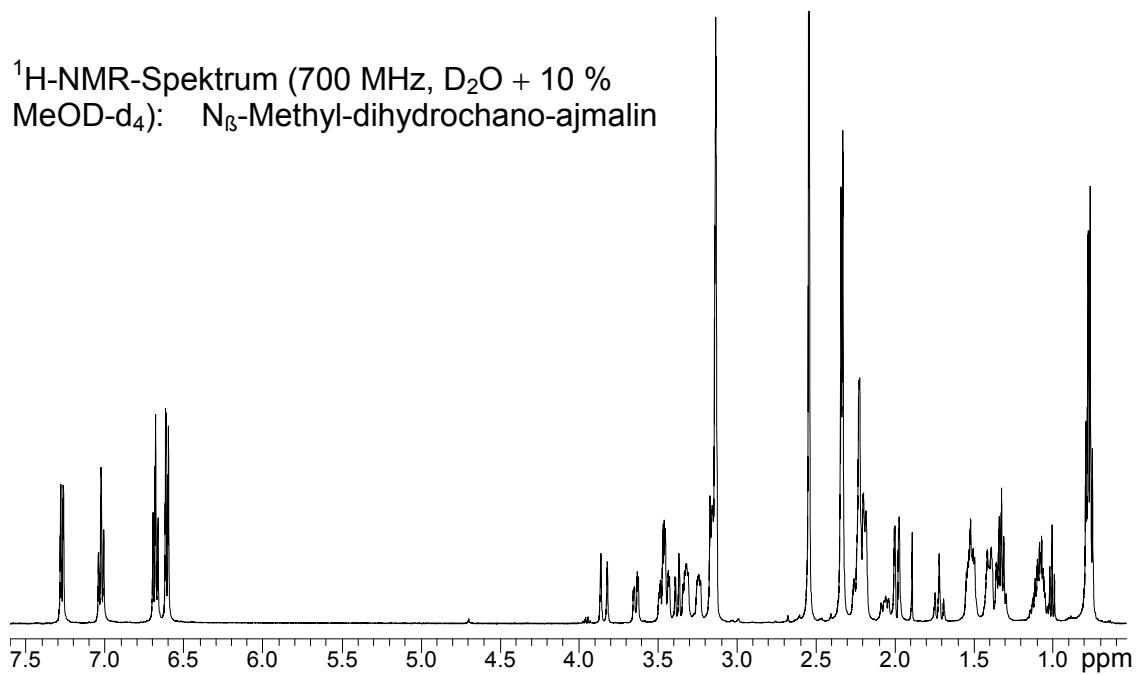
HSQC-Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\% \text{ MeOD-d}_4$ ): Raumaclin



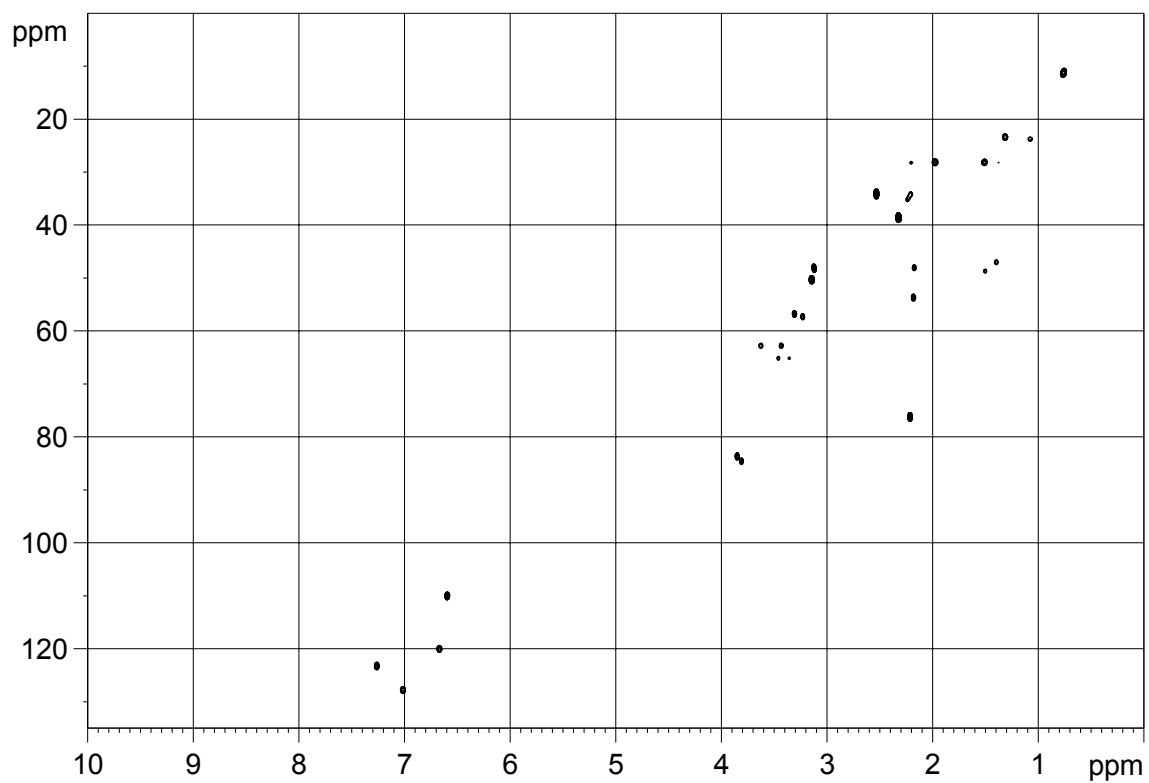




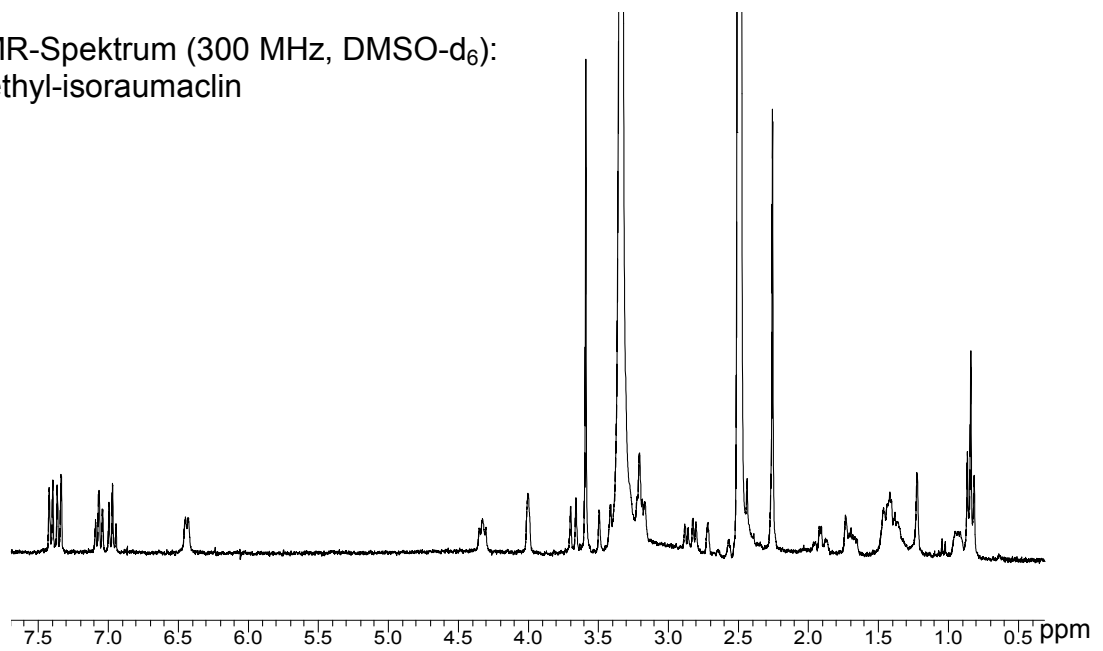
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\%$  MeOD- $\text{d}_4$ ):  $\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin



