

Strukturaufklärung von Naturstoffen aus marinen und terrestrischen Quellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Thomas Majer

aus Rotenburg an der Fulda

Tübingen

2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

04.08.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Harald Groß

2. Berichterstatter:

PD Dr. Bertolt Gust

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: *Strukturaufklärung von Naturstoffen aus marinen und terrestrischen Quellen* selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Inhaltlich bereits veröffentlichte Teile sind im Kapitel Publikationen aufgeführt, die Beiträge anderer Wissenschaftler sind im Kapitel Beiträge weiterer Wissenschaftler aufgeführt und die Personen namentlich benannt. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Publikationen	vii
Beiträge weiterer Wissenschaftler zu dieser Arbeit	viii
Abkürzungen und Einheiten	xii
Zusammenfassung	xvi
Strukturaufklärung von Naturstoffen aus marinen Quellen	1
1. Einleitung	2
1.1. Marine Naturstoffforschung – eine historische Betrachtung	2
1.2. Schwämme als Naturstoffproduzenten	3
1.2.1. Chemische Abwehr als Überlebensstrategie	3
1.2.2. Schwammmetaboliten als Arzneistoffe	6
1.2.3. Naturstoffe von Schwämmen der Gattung <i>Ircinia</i>	9
1.2.3.1. Übersicht	9
1.2.3.2. <i>Ircinia wistarii</i>	11
2. Ziel der Arbeit	13
3. Ergebnisse und Diskussion	14
3.1. Isolierung und Strukturaufklärung	14
3.1.1. Auswahl der Schwammprobe	14
3.1.2. Fraktionierung und Priorisierung der Fraktionen	17
3.1.3. Aufarbeitung der 90%-Fraktion	23
3.1.3.1. Isolation der Substanzen aus der 90%-Fraktion	23
3.1.3.2. Strukturuntersuchungen von Peak V (Ircinianin)	24

Inhaltsverzeichnis

3.1.4.	Aufarbeitung der 50%-Fraktion	30
3.1.4.1.	Isolation der Substanzen aus der 50%-Fraktion	30
3.1.4.2.	Strukturuntersuchungen von Peak I (Ircinianin Lactam A)	32
3.1.4.3.	Strukturanalyse von Peak II (Oxoircinianin Lactam A)	33
3.1.5.	Aufarbeitung der 100%-Fraktion	34
3.1.5.1.	Isolation der Substanzen aus der 100%-Fraktion	34
3.1.5.2.	Strukturuntersuchungen von Peak III-V	36
3.1.5.3.	Strukturuntersuchungen von Peak II (Ircinianin Lacton B)	40
3.1.5.4.	Strukturuntersuchungen von Peak I (Ircinianin Lacton C)	48
3.1.6.	Biosynthetische Betrachtungen	55
3.2.	Untersuchungen zur Bioaktivität	59
3.2.1.	Bioaktivitätstestungen von Ircinianin	59
3.2.1.1.	Antibakterielle Aktivität	60
3.2.1.2.	Antivirale Aktivität	61
3.2.1.3.	Antiprotozoische Aktivität	62
3.2.1.4.	Zytotoxische Aktivität	63
3.2.1.5.	Antifouling-Effekte	64
3.2.2.	Bioaktivitätstestungen der Ircinianin-Derivate	65
3.3.	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	65
	Strukturaufklärung von Naturstoffen aus terrestrischen Quellen	68
4.	Einleitung	69
4.1.	Peptide im Kontext der Naturstoffforschung	69

Inhaltsverzeichnis

4.2.	Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen und deren Produkte	69
4.3.	Ribosomal gebildete und posttranslational modifizierte Peptide	70
4.4.	Lasso peptide	72
4.4.1.	Klassen und schematischer Aufbau	72
4.4.2.	Lasso peptide sind bioaktive Substanzen	74
5.	Vorarbeiten	76
6.	Ziel der Arbeit	78
7.	Ergebnisse und Diskussion	79
7.1.	Kultivierung und Isolierung von Nocapeptin A	79
7.2.	NMR basierte Strukturaufklärung von Nocapeptin A	80
7.2.1.	Bestimmung der einzelnen Aminosäuren anhand ihrer Spinsysteme	83
7.2.2.	Verknüpfung der Aminosäuren zur Peptidsequenz	86
7.2.3.	Quervernetzung der Seitenketten im Tryptophan-Tyrosin-Motiv	87
7.2.4.	Analyse des ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrums von Nocapeptin A	91
7.2.5.	Sekundärstruktur der Glycin-Prolin-Peptidbindung	92
7.2.6.	Amidgruppe von Glycin 9	93
7.3.	Weitere spektroskopische Untersuchungen	95
7.4.	Bioaktivitätstestungen von Nocapeptin A	95
7.4.1.	Zytotoxizität	96
7.4.2.	Antibakterielle Aktivität	97
7.5.	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	98
8.	Abschließende Gesamtbetrachtung	106

Allgemeiner Teil	110
9. Material und Methoden	111
9.1. Materialien und Hilfsmittel	111
9.1.1. Verwendete Chemikalien und Hilfsmittel	111
9.1.2. Tierisches Material	111
9.1.3. Bakterien-Stämme für Produktion von Nocapeptin A	111
9.1.4. Nährmedien und deren Zusammensetzung zur Kultivierung von <i>Nocardia terpenica</i>	112
9.1.5. Verwendete Geräte / Spektrometer	113
9.1.6. Software	114
9.2. Methoden	114
9.2.1. Extraktion und Fraktionierung der Terpene	114
9.2.2. Kultivierung von <i>Nocardia terpenica</i>	115
9.2.3. Extraktion und Fraktionierung von Nocapeptin A	116
9.2.4. Analytische Methoden	117
9.2.4.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	117
9.2.4.1.1. HPLC-Methoden zur Isolation und Aufreinigung der Terpene	117
9.2.4.1.2. HPLC-Methoden zur Isolation und Aufreinigung von Nocapeptin A	119
9.2.4.2. Massenspektroskopie	120
9.2.4.3. NMR-Spektroskopie	120
9.2.4.3.1. Strukturaufklärung der marinen Terpene mittels NMR	120
9.2.4.3.2. Strukturaufklärung von Nocapeptin A mittels NMR	121

Inhaltsverzeichnis

9.2.4.4.	Optische Drehung	122
9.2.4.5.	Infrarot (IR) Spektroskopie	122
9.2.4.6.	Ultraviolett / Visible (UV/Vis) Spektroskopie	123
9.2.4.7.	Circulardichroismus (CD) Spektroskopie	123
9.2.4.8.	Kristallisation von Ircinianin	123
9.2.5.	Computergestützte chemische Untersuchungen	123
9.2.6.	Biologische Testungen	125
9.2.6.1.	Antibakterielle Aktivität	125
9.2.6.2.	Antivirale Aktivität	125
9.2.6.3.	Antiprotozoische Aktivität	127
9.2.6.4.	Zytotoxizität	129
9.2.6.5.	Antifouling-Aktivität im marinen Ökosystem	131
10.	Anhang	133
11.	Literatur	167
	Danksagung	183
	Lebenslauf	184

Publikationen

Die vorliegende Arbeit ist während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Harald Groß am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Pharmazeutisches Institut, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, entstanden.

Die Arbeit baut inhaltlich auf mehreren bereits veröffentlichten Publikation auf:

Majer, T.; Schollmeyer, D.; Koch, P.; Gross, H. (2*S*,3'*S*,3*a'**R*,5'*R*,7*a'**R*)-5'-[(*E*)-5-(Furan-3-yl)-2-methylpent-1-en-1-yl]-3-hydroxy-3',4,7'-trimethyl-1',2',3',3*a'*,5',7*a'*-hexahydro-5*H*-spiro[furan-2,4'-inden]-5-one. *IUCrData* 2020, 5, x201578, doi:10.1107/S2414314620015783.

Majer, T.; Bhattarai, K.; Straetener, J.; Pohlmann, J.; Cahill, P.; Zimmermann, M.O.; Hübner, M.P.; Kaiser, M.; Svenson, J.; Schindler, M.; Brötz-Oesterhelt, H.; Boeckler, F.M.; Gross, H. Discovery of Ircinianin Lactones B and C—Two New Cyclic Sesterterpenes from the Marine Sponge *Ircinia wistarii*. *Mar. Drugs* 2022, 20, 532, doi: 10.3390/md20080532.

Ein weiterer Teil der Arbeit wurde bereits als Preprint veröffentlicht und als Manuskript bei einem Journal zur Veröffentlichung eingereicht (Reviewprozess):

Saad, H.*; Majer, T.*; Bhattarai, K.*; Lampe, S.; Nguyen, D.T.; Kramer, M.; Straetener, J.; Brötz-Oesterhelt, H.; Mitchell, D.A.; Gross, H. Bioinformatics-Guided Discovery of Biaryl-Tailored Lasso Peptides. *bioRxiv* **2023**, 2023.2003.2006.531328, doi:10.1101/2023.03.06.531328.

* gleichberechtigte Erstautoren

Beiträge weiterer Wissenschaftler zu dieser Arbeit

Beiträge im Themenbereich marine Naturstoffanalytik

Bioaktivitätstestungen

Die antibakteriellen Effekte wurden von Herrn Jan Straetener im Arbeitskreis von Frau Professor Heike Brötz-Oesterhelt, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT), Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, untersucht und analysiert (vgl. Tabelle 13).

Die antiviralen Assays wurden von Herrn Justus Pohlmann im Arbeitskreis von Herrn Professor Michael Schindler, Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, durchgeführt und ausgewertet (siehe Abbildung 42).

Die Untersuchungen zu antiprotozoischen Effekten wurden von Monica Cal, Romina Rocchetti und Sonja Keller-Märki im Arbeitskreis von Herrn Professor Marcel Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil, Schweiz, durchgeführt und beurteilt (vgl. Tabelle 14).

Die Antifouling-Assays wurden von Dr. Patrick Cahill und Dr. Johan Svenson am Cawthron Institute, Nelson, Neuseeland, durchgeführt und interpretiert.

Die Untersuchungen zum zytotoxischen Potential der Verbindungen wurden vom National Cancer Institute (NCI), USA im Rahmen des NCI-60 anticancer screening service des Development Therapeutics Program (DTP) durchgeführt und ausgewertet (siehe Tabelle 16). Zudem fanden weitere Untersuchungen in den Arbeitskreisen von Frau Professor Heike Brötz-Oesterhelt und Herrn Professor Marcel Kaiser statt (vgl. Tabelle 15).

Computergestützte Methoden

Die Quantenmechanischen Berechnungen zur Bestimmung der Stereochemie von Ircinianin Lacton C und deren graphische Ausarbeitung (Abbildung 39) wurden von Herrn Dr. Markus Zimmermann und Herrn Professor Frank Böckler, Labor Molekulares Design & Pharmazeutische Biophysik, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, ausgeführt und die Ergebnisse wurden mit Ihnen und Herrn Professor Harald Groß,

Pharmazeutische Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den gemessenen NMR-Daten (^1H - ^1H NOESY Spektrum) diskutiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 und 40 dargestellt.

Analytische und spektroskopische Methoden

Die Aufreinigung der 100%-Fraktion wurde von Herrn Martin Schwer (Master-Student) und Herrn Keshab Bhattarai (Doktorand im Arbeitskreis Prof. Dr. Harald Groß, Pharmazeutische Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen) unterstützt. Die Messungen des IR- und CD-Spektrums wurden zusammen mit Herrn Professor Harald Groß durchgeführt.

Die Messungen zur hochauflösenden Massenspektrometrie wurden von Frau Dr. Dorothee Wistuba und dem Team der MS-Abteilung, Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, durchgeführt.

Die Kristalle wurden von Herrn Dr. Dieter Schollmeyer, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, vermessen und von ihm zusammen mit Herrn Professor Pierre Koch, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Universität Regensburg, Regensburg, analysiert (siehe Abbildung 16).

Beiträge im Themenbereich terrestrische Naturstoffanalytik

Vorarbeiten

Der Teil dieser Arbeit baut inhaltlich auf der Doktorarbeit *Expanding The Chemical Space of RiPPs in Rare Actinobacteria Employing a Tunable Metabologenomic Approach* von Herrn Dr. Hamada Saad (ehemaliger Doktorand im Arbeitskreis Prof. Dr. Harald Groß, Pharmazeutische Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen; mittlerweile Postdoc in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Douglas Mitchell, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign) auf.

Bioaktivitätstestungen

Die antibakteriellen Effekte wurden von Herrn Jan Straetener im Arbeitskreis von Frau Professor Heike Brötz-Oesterhelt, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen (IMIT), Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, durchgeführt und ausgewertet (vgl. Tabelle 20).

Die Untersuchungen zum zytotoxischen Potential der Verbindungen wurden vom National Cancer Institute (NCI), USA im Rahmen NCI-60 anticancer screening service des Development Therapeutics Program (DTP) durchgeführt und analysiert (siehe Tabelle 19).

Kultivierung, Extraktion und Aufreinigung

Die Kultivierungsansätze zur Gewinnung des Rohmaterials und die Extraktion wurden zum größten Teil von Keshab Bhattarai und Dr. Hamada Saad (zum damaligen Zeitpunkt waren beide Doktoranden im Arbeitskreis Prof. Dr. Harald Groß, Pharmazeutische Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen) durchgeführt. Die Aufreinigung der Substanz aus dem Rohextrakt an der HPLC wurde von Keshab Bhattarai unterstützt.

Analytische und spektroskopische Methoden

Die Messungen am 700 MHz NMR-Spektrometer wurden von Herrn Dr. Markus Kramer und dem Team der NMR-Abteilung, Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, durchgeführt. Außerdem wurden von der Abteilung die Pulse zur Messung des ^1H - ^{13}C LR-HSQMBC Experiments manuell aufgesetzt.