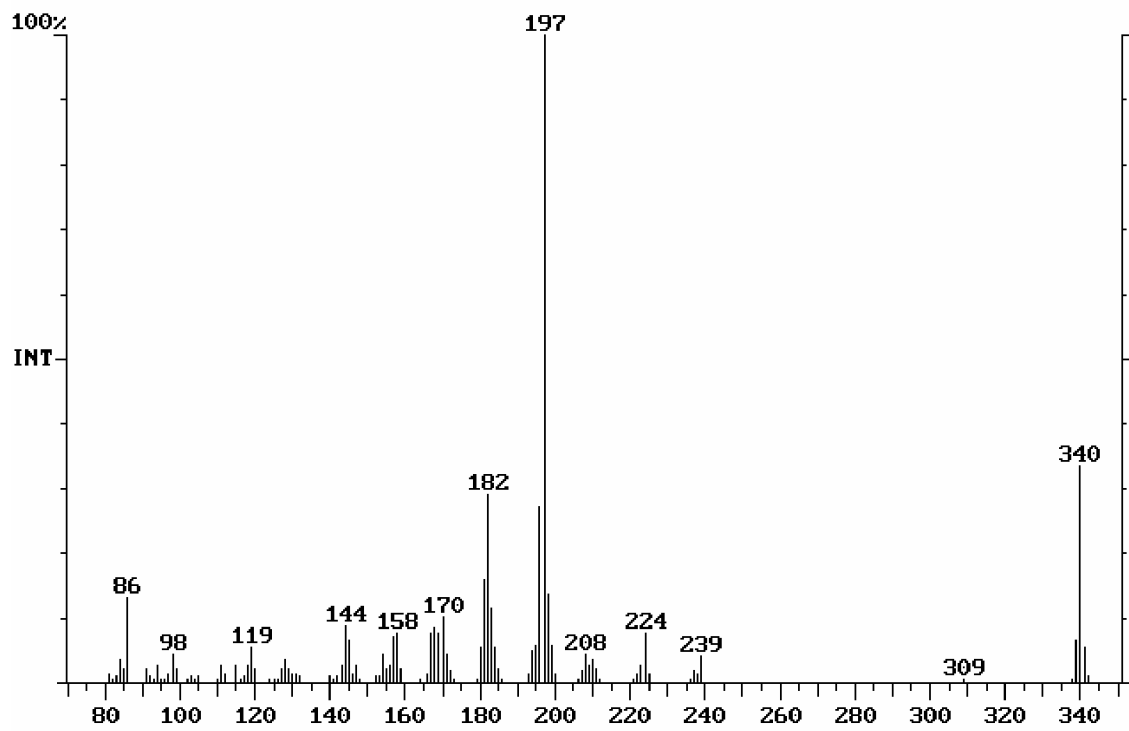
HSQC-Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\%$  MeOD- $\text{d}_4$ ):  
 $\text{N}_\beta$ -Methyl-dihydrochano-ajmalin



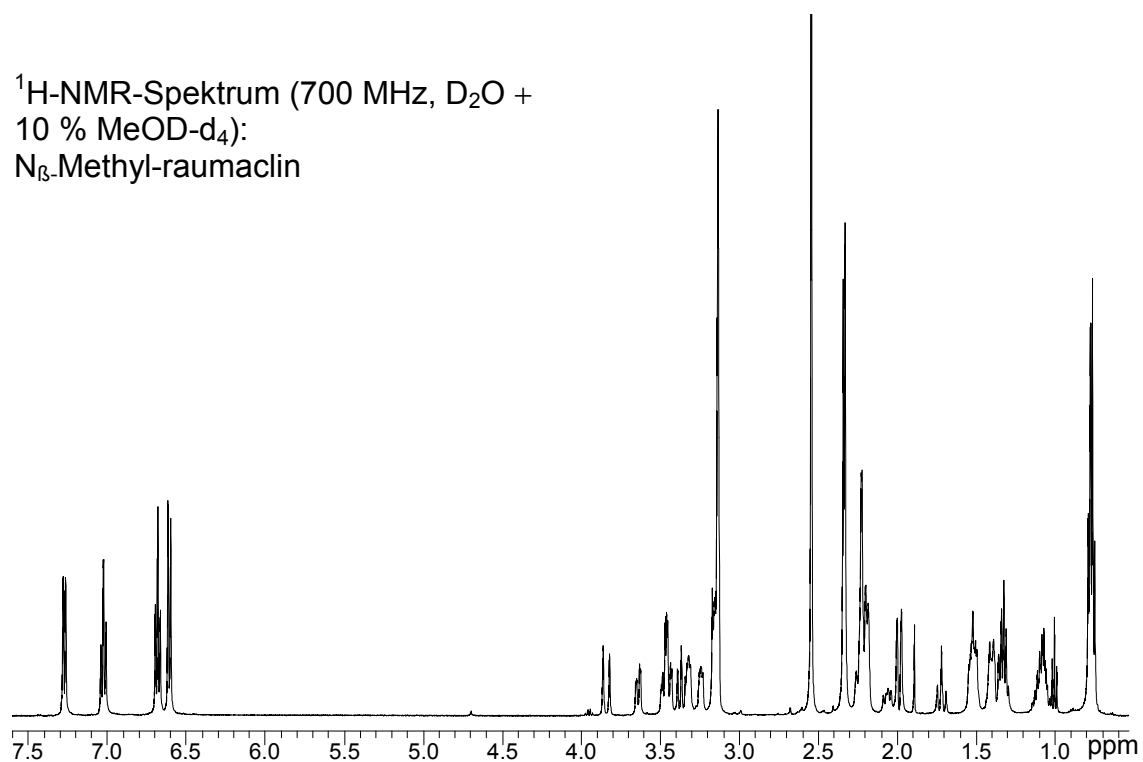
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
N $\beta$ -Methyl-isoraumaclin



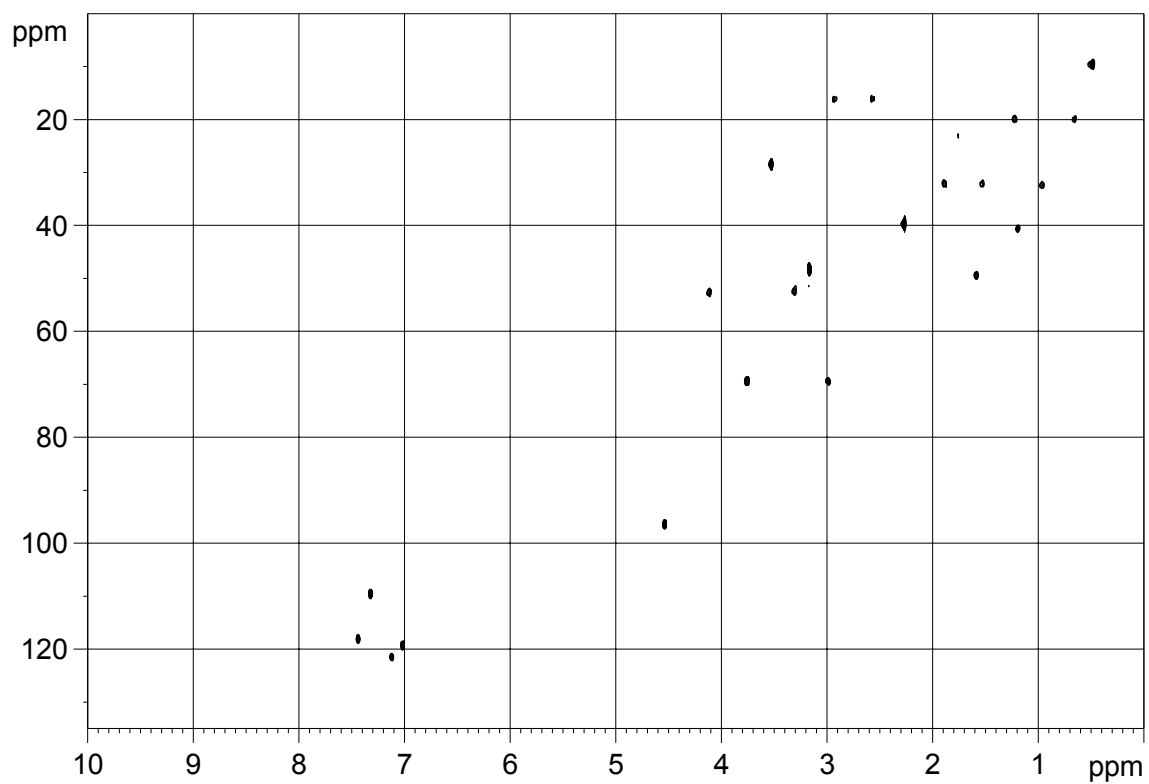
EI-MS-Spektrum:  
N $\beta$ -Methyl-isoraumaclin



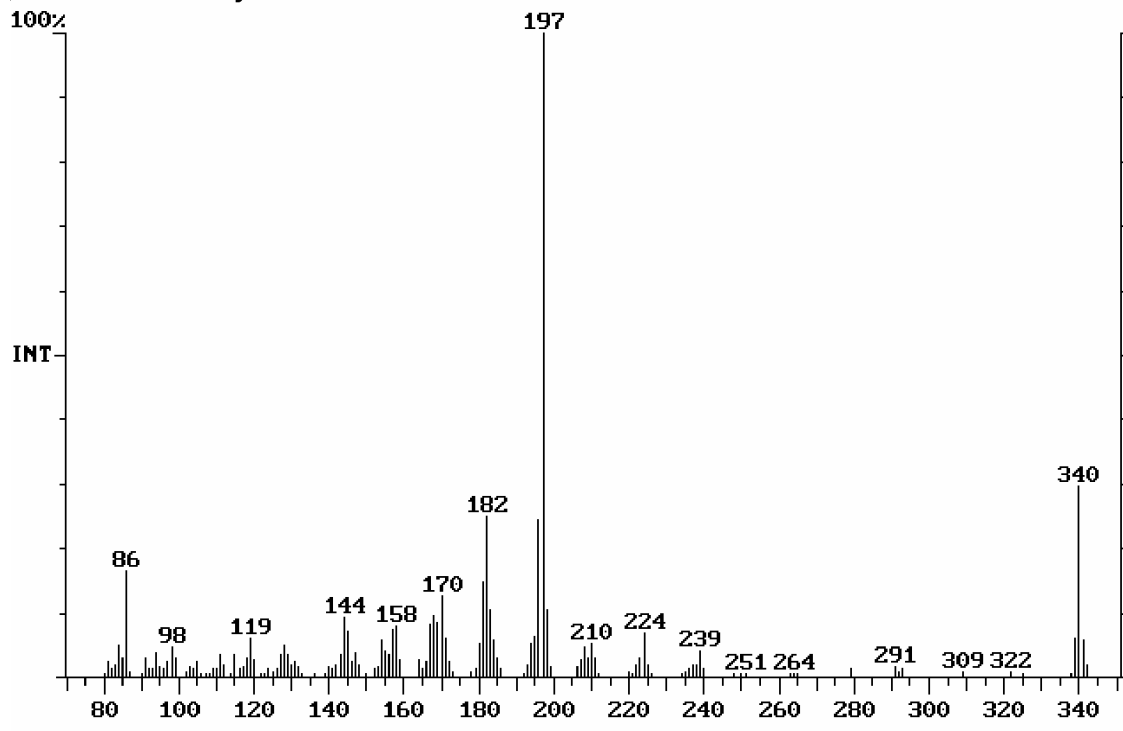
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  + 10 %  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\text{N}_\beta$ -Methyl-raumaclin



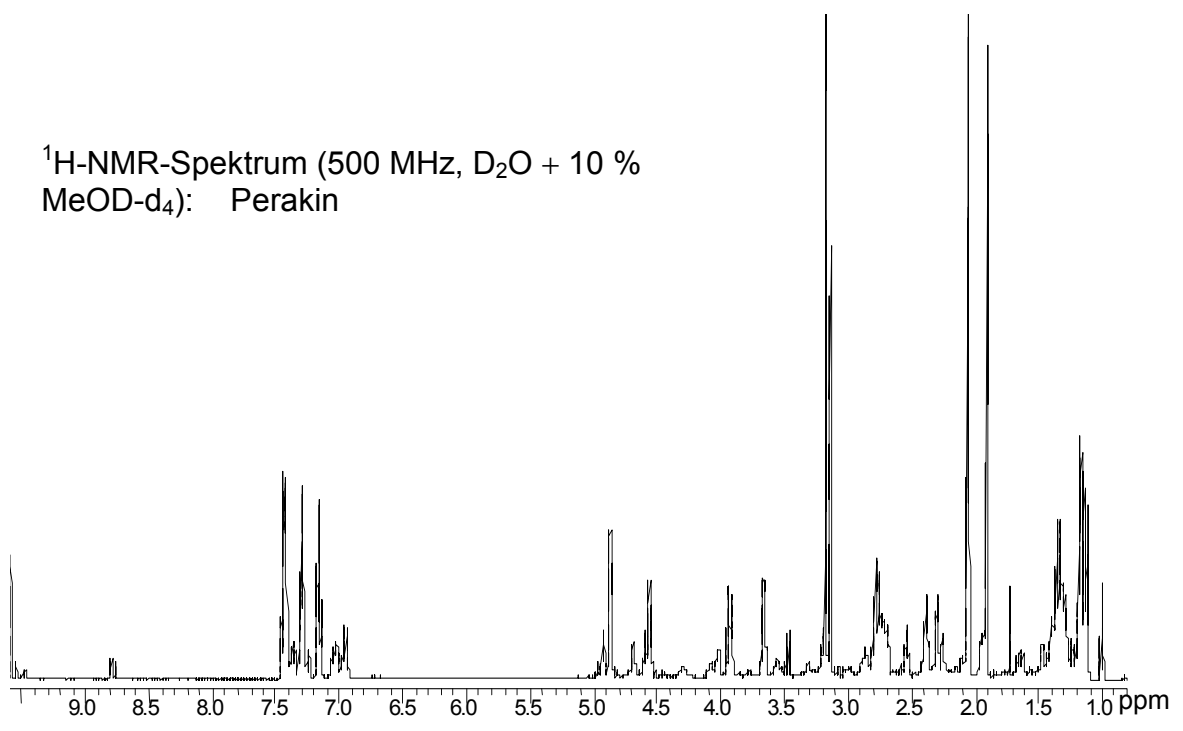
HSQC-Spektrum (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  + 10 %  $\text{MeOD-d}_4$ ):  $\text{N}_\beta$ -Methyl-raumaclin