Die Messungen zur hochauflösenden Massenspektrometrie wurden von Frau Dr. Dorothee Wistuba und dem Team der MS-Abteilung, Institut für Organische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, durchgeführt.

Die Messung des IR-, UV- und CD-Spektrums sowie die Messungen des selective gradient 1D TOCSY Experiments wurden zusammen mit Herrn Professor Harald Groß durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben für die NMR-Messungen und das

Beiträge weiterer Wissenschaftler zu dieser Arbeit

Prozessieren der Spektren wurden teilweise von Herrn Professor Harald Groß und Herrn Dr. Hamada Saad durchgeführt.

Abkürzungen und Einheiten

A	Adenylation domain
Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BGC	Biosynthetic Gene Cluster / Biosynthese Gencluster
br	broad / breites
bzw.	beziehungsweise
C	Condensation domain
c	Konzentration
Caco2 Zellen	Darmkrebszellen
CD	Circulardichroismus
CID	Collision-induced dissociation
CPRG	Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid
COSY	Correlation spectroscopy
CYP P450	Cytochrom P450 Enzym
Cys, C	Cystein
d	Dublett
Da	Dalton
DAD	Diode Array Detector / Dioden-Array-Detektor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dm	Dublett vom Multiplett
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DQF COSY	Double Quantum Filtered COSY
ESI	Elektronen Spray Ionisation
FA	Formic acid / Ameisensäure
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm

Abkürzungen und Einheiten

GFP	Green fluorescent protein / grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Gln, Q	Glutamin
Gly, G	Glycin
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HeLa	Zervixkarzinomepithelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry / hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQC-TOCSY	HSQC–Total Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
K	Kelvin
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kcal	Kilokalorie
l	Liter
LC	Liquid Chromatography / Säulenchromatographie
LR-HSQMBC	Long-range heteronuclear single quantum multiple bond correlation
M	Molar
m	Multiplett
mbar	Millibar
MeOH	Methanol
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
MHz	Megahertz

Abkürzungen und Einheiten

MHK	Minimale Hemm-Konzentration
min.	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Millimolar
MMRC	Medical Mycology Research Center
MOI	Multiplicity of infection / Multiplizität der Infektion
mol	Molar
MS	Mass Spectrometry / Massenspektrometrie
MS/MS oder MS ²	Tandem Mass Spectrometry / Tandemmassenspektrometrie mit einem Fragmentierungsschritt
mult.	Multiplizität
NCI	National Cancer Institute
n.d.	nicht detektierbar
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance / Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthetase / Nichtribosomale Peptid-Synthetase
OSMAC	One Strain-Many Compounds
PBS	phosphate buffered saline / Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	pondus hydrogenii
PMBN	Polymyxin B nonapeptide
ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
q	Quartett
quin	Quintett
RiPP	ribosomal gebildete und posttranslational modifizierte Peptide
RODEO	Rapid ORF Description and Evaluation Online
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute; Drehzahl
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAM	S-Adenosylmethionin

Abkürzungen und Einheiten

SARS CoV2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SCUBA	Self-Contained Underwater Breathing Apparatus / Gerätetauchen
Ser, S	Serin
T	Thiolation domain
t	Triplett
TE	Thioesterase domain
TFA	Trifluoressigsäure
Thr, T	Threonin
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tRNA	transfer-RNA
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
U	Unit / Einheit
UV	Ultraviolett (Spektroskopie)
V	Volt
VIS	Visible / sichtbares Licht (Spektroskopie)
YFP	Yellow fluorescent protein / gelb fluoreszierendes Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Å	Angström
Δ	Lage der Doppelbindung / Differenz
δ	chemische Verschiebung [ppm]
λ	Wellenlänge
%	Prozent
°C	Grad Celsius
$[\alpha]_D^T$	Spezifische optische Rotation, D: Natrium D-Linie, T: Temperatur bei der Messung
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
d_n	Deuterium; n: Anzahl an Atomen
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis

Zusammenfassung

Schwämme gelten seit jeher als reichhaltige Quelle von Naturstoffen, wobei insbesondere die Gattung *Ircinia* als prominenter Vertreter der Sesterterpen-Produzenten gilt. Der hier vorgestellte Schwamm *Ircinia wistarii* war als Ircinianin-Produzent bekannt. Die Ircinianin-Familie konnte später um weitere Derivate ergänzt werden, die allerdings auch in Schwämmen der Gattung *Psammocinia* gefunden wurden. Die vorliegende Studie konnte neben Ircinianin nun auch diese Derivate zum ersten Mal bei der Gattung *Ircinia* nachweisen, wobei zusätzlich zwei neue Verbindungen, Ircinianin Lacton B und C, identifiziert wurden. Deren Struktur wurde durch umfängliche spektroskopische Untersuchungen aufgeklärt und belegt. Zur Bestimmung der Stereochemie wurde zudem eine Kristallstruktur von Ircinianin angefertigt. So konnten erstmalig, auf Basis des natürlich gebildeten Terpens, alle Stereozentren der Substanz bestimmt werden. Die Arbeit gibt zudem eine detaillierte theoretische Abhandlung über die Biosynthese von Ircinianin und seinen weiteren Strukturverwandten, sodass die Kohlenstoffgerüste zusätzlich durch metabolische Prinzipien überprüft und bestätigt werden konnten. Zudem wurde mit Ircinianin, dem Stammvater der Klasse, eine der breitesten Bioaktivitätstestungen im gesamten Bereich der marinen Naturstoffforschung durchgeführt, die sich zum einen auf biomedizinisch relevante Felder im Kontext der antimikrobiellen und antitumoralen Aktivitäten als auch auf ökologische Funktionen im Bereich des marinen Antifouling fokussierte. So konnte für Ircinianin erstmalig eine moderate Wirkung gegenüber den Protozoen *P. falciparum* und *L. donovani* beschrieben werden.

Im Bereich der terrestrischen Naturstoffe wurde das bisher nur unvollständig beschriebene Lassozeptid Nocapeptin A aus *Nocardia terpenica* vollumfänglich durch umfangreiche NMR-Studien strukturell charakterisiert. Dabei wurden modernste Techniken, wie etwa das ^1H - ^{13}C LR-HSQMBC Experiment, eingesetzt. Die aufgeklärte Struktur ist innerhalb der Klasse der Lassopeptide der erste Vertreter mit einem zusätzlichen Ringschluss, der durch eine N-C-Verknüpfung zwischen den zwei Seitenketten von Tryptophan und Tyrosin hervorging. Somit ist das hier vorgestellte Nocapeptin A der erste Vertreter polyzyklischer Lassopeptide der Klasse II. Ergänzt wurden diese strukturellen Untersuchungen durch verschiedene Bioaktivitätstestungen, die eine moderate antibakterielle Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus* aufzeigten.

Strukturaufklärung von Naturstoffen aus marinen Quellen

1. Einleitung

1.1. Marine Naturstoffforschung – eine historische Betrachtung

Die marine Naturstoffforschung ist eine vergleichsweise junge Fachdisziplin. Naturstoffextrakte spielten zwar seit jeher eine wichtige Rolle bei der (traditionellen) Arzneimitteltherapie, der Fokus lag hierbei aber vor allem auf terrestrischen Lebewesen, wobei, ethnomedizinisch betrachtet, im Wesentlichen Stoffe aus pflanzlichen Bestandteilen zum Einsatz kamen.¹ Die marinen Ökosysteme der Ozeane bedecken zwar einen Großteil der gesamten Erdoberfläche, aber die Zugänglichkeit zu den darin innewohnenden Unterwasserlebensformen war kaum möglich, sodass die ersten systematischen Untersuchungen zum chemisch-metabolischen Potential marinen Lebens erst in den 1950-1960er Jahren durchgeführt wurden.¹⁻³

Die frühen Arbeiten Anfang der 1950er Jahre zeigten jedoch rasch, dass unerwartet große Potential der chemischen Strukturvielfalt dieses einzigartigen Lebensraums, sodass sich die Forschungsinteressen von der rein chemischen Perspektive hin zu chemisch ökologischen und bioaktivitätsorientierten Fragestellungen entwickelten. In Kombination mit den sich stetig fortentwickelnden technischen Möglichkeiten des Sport- / Gerätetauchens (SCUBA), wurde der wissenschaftliche Fokus so auch immer mehr in Richtung der marinen Naturstoffchemie gelenkt, sodass sich diese spätestens ab Anfang der 1970er Jahre als eigenständiges Fach innerhalb der (bioaktivitätsorientierten) Naturstoffforschung etabliert hatte.²⁻⁶ In den ersten Jahren wurden dabei vor allem die größeren, auffälligen und leicht zu sammelnden Lebewesen, wie etwa Schwämme und Korallen, eingehend untersucht. Aber mit der fortschreitenden Forschung auf dem Gebiet, mehrten sich nun auch hier die Wiederfindungsraten von bereits bekannten Verbindungen, weswegen zunehmend auch kleinere, unscheinbare Organismen in den Fokus rückten. Trotz der anfänglichen Skepsis, ob sich marine Mikroorganismen unter Laborbedingungen überhaupt kultivieren lassen und ob sich diese, auch im Hinblick auf ihre metabolische Aktivität, überhaupt nennenswert von ihren terrestrischen Verwandten unterscheiden würden, zeigten die Arbeiten von Burkholder, Jensen und Fenical eindrucksvoll, dass auch diese Organismen ein nahezu unvorstellbares Potential für neuartige Strukturen besitzen.⁶⁻⁸ Die fortschreitenden technischen Innovationen ermöglichen es nun auch zunehmend, in tiefer gelegene Abschnitte der Ozeanen vorzudringen, wobei sich auch hierbei immer deutlich zeigt, welch enormes Potential für neuartige chemische Entitäten in diesen

Lebensräumen vorhanden ist, und dass, unter diesen Gesichtspunkten, die Tiefsee-Naturstoffforschung, in den nächsten Jahren und Jahrzehnten, eine zunehmende Bedeutung innerhalb der Fachdisziplin gewinnen wird.⁹⁻¹¹

1.2. Schwämme als Naturstoffproduzenten

Das marine Ökosystem der Ozeane erstreckt sich auf etwa 70% der Erdoberfläche, wobei davon wiederum etwa 95% Wassertiefen von über tausend Metern aufweisen. D.h. die jeweiligen Lebensräume unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihren vorherrschenden Standortbedingungen und Umweltfaktoren, wie etwa dem Gehalt an Sauerstoff, der Variabilität des pH-Werts sowie der Temperatur des umgebenden Wassers, der Lichthelligkeit oder dem lokalen (Wasser-)Druck. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass sich innerhalb des marinen Ökosystems verschiedenste Lebensräume aufgetan haben, an die sich eine Vielzahl unterschiedlichster Lebensformen im Verlauf der evolutionären Entwicklung – die Ozeane sind die ältesten Lebensräume der Erde – anpassen konnten / mussten, was wiederum die hohe Vielfalt mariner Biodiversität in ihrer Gesamtheit verständlich werden lässt.^{9, 10, 12-14} Diese ungewöhnlich hohe Diversität lässt sich aber nicht nur theoretisch ableiten, sondern auch im Sinne der Biosystematik klassifizieren: sind an Land nur etwa die Hälfte aller bisher bekannten Tier-Phyla anzutreffen, finden sich nahezu alle Phyla bei Unterwasserlebewesen, wobei nahezu die Hälfte ausschließlich in aquatischen Lebensräumen vorkommen.^{13, 15}

1.2.1. Chemische Abwehr als Überlebensstrategie

Schwämme (Phylum Porifera) gehören mit zu den ältesten vielzelligen Tieren der Erde, die jedoch ausschließlich unter Wasser anzutreffen sind. Sie sind von ihrem Aufbau wenig komplex, bilden keine klassischen Gewebe oder Organe aus, haben aber verschiedene, spezialisierte Zellen entwickelt, die diese Aufgaben übernehmen.¹⁶⁻²⁰ Ihre Körpergestalt ist eher von weicher Beschaffenheit und im Vergleich zu anderen Lebewesen bilden sie kaum morphologische Abwehrstrukturen, wie etwa Stacheln oder Panzer, aus. Lediglich nadelartige Stützstrukturen, so genannte Spicula, werden als physikalische Barrieren diskutiert.^{5, 21} Aufgrund ihrer sessilen, also zur Fortbewegung unfähigen und somit standorttreuen, Lebensweise

können sie somit keiner potenziell schädlichen Interaktion mit anderen Organismen durch Flucht ausweichen, was evolutionär zu einer höchst spezialisierten Überlebensstrategie geführt hat: nämlich zur Produktion und Anreicherung von Naturstoffen zur chemischen Abwehr, die beispielsweise als Schutz gegenüber Verbiss von Fischen, zum Schutz vor der Überwucherung mit anderen Lebewesen (engl. antifouling) oder gegen den Befall mit Mikroorganismen gebildet werden, aber auch zur Kommunikation mit anderen Lebewesen dienen.²²⁻²⁵

Als Naturstoffe, im engeren Sinne, werden Stoffwechselprodukte des Sekundärmetabolismus angesehen, die aber, im Gegensatz zu den Metaboliten aus dem Primärstoffwechsel, für das Überleben des Organismus als nicht zwingend notwendig betrachtet werden, deren Produktion aber gewisse Überlebensvorteile für den Produzenten mit sich bringen kann. Man geht davon aus, dass diese Substanzen ursprünglich willkürlich aus Stoffwechselprozessen des Primärmetabolismus entstanden sind und die metabolischen Fertigkeiten diese Stoffe zu bilden, aufgrund der dadurch hervorgerufenen Überlebensvorteile, so von Generation zu Generation weitergegeben wurden und in diesen Zeiträumen eine gewisse evolutionäre Reifung, im Sinne einer Optimierung der biologischen Funktion, durchlaufen haben.^{22, 26-28}