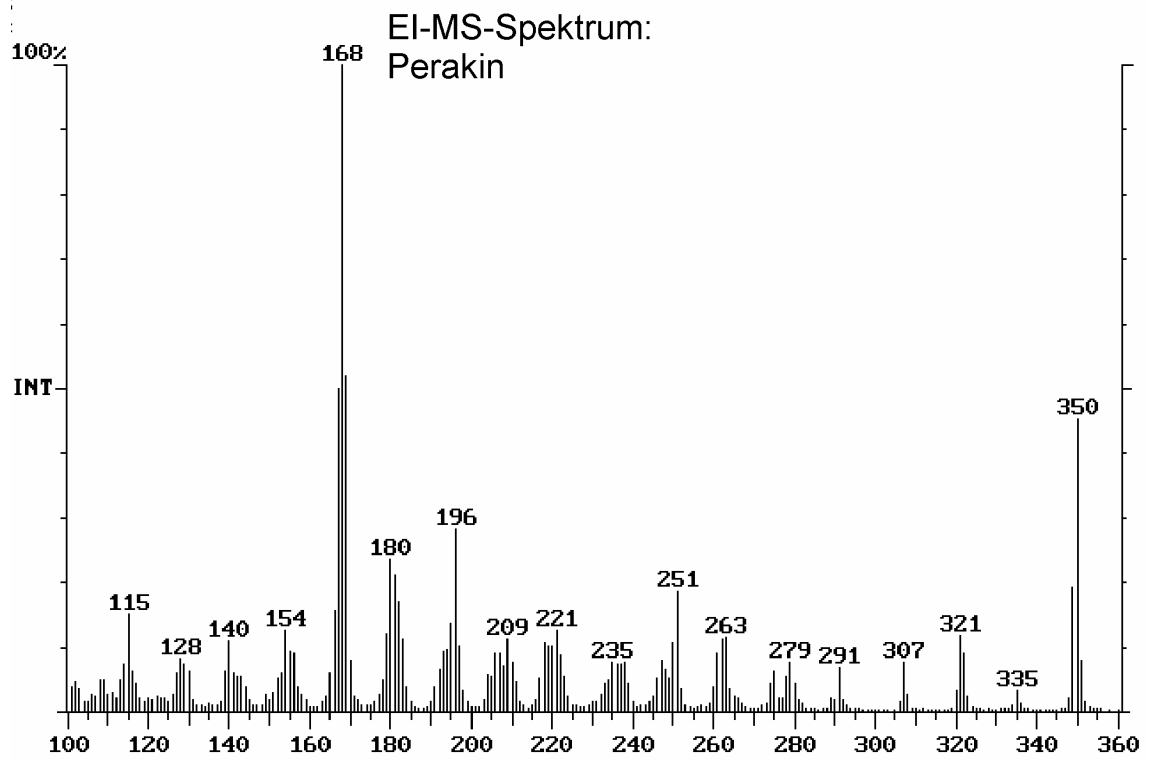
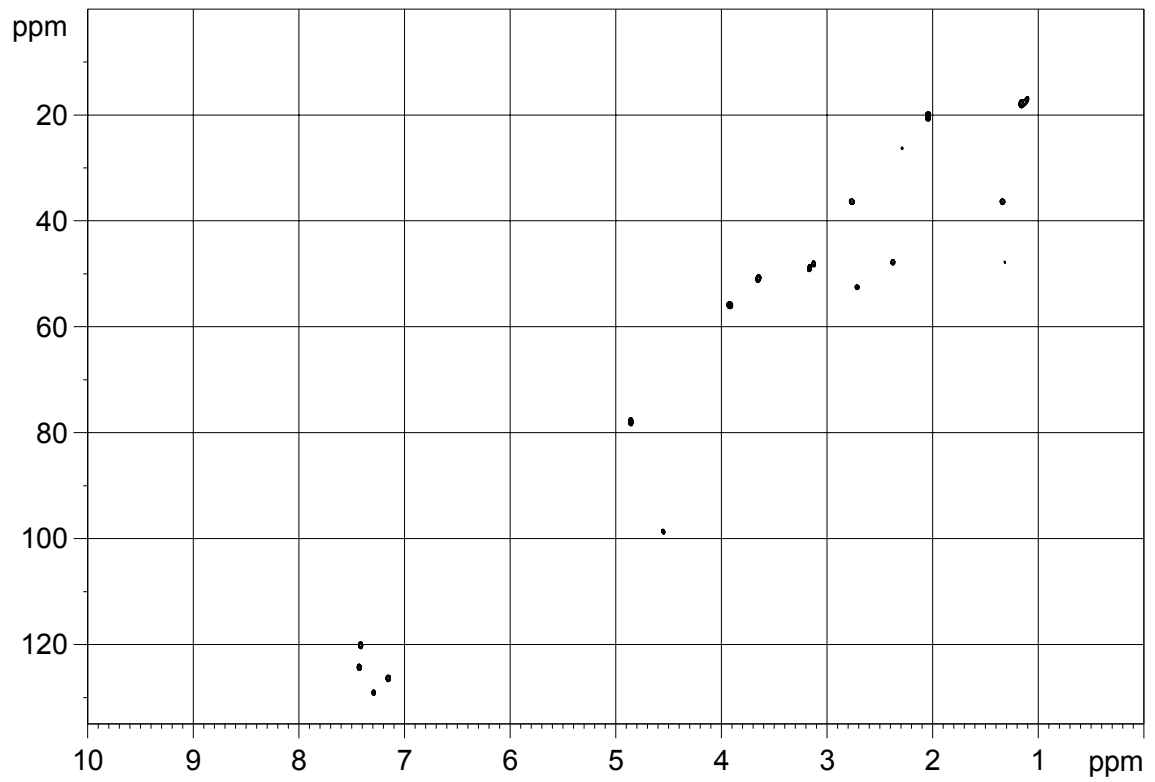
EI-MS-Spektrum:  
N $\beta$ -Methyl-raumaclin



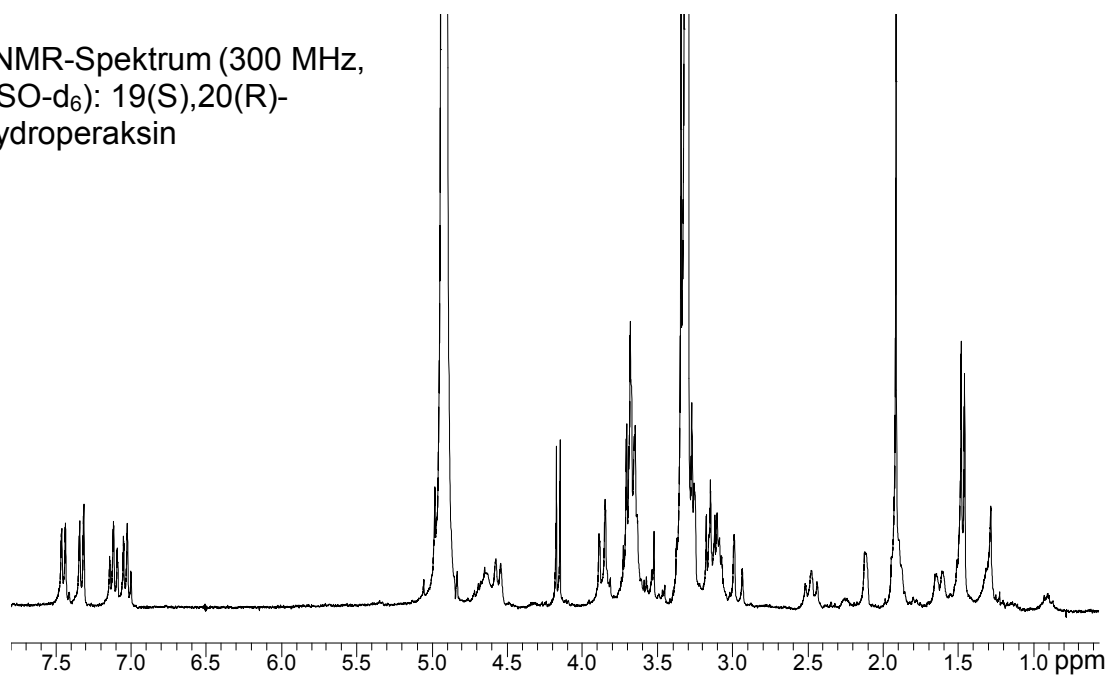
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + 10\%$   
 $\text{MeOD-d}_4$ ): Perakin



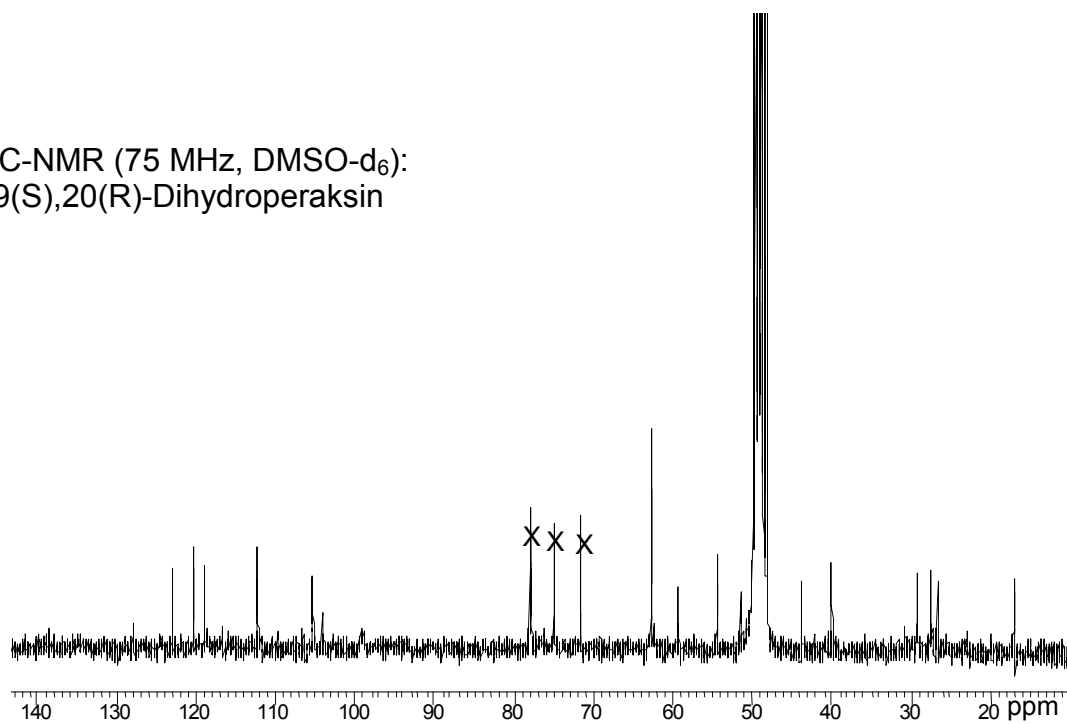
HSQC-Spektrum (500 MHz, D<sub>2</sub>O + 10 % MeOD-d<sub>4</sub>): Perakin



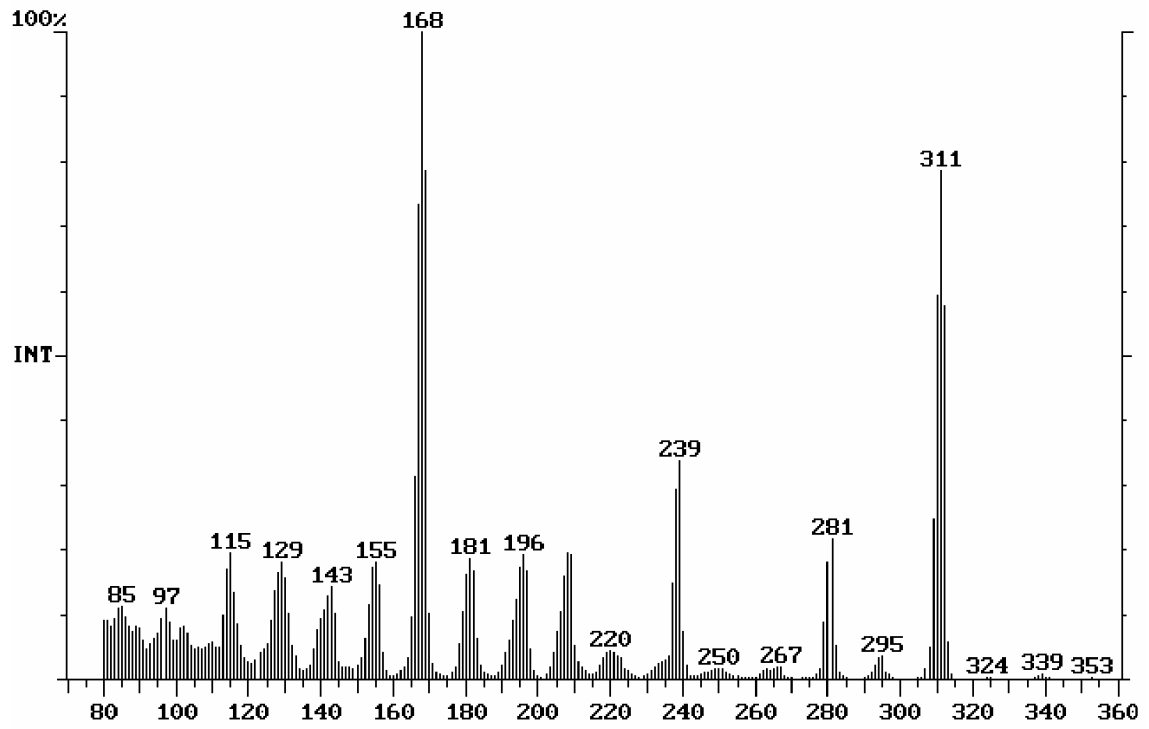
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  
DMSO- $\text{d}_6$ ): 19(S),20(R)-  
Dihydroperaksin



$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  
19(S),20(R)-Dihydroperaksin



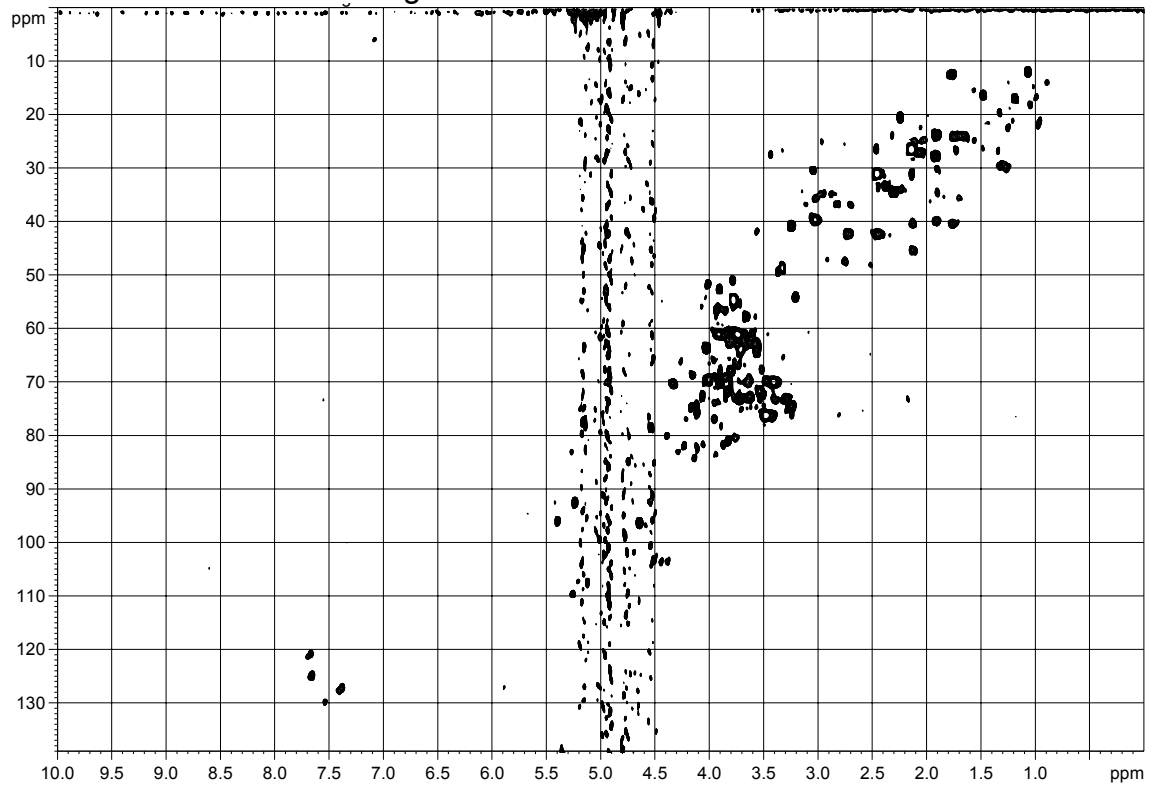
EI-MS-Spektrum:  
19(S),20(R)-Dihydroperaksin