Da diese Substanzen somit Schlüsselemente der chemischen Verteidigungsarchitektur von Schwämmen (und den meisten sessilen Invertebraten) darstellen, ist unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten interessant, wie diese Substanzen gebildet werden: entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die bioaktiven Verbindungen ausschließlich von Schwämmen gebildet werden, rücken zunehmend die mit dem Schwamm vergesellschaftet lebenden Mikroorganismen, als die eigentlichen Produzenten, in den Fokus.^{24, 29-33}

Schwämme sind als sessile Lebensform darauf angewiesen, ihre Nahrung über das umgebende Wasser aufzunehmen und in diesem Sinne als Filter-Lebewesen zu verstehen, wobei die kontinuierlichen Filterleistungen beträchtliche Wasservolumen betragen können. Zunächst wird das Wasser in den Schwamm aufgenommen (‘eingestrudelt’) und im Anschluss daran werden die benötigten Bestandteile von spezialisierten Zellen aus dem Wasser herausgefiltert. Dabei kommen die an der Nahrungsaufnahme beteiligten Strukturen aber auch mit den im Wasser eingespülten Mikroorganismen in Kontakt, wobei diese nicht notwendigerweise als Nahrung dienen müssen.³⁴⁻³⁷ Diese Organismen können so in den Schwamm aufgenommen werden

und sich in speziellen Bereichen (extra- und intrazellulär) innerhalb der Schwammstruktur einlagern, dort spezifische Habitate besetzen und so mit dem Schwamm, in einer Art Symbiose, vergesellschaftet leben.^{34, 37-40} Der Anteil der Symbionten an der Gesamtbiomasse / am -volumen variiert dabei von Schwamm zu Schwamm und kann von wenigen Organismen bis zu einem Anteil von 40-60% reichen. Die genauen Mechanismen und komplexen Systeme dieser Vergesellschaftung sind im Detail noch nicht verstanden, aber es werden vielfältige Wechselwirkungen und Interaktionen zum beidseitigen Vorteil angenommen.³⁸⁻⁴¹ Man geht davon aus, dass diese Partnerschaft aber auch die Produktion von bioaktiven Substanz, durch die vergesellschafteten Mikroorganismen, mit einschließt, die diese dann dem Schwamm zur Verfügung stellen bzw. dadurch ihren Lebensraum, etwa gegen die Überwucherung mit fremdartigen Epibionten oder gegen sonstige Predatoren, absichern.^{26, 41-44} Auf chemisch-struktureller Ebene lässt sich dieses Phänomen des symbiontischen Naturstoffaustausches auch oftmals biosynthetisch, bedingt durch die chemischen Ähnlichkeiten zwischen den aus Schwämmen isolierten Molekülen und bereits bekannten Verbindungen von (zum Teil terrestrischen) Mikroorganismen, ableiten und belegen.^{29, 30, 33}

Die vorgestellten ökologischen Betrachtungen verdeutlichen also, warum gerade Schwämme, als sessile Meeresbewohner, ein derart reichhaltiges Reservoir an Naturstoffen aufweisen. Die Besonderheit der marinen Naturstoffe liegt aber nicht nur in ihrer schier unerschöpflichen Anzahl, sondern vielmehr in der Tatsache begründet, dass der chemische Strukturraum dieser hochdiversen Verbindungen, sich von dem der terrestrischen Naturstoffe unterscheidet und sich zudem auch die marinen Phyla diesbezüglich untereinander unterscheiden.⁴⁵⁻⁴⁷ Systematische Untersuchungen zum Aufbau der Grundgerüste der marinen Naturstoffe zeigten, dass flexiblere Molekülskelette mit einer geringeren Tendenz zur Ausbildung aromatischer Motive gebildet werden, in die zudem, im Verhältnis zu terrestrischen Varianten, weniger Sauerstoff- dafür allerdings mehr Stickstoffatome verbaut werden, die marinen Sekundärstoffe aber trotzdem einen hydrophoberen Charakter aufweisen. Zudem finden sich bestimmte funktionellen Gruppen, wie etwa Isonitrile, Sulfamate oder Isothiocyanate, aber auch verschiedenste Formen der Halogenierung (insbesondere Bromierungen) besonders häufig bei marinen Verbindungen, die bisher (in dieser Vielzahl) kaum in chemischen Grundkörpern terrestrischen Ursprungs beschrieben werden konnten. Die durch diese Strukturvariationen geformten Molekülgerüste

marinen Ursprungs, decken somit innerhalb des chemischen Strukturgefüges der Naturstoffe, im Vergleich zu ihren terrestrischen Verwandten, auch andere Strukturräume ab und zeigen vor allem einzigartige Grundgerüste.⁴⁶⁻⁴⁹ Die Kombination aus der abweichenden atomaren Zusammensetzung der Verbindungen, den damit einhergehenden abweichenden physikochemischen Eigenschaften und den chemisch einzigartigen Grundkörpern, hat so ein hochspezifisches Metabolitenprofil und einen Strukturraum geschaffen, dem mannigfaltige biologischen Funktionen zugeschrieben werden und dem ein, im Vergleich zu terrestrischen Verbindungen, höheres Potential für neue Wirkstoffkandidaten zugeschrieben wird.^{47, 48, 50} Gleichzeitig kann aus den Standortbedingungen abgeleitet werden, dass diese Stoffe hoch potent sein müssen, da sie in marinen (wässrigen) Lebensräumen bei der Freisetzung sofort verdünnt werden und dementsprechend von Natur aus hochwirksam sein müssen, um überhaupt Effekte erzielen zu können.^{2, 51} Zugleich wird zumeist nicht nur eine privilegierte Struktur gebildet, sondern es finden sich häufig verschiedene Naturstoffvarianten einer Verbindung (‘Derivate’) innerhalb eines Organismus, sodass Substanzfamilien oftmals als synergistisch wirksame Gemische auftreten.^{52, 53} Allerdings kann deren Produktion zum Teil, je nach Standort und Umweltbedingungen, variieren, weswegen sich somit auch Vertreter der gleichen Spezies in ihrem jeweiligen chemischen Profil durchaus voneinander unterscheiden können.^{54, 55}

Ergänzt man den dargestellten strukturellen Reichtum mariner Naturstoffe noch um die vorherrschende Meinung, dass der Großteil der marinen Spezies (sowie die Fülle mariner Biodiversität im Allgemeinen) bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht einmal bekannt sind, wird ersichtlich, welch ungeheures Potential die Ozeane für zukünftige naturstoffanalytische Untersuchungen aufweisen.^{56, 57}

1.2.2. Schwammmetaboliten als Arzneistoffe

Die Bedeutung mariner Naturstoffe für die Leitstruktursuche und medizinalchemische Adaptionen im Kontext der Pharmakophor-Identifizierung lässt sich jedoch nicht nur anhand der mannigfaltigen Bioaktivitäten ableiten, sondern auch durch arzneilich verwendete Wirkstoffe rational belegen. Momentan (Stand Juni 2023) finden sich mehr

Einleitung

als 20 zugelassene Arzneistoffe¹, die sich auf marine Naturstoffe zurückführen lassen.⁵⁸⁻⁶⁰ Mit Panobinostat, Eribulin (mesilat) und den Nukleosid-Analoga rund um Cytarabin leiten sich dabei auch einige Wirkstoffe von marinen Naturstoffen ab, die aus Schwämmen isoliert wurden.^{58, 61, 62} Eine Übersicht gibt Abbildung 1.

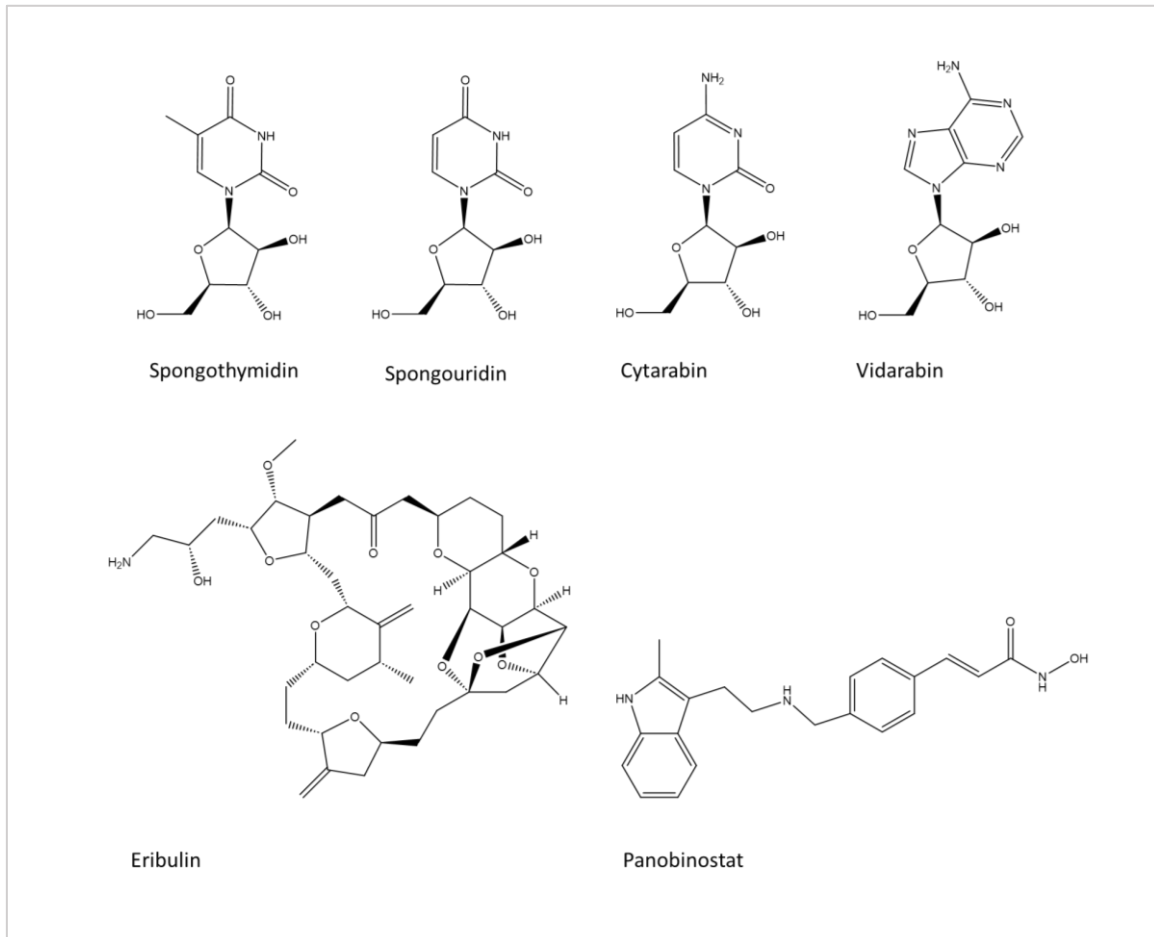


Abbildung 1 Arzneistoffe, die sich von marinen Naturstoffen aus Schwämmen ableiten.^{61, 63, 64}

Die ersten arzneilich relevanten Leitstrukturen wurden zu Beginn der marinen Naturstoffforschung Anfang der 1950er Jahre von Bergmann beschrieben und legten somit den Grundstein für die Etablierung dieser Fachdisziplin.^{2, 64-67} Die dabei vorgestellten Nukleosidanaloga Spongothymidin und Spongouridin aus *Tectitethya crypta* (ursprünglich als *Cryptotethya crypta* bezeichnet)⁶⁸ zeigten zum ersten Mal auf,

¹ Anmerkung: die genauen Zahlen zu den zugelassenen Arzneistoffen weichen je nach Quelle (zum Teil erheblich) voneinander ab. Ursächlich hierfür ist die jeweilige Auslegung, inwieweit Naturstoffe auch als Ideengeber für synthetische Derivate, wie etwa Aciclovir, oder Arzneistoffklassen, wie die der Antimetaboliten, in diesen Auflistungen berücksichtigt werden. Insbesondere bei neueren Arbeiten wird nur die direkte Beziehung zwischen Naturstoff und entsprechendem Wirkstoff gelistet, sodass bei einer großzügigeren (und im Kontext des Begriffs der Leitstruktur eigentlich legitimen) Auslegung der Verwandtschaft zwischen Naturstoffen als „geistige Stammväter“ und zugelassenen Arzneimitteln deutlich mehr als 20 zugelassene Arzneistoffe gelistet werden könnten.

Einleitung

dass biologisch aktive Nucleoside, neben Ribose und Desoxyribose, auch weitere Zuckerbausteine aufweisen und somit nicht nur die Basen variiert werden können. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurden so rasch Derivate dieser Verbindungen synthetisiert, die sowohl antivirale Effekte als auch das Potential für die Behandlung für verschiedene Formen der Leukämie zeigten. Weitere synthetische Abwandlungen, die sich über azyklische Formen im Bereich des Zuckerbausteins bis hin zu carbozyklischen Variationen dieses Motives erstreckten, führten so zur Entwicklung von Aciclovir, Zidovudin und weiteren Nucleosidanaloga.^{2, 60, 69-71} Tabelle 1 fasst die Wirkstoffe zusammen.