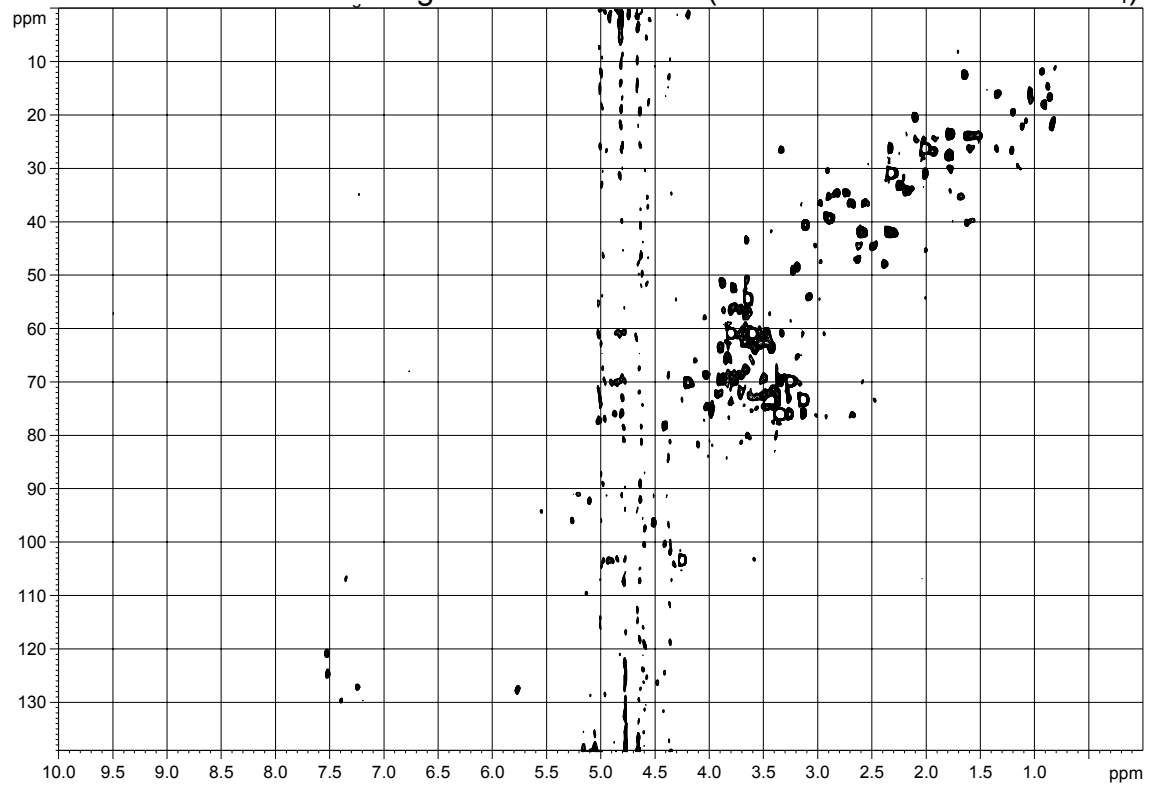


## *in vivo* Spektren

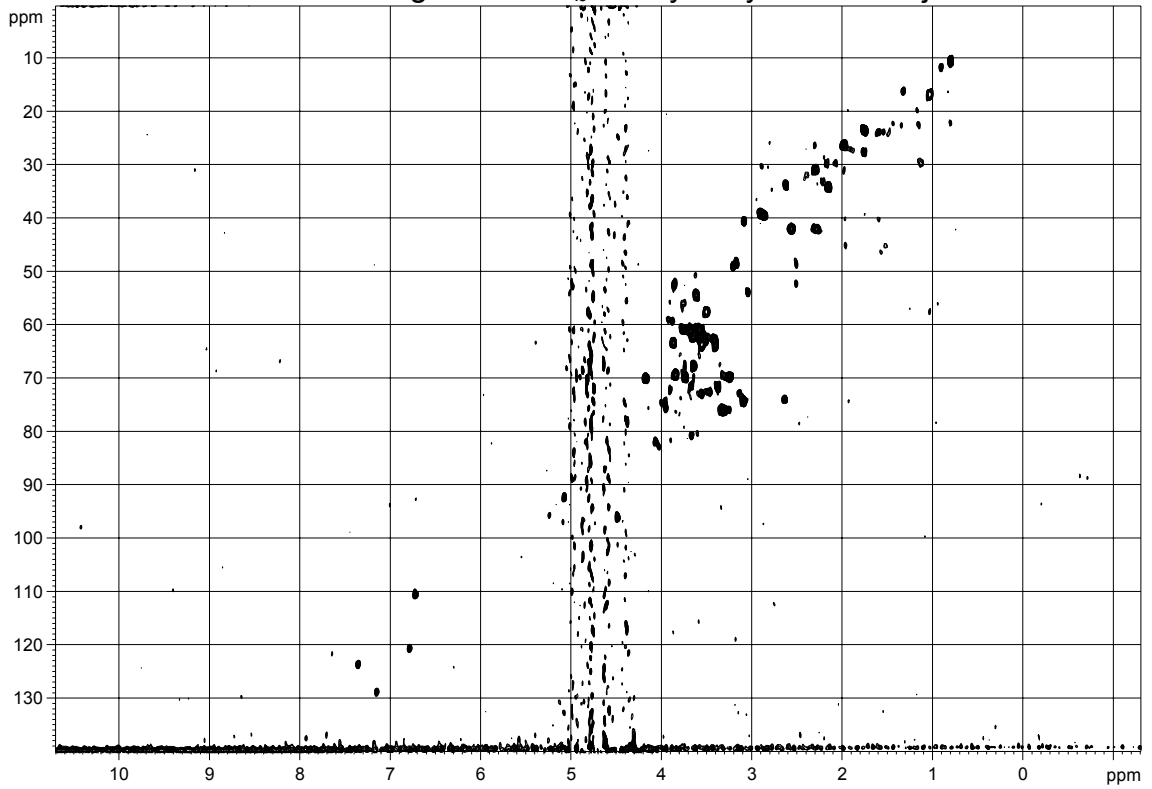
RxR-Zellen 2 h nach Zugabe von Vomilenin