Tabelle 1 Übersicht (Auswahl) von Arzneistoffen, die sich von marinen Naturstoffen aus Schwämmen ableiten.^{58-62, 71-73}

Arzneistoff	Markenname (Auswahl)	natürliche Quelle (Leitstruktur)	Indikation	Anmerkung
Cytarabin (Ara-C)	Cytosar-U®	<i>Tectitethya crypta</i>	Leukämie	Erster zugelassener Arzneistoff, der auf einen marinen Naturstoff zurückgeht. Die Zulassung durch die FDA erfolgte 1969. Mit Aspacytarabin, einer um eine Asparagin-Einheit verlängerte Variante von Cytarabin, wurde ein Prodrug entwickelt, der, aufgrund geringerer Spitzenspiegel, eine geringere Toxizität bei vergleichbarer Wirksamkeit zeigt und sich dadurch insbesondere für die Therapie älterer Patienten eignet. Die ersten klinischen Ergebnisse sind vielversprechend.
Vidarabin (Ara-A)	Vira-A®	<i>Tectitethya crypta</i>	Virostatikum (Herpes)	Aufgrund der geringen therapeutischen Breite und besserer Alternativen wurde der Arzneistoff 2001 vom Markt genommen.
Fludarabin (F-Ara-A)	Fludara®	<i>Tectitethya crypta</i>	Leukämie	-
Aciclovir	Zovirax®	<i>Tectitethya crypta</i>	Virostatikum (Herpes)	-
Zidovudin (ZDV, AZT)	Retrovir®	<i>Tectitethya crypta</i>	Virostatikum (HIV)	Erstes Arzneimittel zur Behandlung von HIV-Infektionen.
Eribulin mesilat	Halaven®	<i>Halichondria okadai</i>	Brustkrebs; Liposarkom	Synthetische Abwandlung von Halichondrin B.
Panobinostat	Farydak®	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	Multiple Myelom	Als Leitstrukturen zur Target-Identifizierung fungierten Psammalin A (<i>Pseudoceratina purpurea</i>), Trapoxin B und Trichostatin A.

1.2.3. Naturstoffe von Schwämmen der Gattung *Ircinia*

1.2.3.1. Übersicht

Das Phylum Porifera lässt sich in verschiedene Rangstufen unterteilen, wobei die Ordnung Dictyoceratida mit ihren fünf Familien als besonders reichhaltige Quelle von chemisch hochdiversen und bioaktiven Substanzen gilt.^{19, 68, 74} Die Gattung *Ircinia* nimmt innerhalb dieser Ordnung (Familie Irciniidae) einen besonderen Stellenwert ein und ist seit Jahrzehnten als Naturstofflieferant bekannt – die Terpene der Ircinin-Gruppe wurde 1972 erstmalig beschrieben.^{19, 74-76} Wie in Abbildung 2 veranschaulicht,

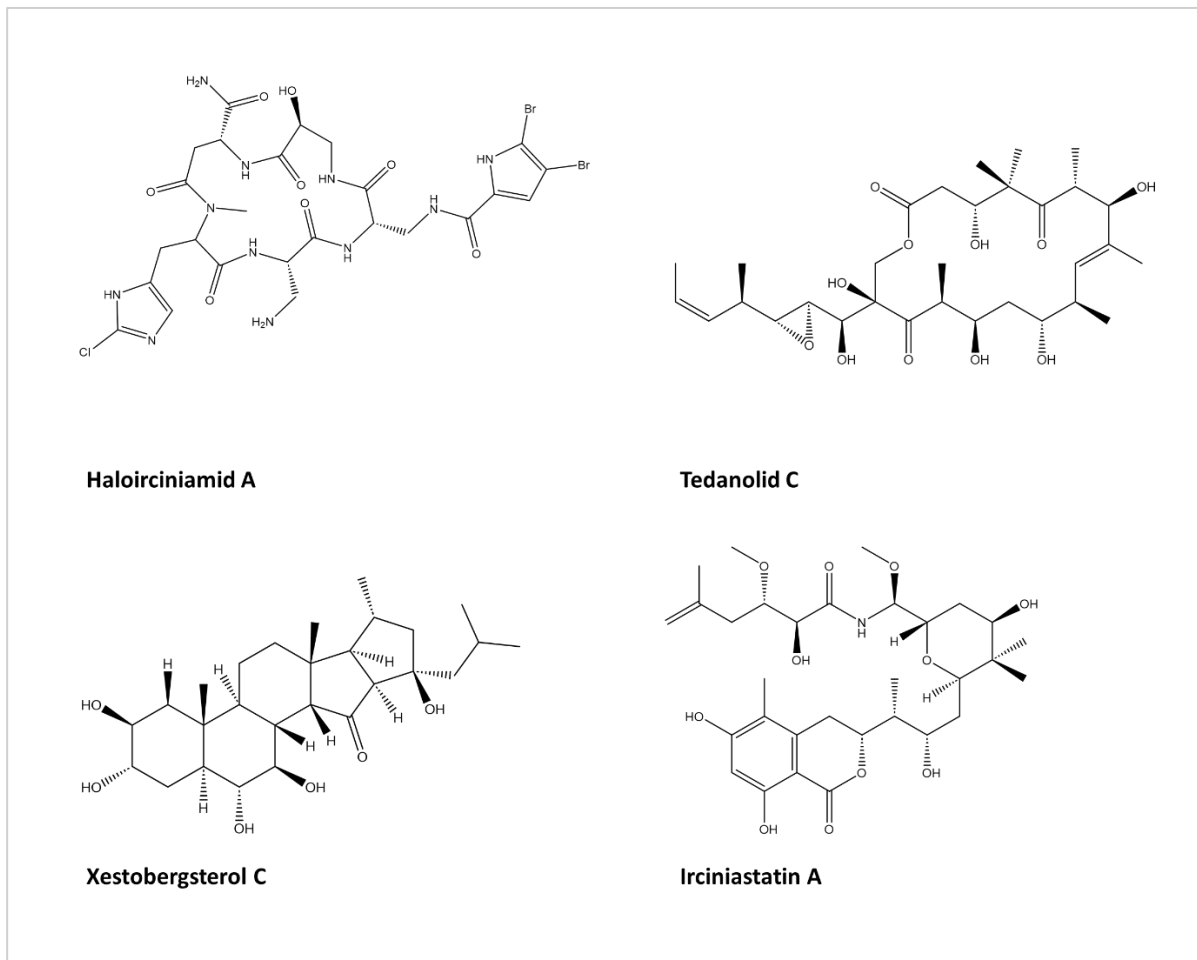


Abbildung 2 Übersicht verschiedener Vertreter unterschiedlicher Naturstoffklassen aus *Ircinia*.⁷⁷⁻⁸¹

zeichnet sich diese Gattung durch ein besonders reichhaltiges Angebot an verschiedensten Naturstoffen aus, wobei das Spektrum diverse Naturstoffklassen – von Peptiden, über Makrolide und Steroiden bis hin zu Alkaloiden und Indolen – umfasst.^{77-79, 82, 83} Als Quelle von Naturstoffen ist diese Gattung aber besonders für die Bildung komplexerer Terpene bekannt, wobei insbesondere die Sesterterpene, also Terpene mit einem Grundgerüst, das sich aus 25 Kohlenstoffatomen zusammensetzt,

Einleitung

immer wieder angetroffen werden.⁸⁴⁻⁸⁹ Abbildung 3 zeigt eine Auswahl verschiedener Sesterterpene, die aus *Ircinia* spp. isoliert werden konnten. Anhand der dargestellten Strukturen lässt sich die für Sesterterpene typische Unterteilung in lineare und zyklische Vertreter auch auf das hier dargestellte Metabolitenprofil übertragen.⁸⁹ Die linearen Vertreter zeigen hierbei ein charakteristisches Alkyl-Dien-Strukturmotiv, das mit fünfgliedrigen Ringsystemen einer Lactam-, Lacton- und / oder Tetroneinheit

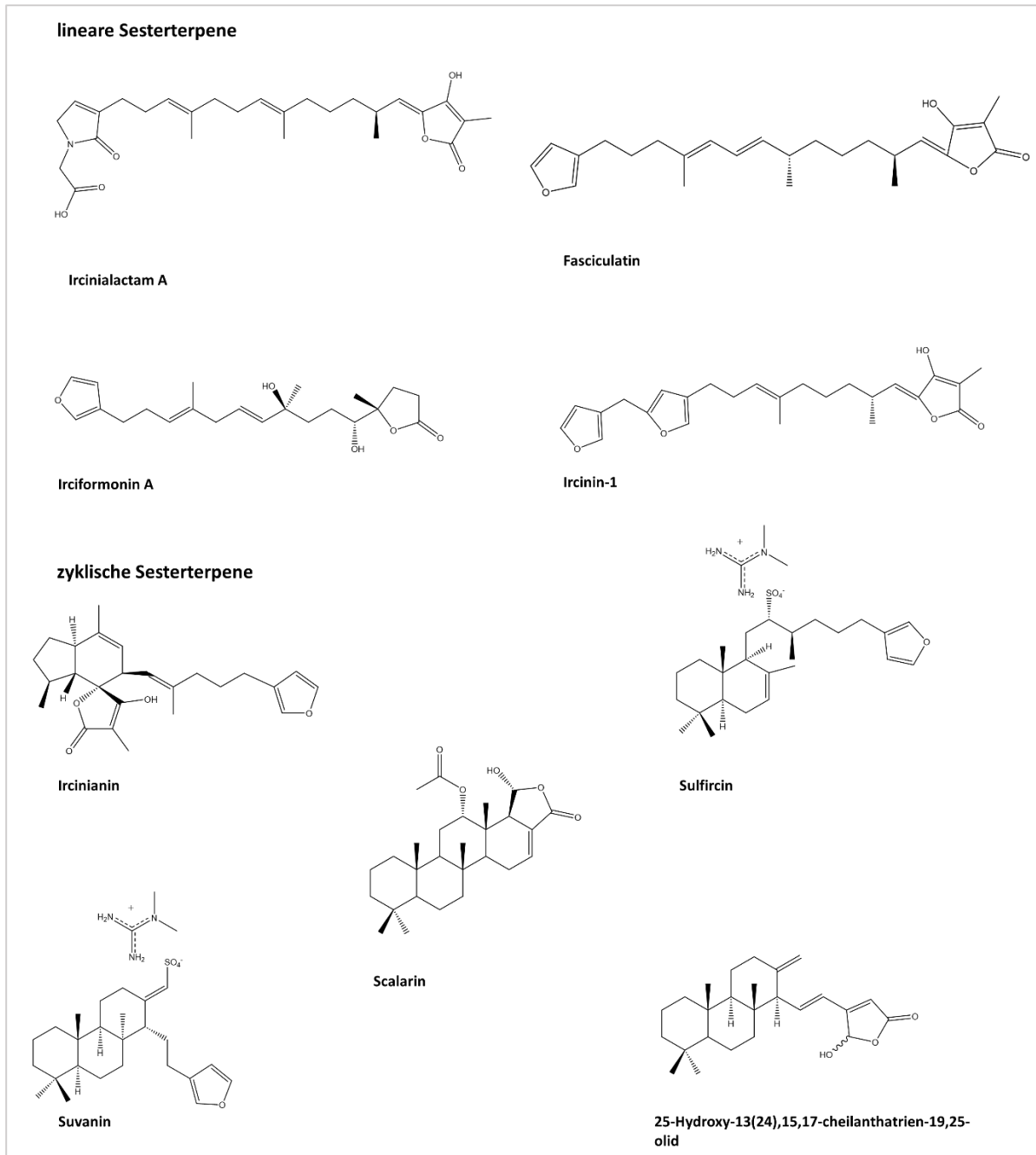


Abbildung 3 Übersicht verschiedener linearer und zyklischer Sesterterpene; isoliert aus *Ircinia* spp.^{76, 90-101}

ergänzt wird. In den meisten Fällen finden sich in diesen Verbindungen jedoch (mindestens) zwei dieser Heterozyklen wieder, die sich zumeist an den beiden

entgegengesetzten Enden des Moleküls befinden, wobei das Alkyl-Motiv manchmal noch zusätzlich Hydroxylgruppen aufweist.^{76, 90, 91, 93, 94, 102-108} Im Gegensatz dazu zeichnen sich die zyklischen Terpene durch ein carbozyklisches Grundgerüst aus. Über eine lineare Alkylseitenkette wird dieser Hauptzyklus oftmals mit einem weiteren Heterozyklus verknüpft, wobei sich auch hier wieder fünfgliedrige Ringsysteme, wie etwa Furane, Lactone und Lactame, als typische Bausteine wiederfinden. Analog zur klassischen Terpen-Nomenklatur kann man auch hier anhand der Anzahl der im Hauptringsystem enthaltenen zyklischen Motive, die Substanzen in weitere Subklassen unterteilen.^{95-97, 99-101, 109-114}

1.2.3.2. *Ircinia wistarii*

Ircinia wistarii umfasst mehrere Schwämme, deren ersten Vertreter 1978 zum ersten Mal von Wilkinson (*Ircinia wistarii* Wilkinson, Ordnung Dictyoceratida, Familie Irciniidae) als eigene Spezies beschrieben wurde. Benannt wurde er nach seinem Entdeckungsort, dem Wistari Reef, nahe Heron Island, Great Barrier Reef, in Australien.^{68, 115} Er wurde als einer der häufigsten dort vorkommenden Schwämme genannt. Der Schwamm ist von grauer Farbe, zeigt kontraktiles Verhalten und hat eine hornige Beschaffenheit. Innerhalb eines begrenzten Habitats an einem Steilhang des Wistari Reef wurde er bei Meerestiefen von 18-30 m angetroffen.¹¹⁵ Ein weiterer Vertreter wurde bei Heron Island als *Ircinia wistarii* (Bergquist) 1982 beschrieben, wird aber in der World Porifera Database nicht als eigene Spezies geführt, sodass die Zuordnung fraglich bleibt.^{68, 110}

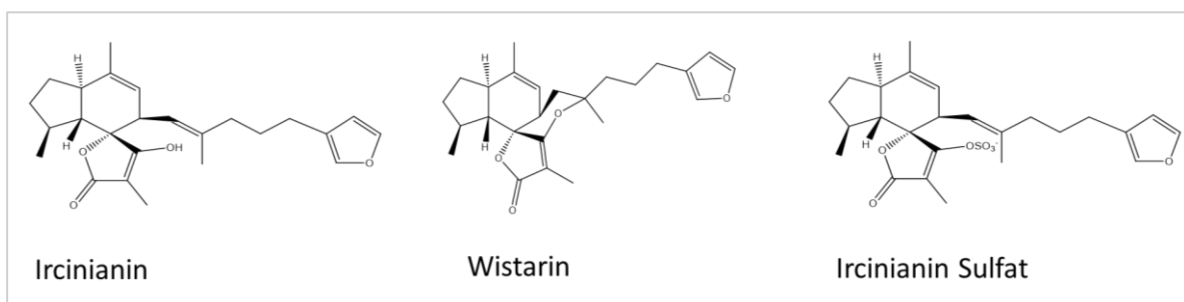


Abbildung 4 Übersicht der Ircinianin-Familie.^{95, 110, 113}

Naturstoffchemische Untersuchungen mit diesen Schwämmen fanden bereits Mitte der 1970er Jahre, also noch bevor diese als eigene Spezies taxonomisch klassifiziert wurden, statt und führten zur Beschreibung von Ircinianin, einem zyklischen Spiro-Tetransäure-Sesterterpen.⁹⁵ Das tetrazyklische Isomer von Ircinianin, welches als

Wistarin bezeichnet wurde, ist 1982 von Gregson und Ouvrier mit dem Hinweis veröffentlicht worden, dass Ircinianin aus *Ircinia wistarii* (Bergquist) isoliert wurde. Wistarin wiederum wurde aus einer Probe isoliert, die aus der Swain Reef Region des Great Barrier Reef stammte.¹¹⁰ Ein weiterer Vertreter dieser Furan-Terpene wurde, als eine an der Tetronsäure-Einheit sulfatierte Variante von Ircinianin, 1997 von Coll et al. beschrieben. Die Verbindung wurde aus *Ircinia (Psammocinia) wistarii* (Wilkinson) isoliert.¹¹³ Abbildung 4 fasst die bisher bekannten Verbindungen zusammen.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die naturstoffchemische Untersuchung und metabolische Charakterisierung des Schwammes *Ircinia wistarii* aus der Tübinger Sammlung mariner Schwämme des Great Barrier Reefs aus Australien.

Marine Schwämme sind als Naturstoffproduzenten eine anerkannte Quelle verschiedenster bioaktiver Stoffe und somit auch unter pharmazeutischen Gesichtspunkten von höchster Relevanz. Im Kontext der Leitstruktursuche gelten marine Naturstoffe nach wie vor als privilegierte Strukturen.

Aus der Sammlung mariner Schwämme wird anhand der taxonomischen Bestimmung ein Schwamm ausgesucht, dessen Familien- bzw. Gattungszugehörigkeit auf ein reichhaltiges Metabolitenprofil schließen lässt. Daran anschließend wird das Rohmaterial zerkleinert und mit verschiedenen Lösemittelgemischen extrahiert, um so die entsprechenden Substanzen aus dem Material zu lösen und mittels präparativer Verfahren aufzutrennen. Mittels chromatographischer und spektroskopischer Methoden (HPLC-DAD sowie LC-MS-MS) werden die so erhaltenen Fraktionen anhand ihres chemischen Profils priorisiert und entsprechende Zielstrukturen auf Grundlage der spektroskopischen Daten identifiziert. Daran anschließend werden diese Zielsubstanzen isoliert, aufgereinigt und durch spektroskopische Methoden, mit besonderem Augenmerk auf 1D / 2D NMR-Spektroskopie, chemisch vollständig charakterisiert.

Basierend auf der Klassenzugehörigkeit der isolierten Verbindungen und anhand ähnliche Struktur motive von Naturstoffen, die in der Literatur beschrieben wurden, werden Hypothesen zu möglichen Bioaktivitäten aufgestellt und die isolierten Substanzen anhand verschiedener Bioassays auf diese Aktivitäten hin untersucht.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Isolierung und Strukturaufklärung

3.1.1. Auswahl der Schwammprobe

Die Schwierigkeiten bei der Analyse von Naturstoffextrakten liegen zumeist darin begründet, innerhalb eines Vielstoffgemisches, dass eine Vielzahl verschiedenster Sekundärmetaboliten und -klassen enthält, neue Naturstoffe überhaupt entdecken und von bereits bekannten Substanzen unterscheiden zu können. Im Bereich der modernen – vor allem bakteriellen und fungal orientierten – Naturstoffanalytik werden hierzu vor allem neue Methoden der bioinformatischen Analyse, die unter dem Oberbegriff des genome minings zusammengefasst werden, hinzugezogen.^{116, 117} Dadurch wird es möglich, dass Biosynthesepotential eines Naturstoffproduzenten aus seiner Erbinformation abzuleiten und somit zielgerichtete Strategien zur Analyse seiner metabolischen Fertigkeiten zu entwickeln. Schwämme sind für diesen Ansatz allerdings ungeeignet, da, bis zum heutigen Zeitpunkt, keine bioinformatischen Möglichkeiten zur Vorhersage des chemischen Strukturprofils dieser Tiere bestehen. Dies lässt sich auch von der in Kapitel 1.2.1. *Chemische Abwehr als Überlebensstrategie* vorgestellten Lebensweise, die (zwangsläufig) mit der Vergesellschaftung anderer Organismen, wie Bakterien und Pilzen, einhergeht, ableiten. Schlussendlich bestimmen nämlich auch diese symbiotisch anmutenden Gesellschaften das jeweilige metabolische Profil, das sich bei der chemischen Analyse ihrer Sekundärmetaboliten zeigt. D.h. zur zielgerichteten Auswahl eines Schwammes aus einer Sammlung verschiedenster Spezies kann nur eine, auf Grundlage der taxonomischen Klassifikation getroffene, Literatur- und ggf. angeschlossenen Datenbanksuche, zur Art bzw. der jeweiligen Familie, Aufschluss bringen und, in einem nachfolgenden Schritt, über verschiedene Variationen massenspektroskopischer Analysen überprüft werden.

Ausgehend von der Tübinger marinen Schwamm-Sammlung des Südpazifiks und des australischen Korallenmeers der Pharmazeutische Biologie, wurden die Proben näher betrachtet, die zur Familie der Irciniidae taxonomisch zugeordnet werden konnten, da diese in der Literatur als besonders reichhaltige Quelle für Naturstoffe beschrieben wurden.^{19, 74, 75} Im zweiten Schritt wurden diese Proben dann anhand der Menge des Probenmaterials kategorisiert, um mögliche supply-Probleme möglichst im Vorhinein vermeiden zu können. In diesem Zusammenhang wurden Mindestmengen von 500 g

Probenmaterial definiert. Anhand dieser systematischen Klassifikation der Proben wurde das Exemplar mit der Inventarnummer Her 6, *Ircinia wistarii*, ein Schwamm von Heron Island, Wistari Reef, Great Barrier Reef, Australien, (siehe Abbildung 5) für die weiteren chemischen Untersuchungen ausgewählt.

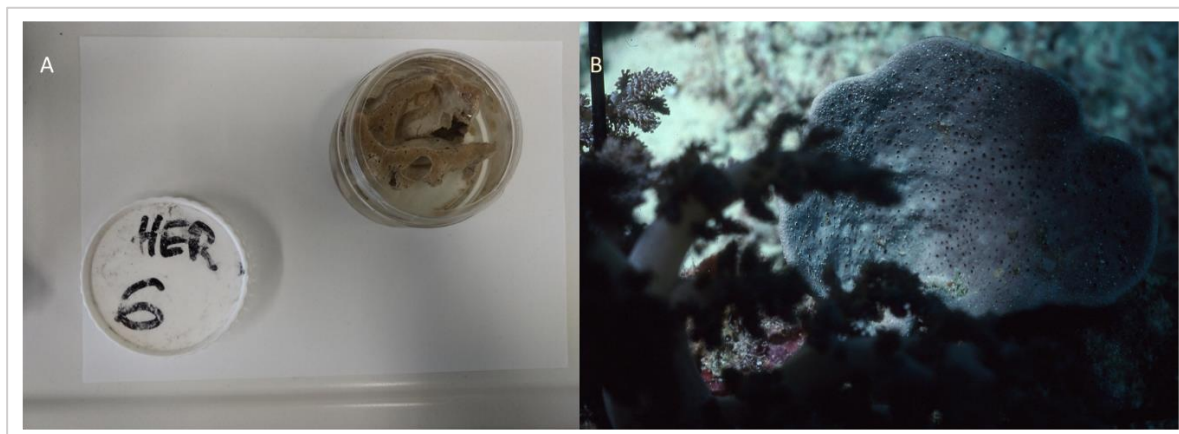


Abbildung 5 A: *Ircinia wistarii* – A: Museumsstück der Tübinger Schwammsammlung; B: Schwamm in seiner natürlichen Umgebung kurz bevor er vom Riff gelöst wurde.

Wie in Kapitel 1.2.3. *Naturstoffe von Schwämmen der Gattung Ircinia* dargelegt, ist die Gattung *Ircinia* in der Literatur als eine ausgesprochen reichhaltige Quelle für verschiedenste Naturstoffe beschrieben worden, wobei gerade die jeweiligen Spezies ein besonderes Biosynthesepotential für Terpene aufwiesen. Für *Ircinia wistarii* findet sich in der Literatur das 1977 publizierte Ircinianin, ein trizyklisches Furano-Sesterterpen mit einem ungewöhnlichen Spiro-Tetrone Säure Gerüst, das tetrazyklische Isomer Wistarin (siehe Abbildung 6) und das von *Ircinia (Psammocinia) wistarii* isolierte, mit einer zusätzlichen Sulfatgruppe versehene, Ircinianin Sulfat.^{95, 110, 113}

In nah verwandten Schwämmen der Gattung *Psammocinia*, die ebenfalls zur Familie der Irciniidae gehören und aus Australien stammten, wurden im Rahmen einer bioaktivitätsgeleiteten Suche für Glycin-Rezeptor-Modulatoren zudem weitere Derivate dieser trizyklischen Terpene isoliert.^{68, 118} Diese zeigten mit Lactam- und Lacton-Ringen weitere Variationen der terminalen fünfgliedrigen Heterozyklen, als auch, durch eine Art Hydroxy-Keto-Enol-Tautomerie erklärbar, Modifikationen des Tetrone Säure-Bausteins innerhalb des trizyklischen Hauptmotives der Ircinianin Grundstruktur, wobei Ircinianin als der Stammvater der Substanzklasse angesehen wird.

Ergebnisse und Diskussion

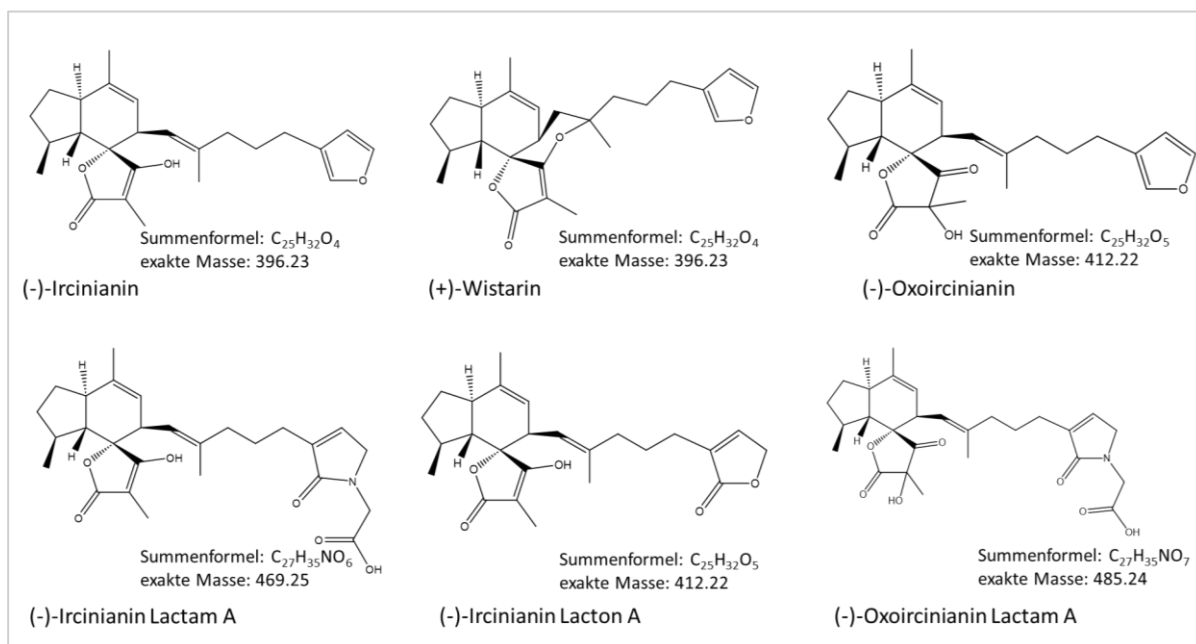


Abbildung 6 Übersicht aller relevanten Terpene der Ircinianin-Gruppe.¹¹⁸ Exakte Massen und Summenformeln wurden mittels ChemDraw bestimmt.