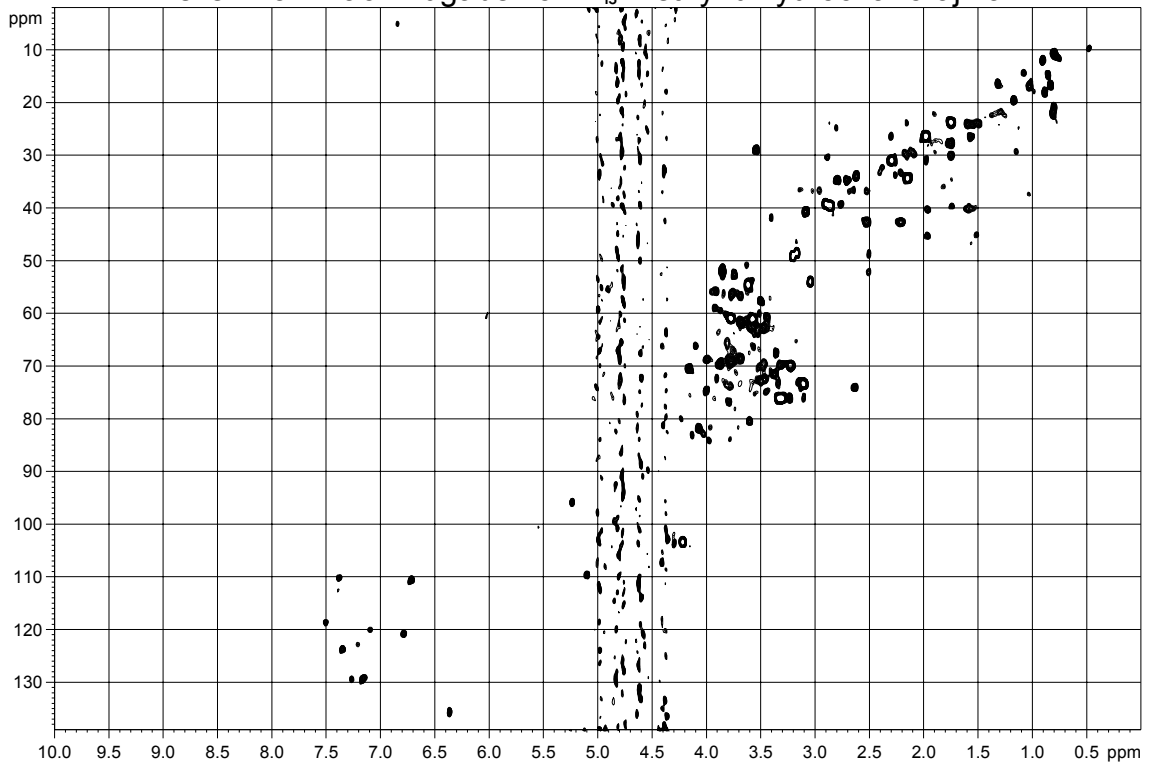
RxR-Zellen 72 h nach Zugabe von Vomilenin (Probe enthält noch MeOD-d<sub>4</sub>)



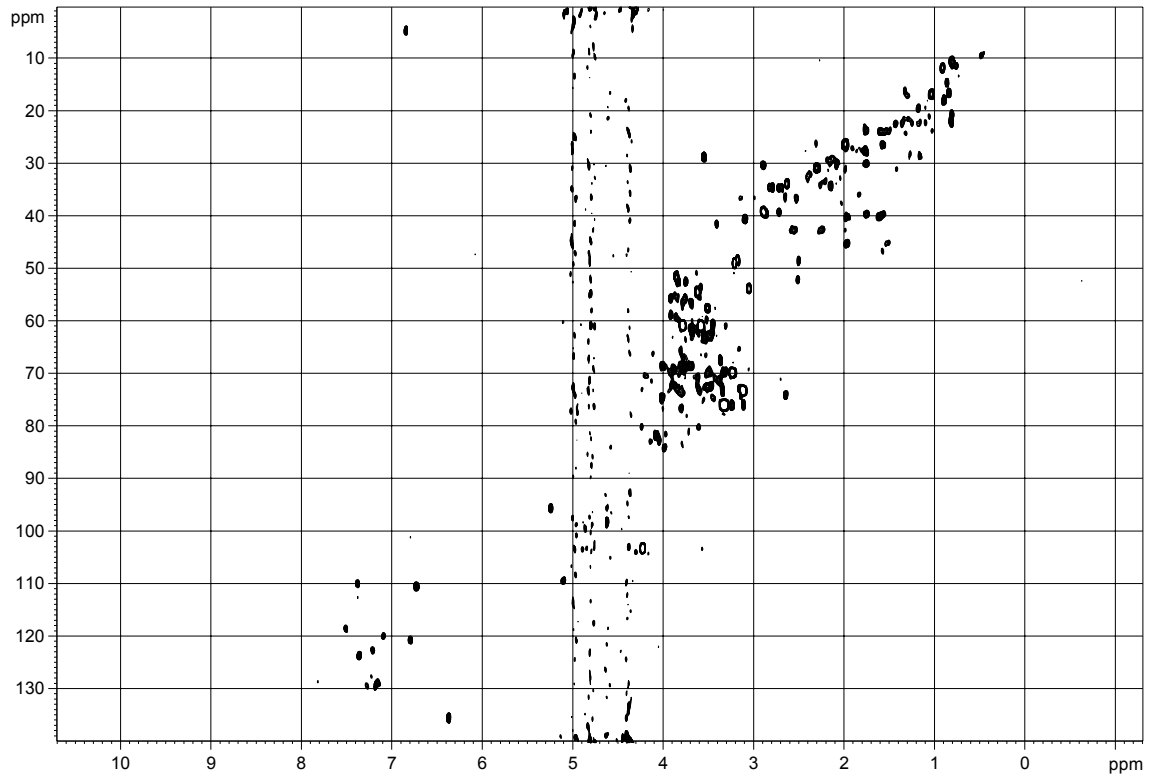
RxR-Zellen 1 h nach Zugabe von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin



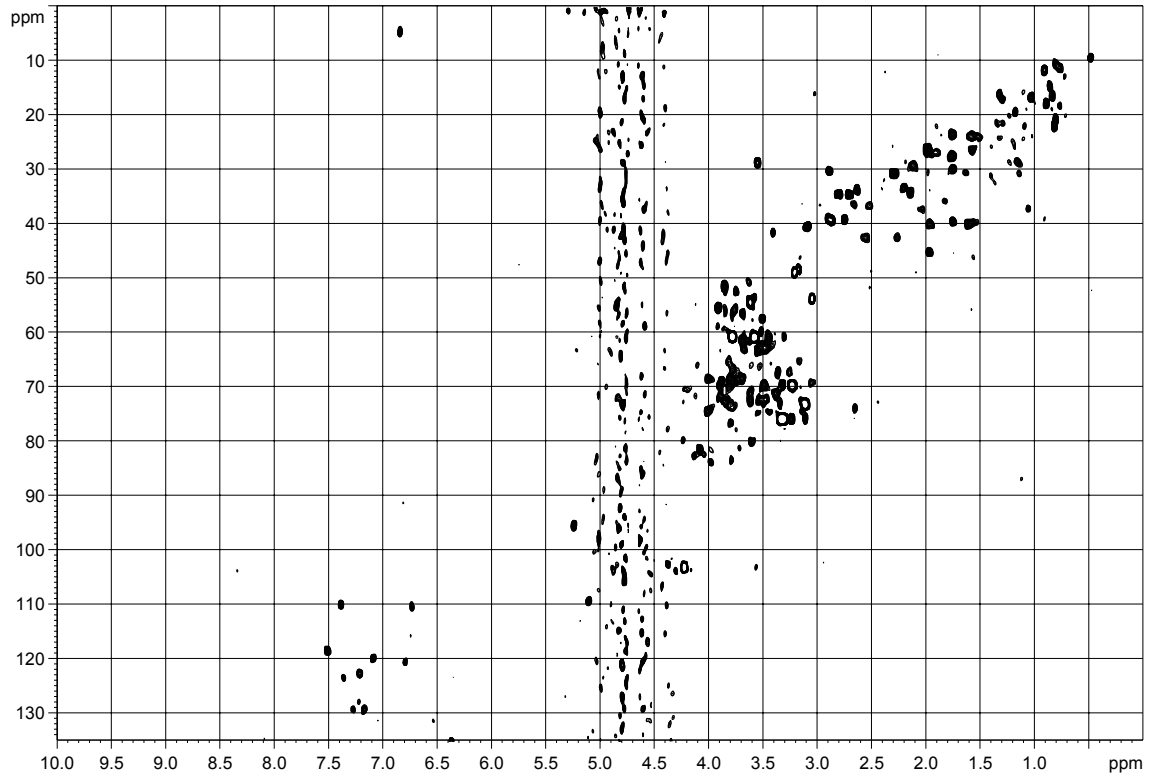
RxR-Zellen 43 h nach Zugabe von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin



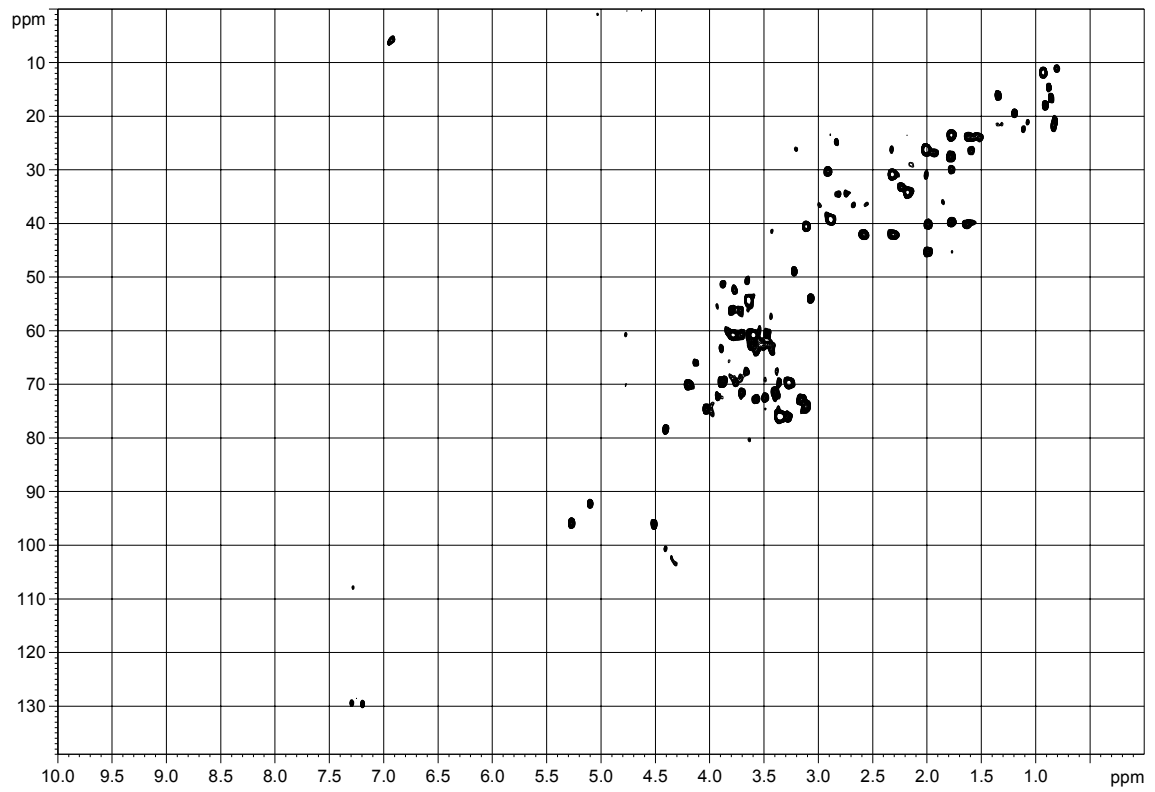
RxR-Zellen 72 h nach Zugabe von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin



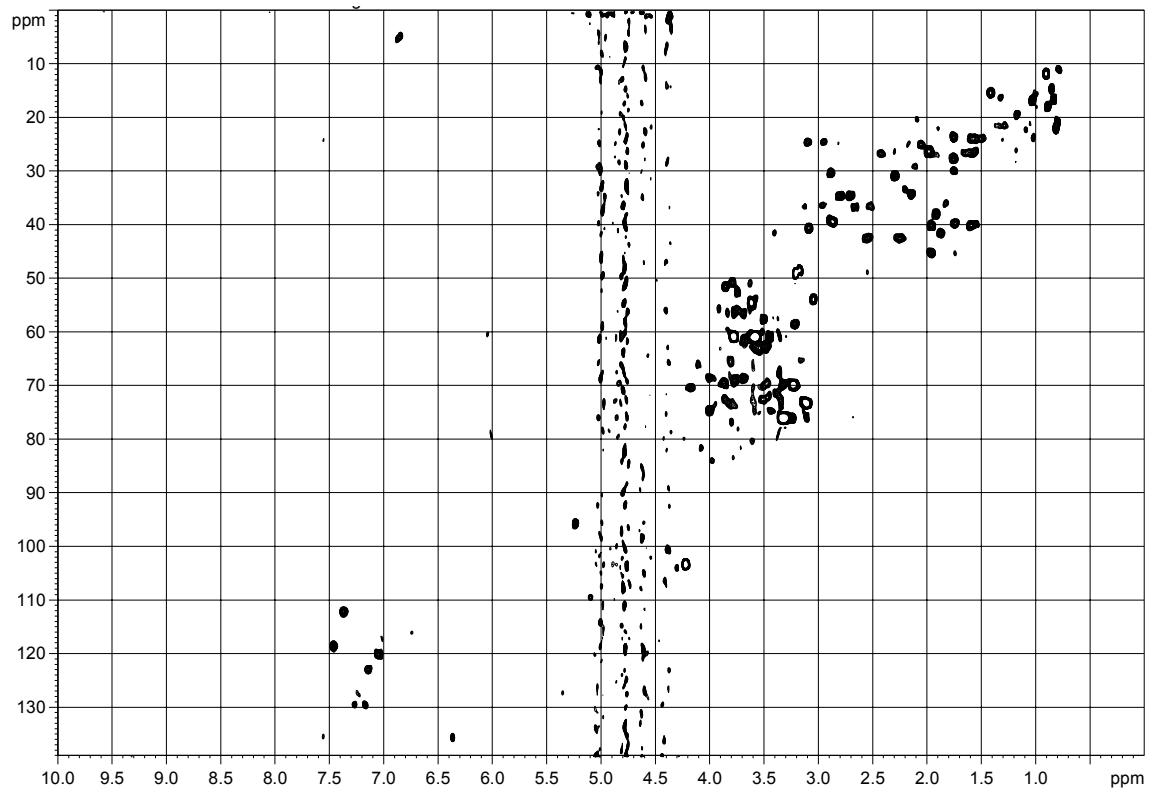
RxR-Zellen 120 h nach Zugabe von N<sub>β</sub>-Methyl-dihydrochano-ajmalin



RxR-Zellen



RxR-Zellen 72 h nach Zugabe von Perakin



RxR-Zellen 96 h nach Zugabe von Perakin