Aufbauend auf den für *Ircinia wistarii* bisher beschriebenen Naturstoffen in Verbindung mit der Tatsache, dass dieser Schwamm ein reichhaltiges „Schwamm-Mikrobiom“ an symbiontisch vergesellschafteten Mikroorganismen aufweist, konnte dieser Spezies eine hohe metabolische Fähigkeit zur Produktion von Sekundärstoffen zugeschrieben werden, was eine gewisse Wahrscheinlichkeit für weitere, bisher unbeschriebene, Verbindungen andeutete.^{115, 119, 120} Zudem findet sich bei der taxonomischen Beschreibung von *Ircinia wistarii* (Wilkinson) die Bemerkung, dass bei dieser Gattung keine Predatoren beobachtet werden konnten, was den Analogieschluss nahelegte, dass diese Beobachtung auf die Bildung bioaktiver Substanzen zurückzuführen war und die getroffene Einschätzung zusätzlich bekräftigte.¹¹⁵ Allerdings wurden seit mehr als 30 Jahren keine weiteren naturstoffchemischen Studien zu *Ircinia wistarii* publiziert, obschon die analytischen und spektroskopischen Techniken viel empfindlicher wurden und somit auch die Möglichkeit eröffneten, geringere Mengen von Sekundärstoffen charakterisieren zu können. Aus diesem Grund wurde HER 6 für eine tiefere Analyse seines Metabolitenprofils ausgewählt.

3.1.2. Fraktionierung und Priorisierung der Fraktionen

Nach der Extraktion des Schwammmaterials mit einer Chloroform-Methanol-Mischung wurden 25.46 g Rohextrakt erhalten, der mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie in insgesamt 11 Fraktionen aufgetrennt wurde. Diese Fraktionen wurden dann mit Hilfe der HPLC charakterisiert. Abbildung 7 veranschaulicht hierbei die relevanten Fraktionen anhand der gewonnen Chromatogramme.

Im Anschluss an das HPLC-Screening wurden alle Fraktionen mittels LC-HR-MS im Hinblick auf die in der Literatur beschriebenen Naturstoffen hin untersucht. Dabei war auffällig, dass die Fraktionen, die einen höheren Methanolgehalt in der mobilen Phase aufwiesen, immer einen prominenten Peak bei einer Retentionszeit von etwa 45 Minuten zeigten. Die massenspektroskopischen Daten belegten dabei eindeutig – die Ergebnisse sind im Detail bei den nachfolgenden Ergebnissen dargestellt –, dass der Peak immer mit derselben Substanz vergesellschaftet war, da sowohl die Molekülmasse als auch das jeweilige Fragmentierungsmuster der MS²-Experimente identisch waren und die Substanz somit zweifelsfrei anhand ihres Fragmentierungsmusters identifiziert werden konnte. Die Daten legten zudem nahe, dass es sich hierbei um Ircinianin handelte. Hierzu sind exemplarisch die Daten der 90%-Fraktion in Abbildung 8 dargestellt.

Die Analyse der Daten zeigten, dass für den Basispeak eine Summenformel von C₂₅H₃₃O₄ ([M+H]⁺; 397.2374 Da, berechnet als 397.2373 Da) angenommen werden durfte und dementsprechend der Peak mit einer Masse von 793.4674 Da den [2M+H]⁺ Peak repräsentierte. Außerdem fiel eine weitere Masse von 135.0805 Da auf, die aber aufgrund der MS²-Ergebnisse (vgl. hierzu Abbildung 8 E) als ein in-source Fragment der Substanz identifiziert werden konnte.

Vergleicht man die Summenformel bzw. das gemessene Molekulargewicht mit den in der Literatur für *Ircinia wistarii* beschriebenen Naturstoffen, ist diese mit Ircinianin bzw.

Ergebnisse und Diskussion

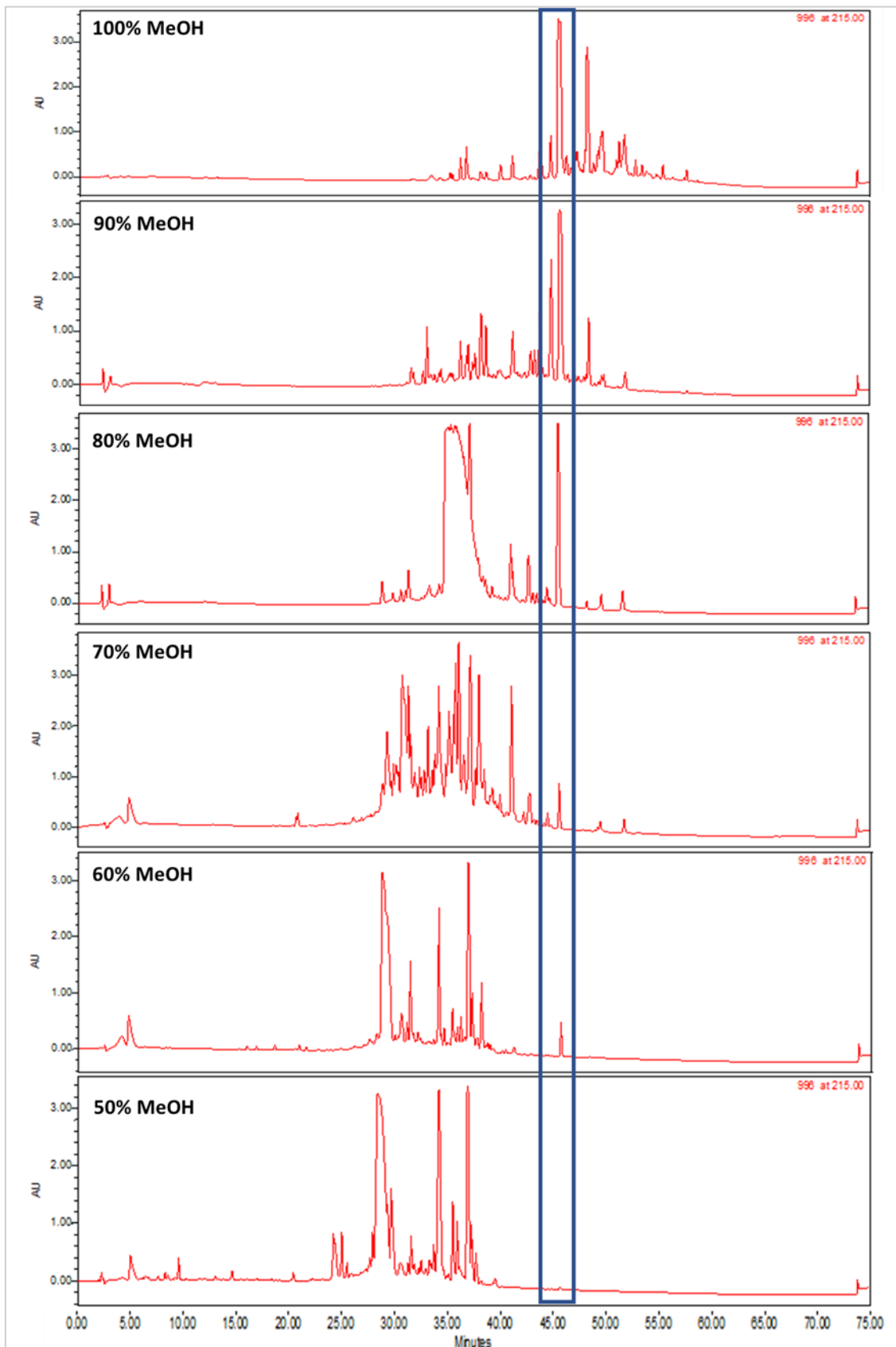
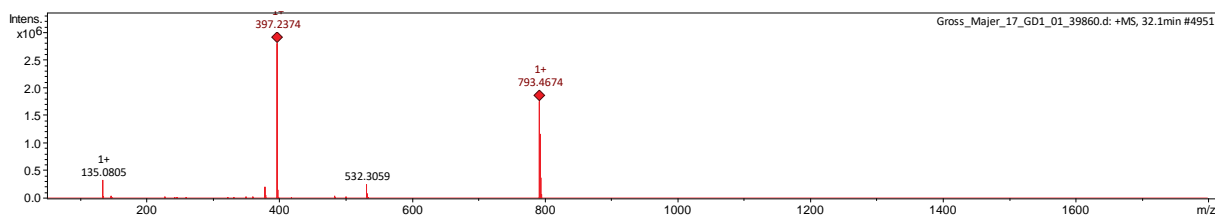


Abbildung 7 HPLC-basiertes Profiling der RP-LC-Fractionen von HER 6. Der blaue Rahmen hebt den Peak bei einer Retentionszeit von etwa 45 min. hervor. Die gezeigten Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 215 nm aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

A



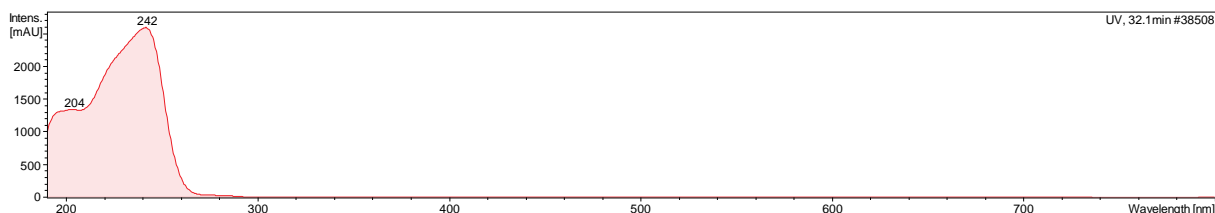
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z
397.2374	1	C ₂₆ H ₂₉ N ₄	397.2387	3.2	2.7	15.0	ok	even	23.4	34.8	n.a.
397.2374	2	C ₂₅ H ₃₃ O ₄	397.2373	-0.2	-0.4	10.0	ok	even	36.3	52.5	n.a.
397.2374	3	C ₂₁ H ₂₉ N ₆ O ₂	397.2347	-7.0	-7.9	11.0	ok	even	50.3	75.8	n.a.
397.2374	4	C ₁₄ H ₃₃ N ₆ O ₇	397.2405	7.8	6.4	2.0	ok	even	92.3	144.8	n.a.
397.2374	5	C ₁₁ H ₂₅ N ₁₆ O	397.2392	4.4	1.2	8.0	ok	even	93.3	150.8	n.a.
397.2374	6	C ₁₀ H ₂₉ N ₁₂ O ₅	397.2378	1.1	-1.5	3.0	ok	even	105.9	171.5	n.a.

C

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z
793.4674	1	C ₅₂ H ₅₇ N ₈	793.4701	3.4	3.1	29.0	ok	even	39.3	39.7	n.a.
793.4674	2	C ₅₁ H ₆₁ N ₄ O ₄	793.4687	1.7	1.6	24.0	ok	even	50.9	50.8	n.a.
793.4674	3	C ₅₀ H ₆₅ O ₈	793.4674	0.0	-0.0	19.0	ok	even	62.5	62.5	n.a.
793.4674	4	C ₄₇ H ₅₇ N ₁₀ O ₂	793.4660	-1.7	-2.1	25.0	ok	even	64.9	67.6	n.a.
793.4674	5	C ₄₆ H ₆₁ N ₆ O ₆	793.4647	-3.4	-3.7	20.0	ok	even	76.3	79.3	n.a.
793.4674	6	C ₄₃ H ₅₃ N ₁₆	793.4634	-5.1	-5.9	26.0	ok	even	78.9	85.0	n.a.
793.4674	7	C ₄₅ H ₆₅ N ₂ O ₁₀	793.4634	-5.1	-5.2	15.0	ok	even	87.7	91.5	n.a.

D



E

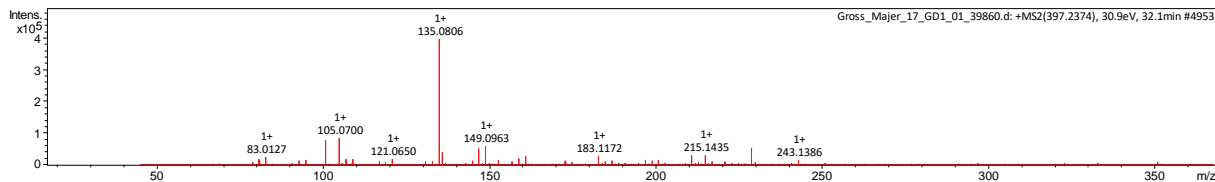


Abbildung 8 Übersicht der LC-HR-MS Analyse im Positiv-Modus: A: Massenspektrum; B: Vorhersage der Summenformel anhand der Molekülmasse von 397.2374 Da; C: Vorhersage der Summenformel anhand der Molekülmasse von 793.4674 Da²; D: extrahiertes UV-Profil der Substanz; E: Fragmentierungsmuster (MS²) des Molekülpeaks mit einer Masse von 397.2374 Da.

² Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Vorhersage der Summenformel C₄₀ als Mindestwert in der Software vorgegeben.

dem tetrazyklischen Isomer Wistarin (siehe Abbildung 6) identisch. Ircinianin wurde 1977 auf Grundlage einer Kristallstruktur publiziert, weswegen in der Originalpublikation keine ausführlichen Angaben zum Verhalten der Substanz bei massenspektroskopischen Untersuchungen gemacht wurden. Es wurden lediglich einige Fragment-Massen im Bereich von rund 81, 135 und 287 Da gelistet.⁹⁵ Auch in der bereits angesprochenen Publikation von Balansa et al., die neben Ircinianin weitere Derivate dieser Substanzfamilie aufführte, wurden keine weiteren Informationen zum massenspektroskopischen Fragmentierungsverhalten benannt.¹¹⁸

Wistarin wurde 1982 zum ersten Mal auf Grundlage von spektroskopischen Untersuchungen beschrieben.¹¹⁰ In dieser Publikation fanden sich auch einige interessante Hinweise zur Interpretation der gezeigten Massenspektren: Wistarin wurde bereits 1982 ebenfalls massenspektrometrisch untersucht und ein Basispeak von 135 Da, eine Masse die sich auch bei der Erstbeschreibung von Ircinianin fand, ermittelt. Wie allgemein bekannt, ist der Basispeak in der Massenspektroskopie als derjenige Peak definiert, der die höchste Intensität aufweist. Die in Abbildung 8 E gezeigten Ergebnisse zeigten jedoch, dass das 135 Da Fragment nicht die höchste Intensität aufwies, sondern ein in-source Fragment darstellte. Die Abweichung zu den in der Literatur beschriebenen Intensitätsverhältnissen war insofern nicht verwunderlich, da bei den in Abbildung 8 gezeigten Messungen die Ionisation mittels Elektronen-Spray-Ionisation durchgeführt wurde. Als weiche Ionisationsmethode weist sie eine geringere Tendenz auf, in-source Fragmente zu bilden, was als mögliche Erklärung dafür herangezogen werden konnte, weshalb der 135 Da Peak bei den neuerlichen Analysen eine deutlich geringere Intensität als in den Originalpublikationen aufwies.¹²¹ Damals wurde vermutlich eine andere Ionisationsmethode verwendet. Insofern konnte dieses Fragment als ein zusätzlicher Hinweis gedeutet werden, der auf die Ircinianin-Terpene hindeutete.

Basierend auf der Analyse der MS-Daten, war die Zuschreibung der untersuchten Substanz zum Ircinianin-Wistarin-Strukturkomplex wahrscheinlich, allerdings war es auf der Grundlage dieser Ergebnisse nicht möglich zu unterscheiden, ob es sich bei der betrachteten Substanz um Ircinianin oder Wistarin handelte. Bei einer genaueren Betrachtung der molekularen Architektur beider Substanzen (vgl. hierzu Abbildung 9), war jedoch auffällig, dass sich beide Terpene deutlich in ihren chemischen Funktionalitäten unterscheiden: Ircinianin, mit seiner trizyklischen Struktur, weist als

Ergebnisse und Diskussion

besonderes Merkmal eine vinyloge Carbonsäure Einheit auf. Wistarin, als tetrazyklisches Isomer, weist diese Funktionalität nicht auf, da der zusätzliche Ringschluss die Säure-Funktion in den Heterozyklus als Ether-Brücke aufnimmt. Diese unterschiedlichen Funktionalitäten gehen somit mit unterschiedlichen Aciditäten der beiden Verbindungen einher und waren daher auch zwingend bei Überlegungen zu berücksichtigen, ob eines der Moleküle auch eine negative Ladung innerhalb seiner Struktur stabilisieren könnte und somit auch massenspektroskopischen Untersuchungen in negativen Modus zugänglich wäre. Abbildung 10 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der 90%-Fraktion im negativen MS-Modus.

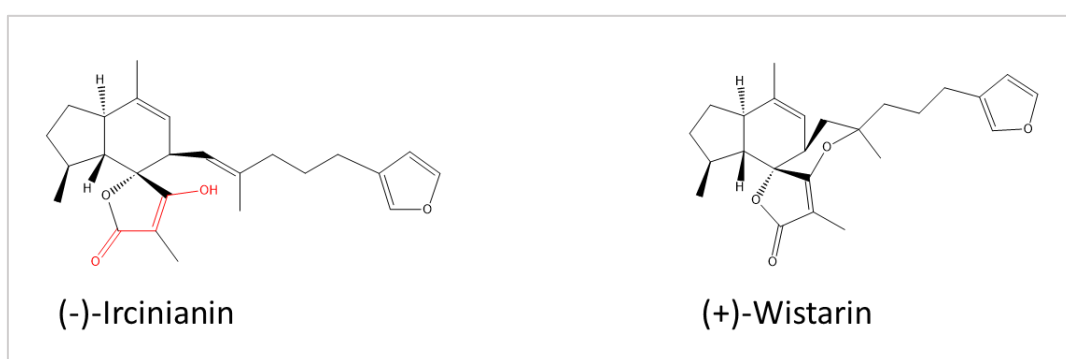
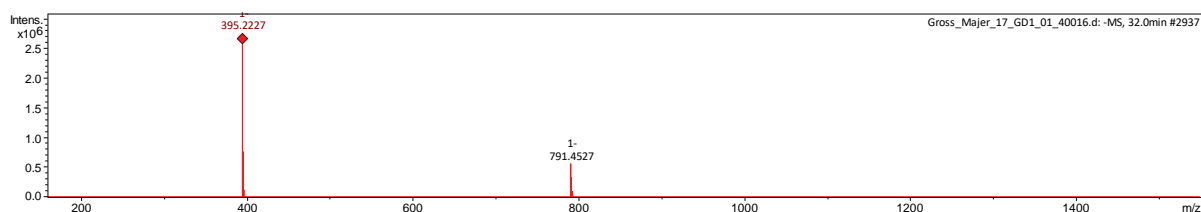


Abbildung 9 Gegenüberstellung von Ircinianin und Wistarin; in Rot: vinyloges Carbonsäure-Motiv innerhalb des Tetransäure-Bausteins.¹²²

Die Ergebnisse zur Detektion negativ geladener Ionen bestätigen die Interpretation der Daten der massenspektroskopischen Analysen im Positiv-Modus: auch bei dieser Untersuchung ließ sich auf Grundlage der gemessenen Molekulargewichte dieselbe

A



B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z
395.2227	1	C ₂₆ H ₂₇ N ₄	395.2241	3.6	3.2	15.0	ok	even	3.2	4.6	n.a.
395.2227	2	C ₂₅ H ₃₁ O ₄	395.2228	0.2	0.1	10.0	ok	even	12.3	18.3	n.a.
395.2227	3	C ₂₁ H ₂₇ N ₆ O ₂	395.2201	-6.6	-7.4	11.0	ok	even	26.3	41.7	n.a.
395.2227	4	C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₆	395.2188	-9.9	-10.5	6.0	ok	even	39.2	60.6	n.a.
395.2227	5	C ₁₄ H ₃₁ N ₆ O ₇	395.2260	8.3	6.9	2.0	ok	even	68.3	110.7	n.a.
395.2227	6	C ₁₁ H ₂₃ N ₁₆ O	395.2246	4.9	1.7	8.0	ok	even	69.3	116.7	n.a.
395.2227	7	C ₁₀ H ₂₇ N ₁₂ O ₅	395.2233	1.5	-1.0	3.0	ok	even	81.9	137.3	n.a.

Abbildung 10 Übersicht der massenspektroskopischen Untersuchungen (Negativ-Modus) der 90%-Fraktion von Peak V; A: Massenspektrum; B: Vorhersage der Summenformel anhand der Molekülmasse von 395.2227 Da.

Summenformel ableiten, was wiederum auf die Sesterterpene der Ircinianine schließen ließ. Die Tatsache, dass zudem die Messungen auch intensive Signale im negativen Modus erzeugten, ließ zudem den Rückschluss zu, dass das Molekül in der Lage ist, negative Ladungen zu stabilisieren, was zumindest als Hinweis darauf gedeutet werden konnte, dass es sich bei dem betrachteten Molekül eher um Ircinianin als um Wistarin handelte.

Der prominente Peak in den jeweiligen Chromatogrammen der Fraktionen, der auf Basis der Ergebnisse der Massenspektrometrie als Ircinianin-Peak angesehen wurde, war zudem in den jeweiligen Fraktionen immer von weiteren Einzelpeaks umrahmt, die ähnliche UV-Profile aufwiesen und Molekularmassen zeigten, die sich mit der Klasse der Sesterterpene in Übereinstimmung bringen ließen. Auch die Fragmentierungsmuster deuteten darauf hin, dass es sich um Derivate von Ircinianin handeln könnte. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen der Säulenchromatographie, die einen eher lipophileren Charakter aufwiesen, für eine weitere, tiefgehende chemische Analyse ausgewählt. Von diesen sechs Fraktionen wurden zunächst die Fraktionen mit einem Methanolgehalt von 100%, 90% und 50% herausgefiltert, da sie mindestens 100 mg an Fraktionsgewicht aufwiesen und somit eine realistische Chance boten, aus den jeweiligen Vielstoffgemischen ausreichende Mengen an Reinstoff, die für detaillierte Strukturuntersuchungen notwendigen waren, aufzureinigen zu können.

3.1.3. Aufarbeitung der 90%-Fraktion

3.1.3.1. Isolation der Substanzen aus der 90%-Fraktion

Die 90%-Fraktion wies mit 187.2 mg das höchste Gesamtgewicht aller Fraktionen auf, weswegen diese als Ausgangspunkt für die ersten chemische Studien zum Metabolitenprofil ausgewählt wurde.

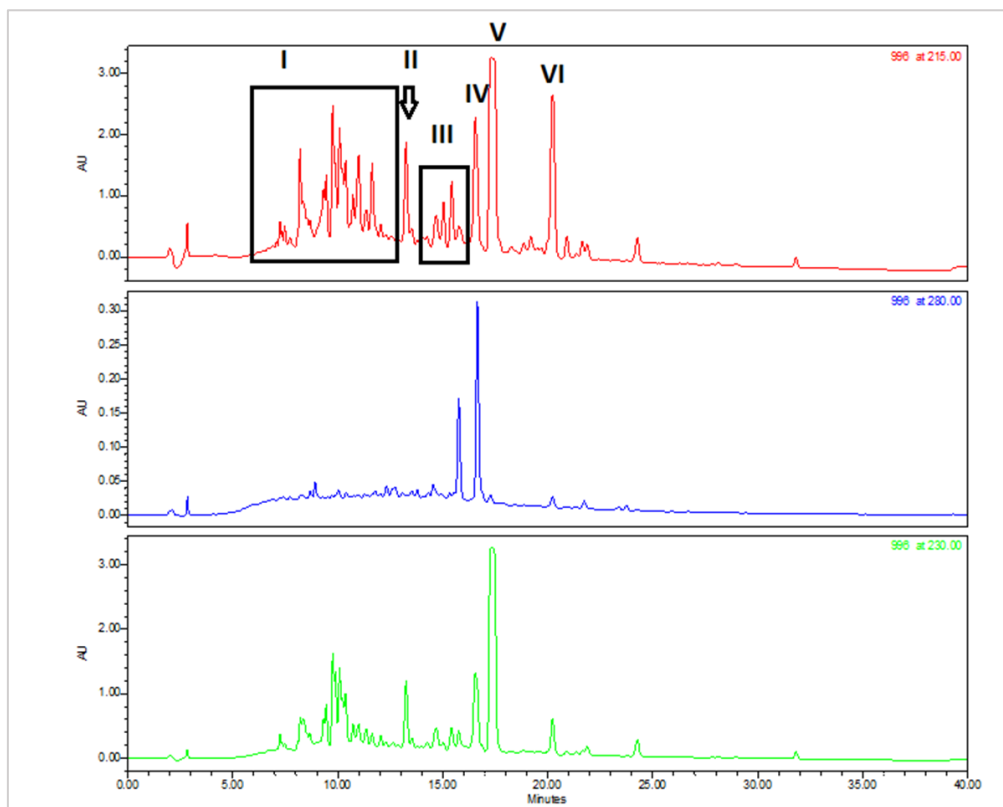


Abbildung 11 Chromatogramm der 90%-Fraktion mit der für die Isolierung optimierten Methode. Die römischen Ziffern bezeichnen die jeweils isolierten Bereiche. Oben: Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 215 nm; Mitte: Detektionswellenlänge von 280 nm; unten: Detektionswellenlänge von 230 nm.

Zunächst wurde eine Optimierung der HPLC-Methode durchgeführt, um eine möglichst kurze Laufzeit bei optimaler Auflösung der Peaks zu erzielen. Das in Abbildung 11 gezeigte Chromatogramm veranschaulicht die verwendete Methode. Das Chromatogramm wurde dann in 6 verschiedene Subfraktionen unterteilt, wobei Peak V aufgrund der massenspektrometrischen Ergebnisse als Ircinianin-Substanzpeak angesehen wurde.

Tabelle 2 gibt die Gewichte der jeweiligen gesammelten Subfraktionen und Peaks, die Reinstoffe präsentieren, wieder.

Tabelle 2 Übersicht der Subfraktionsgewichte der 90%-Fraktion.

Subfraktion	I	II	III	IV	V	VI
Gewicht [mg]	10.3	0.9	5.2	2.1	140.0	2.0

3.1.3.2. Strukturuntersuchungen von Peak V (Ircinianin)

Aufgrund der geringen Mengen an isoliertem Reinstoff konnte nur mit Peak V, dem postulierten Ircinianin Peak, eine tiefgreifende Strukturanalyse mittels 1D / 2D-NMR-Spektroskopie durchgeführt werden.

Die Summenformel des Reinstoffes wurde als $C_{25}H_{32}O_4$ mit 10 Doppelbindungsäquivalenten bestimmt (entsprechende Datenübersicht im Anhang).

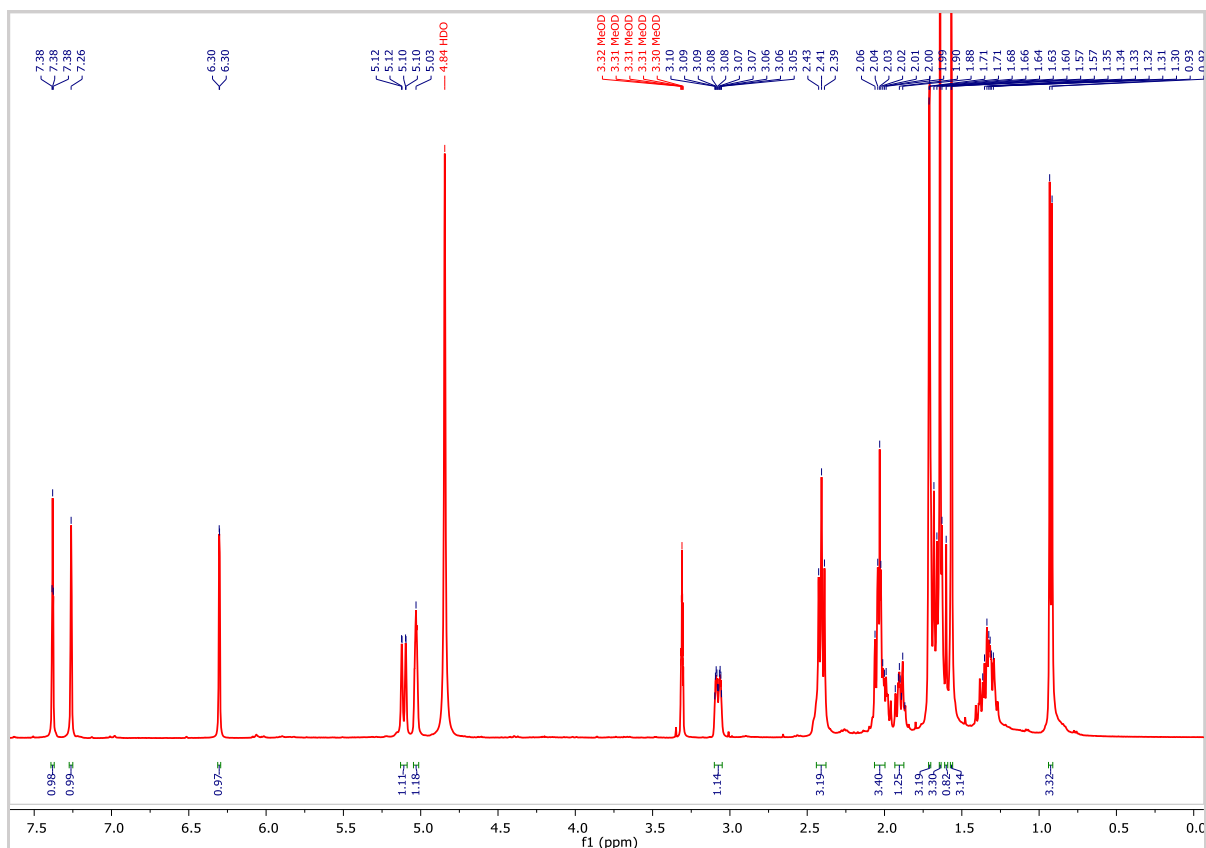


Abbildung 12 1H NMR (400 MHz) von Peak V in $MeOH-d_4$.

Die ersten NMR-Ergebnisse deuteten ebenfalls auf das Ircinianin-Grundgerüst hin. Ausgehend von den 1H -, ^{13}C - und DEPT 135 Spektren konnten typische Signale eines Furano-Sesterterpenes identifiziert werden. Im 1H -Spektrum konnten mit den Signalen bei δ_H 7.38 (1H), 7.26 (1H), 6.30 (1H) die typischen Signale eines monosubstituierten Furans identifiziert werden, die durch weitere vier Signale von Methylgruppen (δ_H 0.92 (3H), 1.57 (3H), 1.64 (3H), 1.71 (3H)), die zudem, nicht nur anhand ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen, leicht durch die entsprechenden Integrale zu identifizieren waren, ergänzt wurden.¹⁰³ Das monosubstituierte Furan konnte auch in den Kohlenstoffspektren durch die charakteristischen Resonanzlagen und Substitutionsgrade von δ_C 144.0 (CH), 140.3 (CH), 126.5 (C), 112.1 (CH) bestätigt

werden.¹⁰⁷ Innerhalb des trizyklischen Kerngerüsts konnte, anhand der Kohlenstoffspektren, zudem das Tetronsäure-Motiv (δ_C 179.2 (C), 177.7 (C), 97.5 (C),

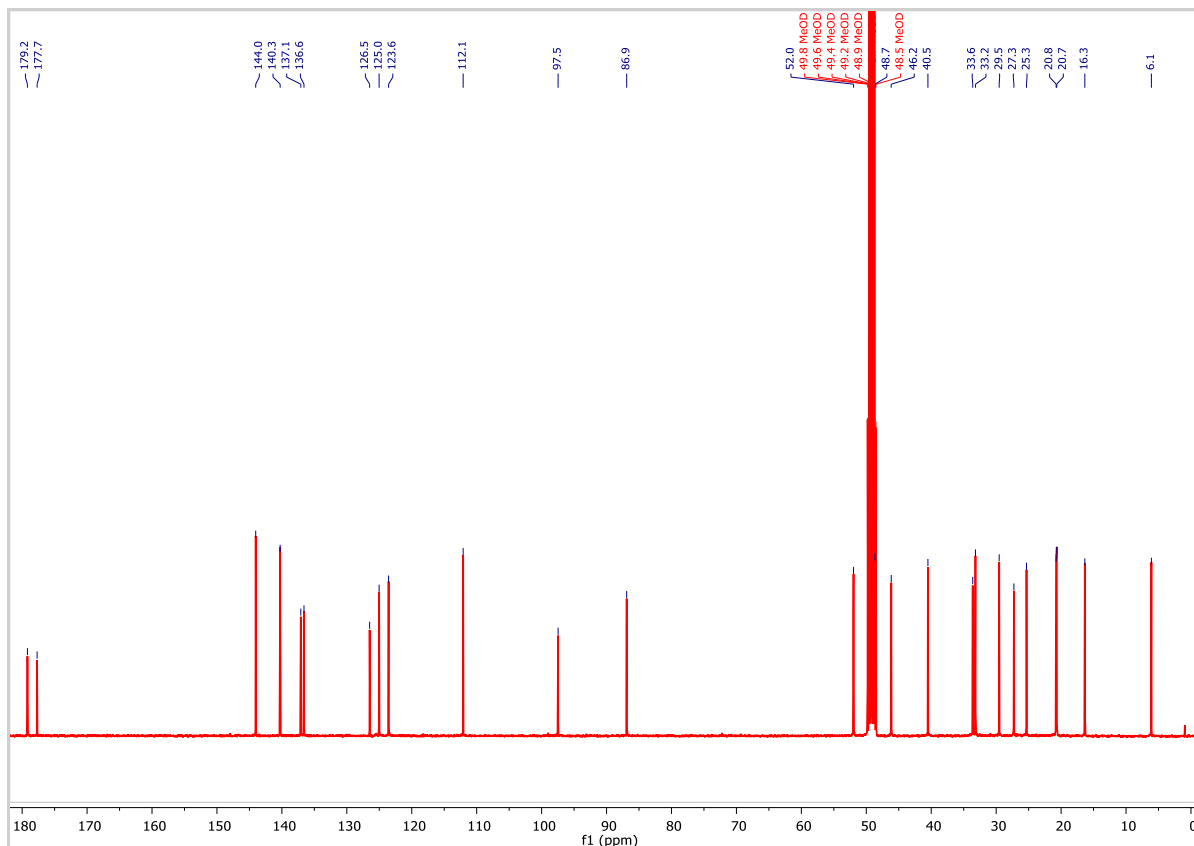


Abbildung 13 ^{13}C -Spektrum (100 MHz) von Peak V in $\text{MeOH-}d_4$.

abgeleitet werden.¹⁰⁷ Die zusätzlichen vier olefinischen Signale mit ihren charakteristischen Verschiebungen bei δ_C 123.6 (CH), 125.0 (CH), 136.6 (C) sowie 137.1 (C) deuteten zwei Alken-Einheiten, in Übereinstimmung mit den ungesättigten Funktionen innerhalb des Terpen-Rückgrats, an. Die beiden quartären Kohlenstoffe zeigten hierbei zudem Resonanzlagen, die auf eine Methylsubstitution hindeuteten.⁹⁰ Ergänzt wurden diese Signale durch weitere vier Methyl- (δ_C 16.3, 20.7, 20.8, 6.1), fünf Methylen- (δ_C 25.3, 27.3, 29.5, 33.6, 40.5) und vier Methingruppen (δ_C 33.2, 46.2, 48.7, 52.0) sowie einem quartären Kohlenstoff (δ_C 86.9). Ausgehend von den 10 Doppelbindungsäquivalenten konnten somit acht Äquivalente auf den Aufbau des Furan-Systems, des Tetronsäure-Zyklus´ und den Doppelbindungen der olefinischen Kohlenstoffe innerhalb des linearen Linkers bzw. des Inden-Motivs verwendet werden. Die verbleibenden zwei Äquivalente mussten somit zwangsläufig mit zwei weiteren Ringschlüssen zusammenhängen, die zum Aufbau des Inden-Ringsystems innerhalb des trizyklischen Spiro-Tetronsäure-Inden-Konstruktes benötigt wurden.

Ausgehend von den zweidimensionalen ^1H - ^1H TOCSY-, ^1H - ^1H COSY- sowie ^1H - ^{13}C -HMBC Experimenten konnten mit den bereits identifizierten Bausteinen drei Hauptfragmente, wie in Abbildung 14 dargestellt, aufgebaut werden. Ein Fragment (C-1 bis C-7) umfasste dabei den Furan-Ring und Teile der linearen Alkylkette, das zweite Fragment (C-8 bis C-14) kombinierte Teile des Inden-Motives zusammen mit den restlichen drei Kohlenstoffen des Linkers zwischen dem trizyklischen Grundgerüst und dem terminalen Furan. Das dritte Fragment (C-15 bis C-20) beschrieb den fünfgliedrigen Ring des Indens, der in Position 18 eine zusätzliche Methylgruppe aufweist. Die Kombination der drei Fragmente zur finalen Ircinianin-Struktur sowie der Aufbau des Tetronsäurezyklus' und dessen Eingliederung in die molekulare Architektur, fußten auf Schlüsselkorrelationen des ^1H - ^{13}C HMBC Experiments. Dipolare Kopplungen des ^1H - ^1H NOESY Spektrums konnten die Verknüpfung und Anordnung der jeweiligen

Fragmente bestätigen und die räumlichen Zusammenhänge innerhalb des trizyklischen Systems zusätzlich absichern, sodass, aufbauend auf den spektroskopischen Ergebnissen, die Terpen-Struktur von Ircinianin bestimmt werden konnte. Die auf Grundlage dieser Untersuchungen

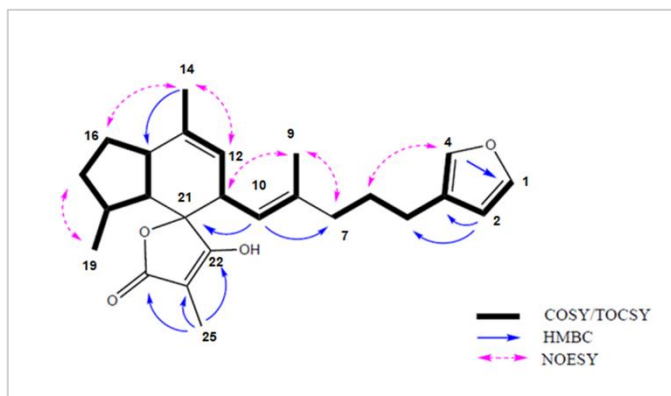


Abbildung 14 Schlüsselkorrelationen der 2D-NMR Experimente von Peak V.

postulierte Struktur stand zudem in Einklang mit den Literaturwerten von Ircinianin.¹¹⁸ Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der NMR-Experimente zusammen.

Für eine vollständige Charakterisierung der Substanz wurden weitere spektroskopische Verfahren angewendet. Da Ircinianin mehrere chirale Zentren aufweist, wurde eine detaillierte Untersuchung zu den architektonischen Gegebenheiten innerhalb der Struktur des Moleküls durchgeführt. Zur Bestimmung der Stereochemie wurde initial ein CD-Spektrum aufgenommen und mit den in der Literatur beschriebenen Werten abgeglichen. Das entsprechende Spektrum ist in Abbildung 15 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3 ^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) Daten von Ircinianin. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_4 . Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

Ircinianin		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , Typus ^A
1	7.38, t (1.7)	144.0, CH
2	6.30, d (0.9)	112.1, CH
3	-	126.5, C
4	7.26, m	140.3, CH
5	2.41, br t (7.5) ^E	25.3, CH ₂
6	1.68, m*	29.5, CH ₂
7	2.04, m	40.5, CH ₂
8	-	136.6, C
9	1.57, d (1.3)	16.3, CH ₃
10	5.11, dd (10.3, 1.1)	125.0, CH
11	3.08, dm (10.3)	48.7, CH ^C
12	5.03, m	123.6, CH
13	-	137.1, C
14	1.71, m	20.8, CH ₃ ^D
15	2.42, m ^E	46.2, CH
16	a. 1.89, m b. 1.34, m ^F	27.3, CH ₂
17	a. 2.00, m b. 1.32, m ^F	33.6, CH ₂
18	1.65, m	33.2, CH
19	0.92, d (6.3)	20.7, CH ₃ ^D
20	1.61, m*	52.0, CH
21	-	86.9, C
22	-	179.2, C ^B
23	-	97.5, C
24	-	177.7, C ^B
25	1.64, br s	6.1, CH ₃

^A Substitutionsgrade wurden aus den Ergebnissen des DEPT 135 und des ^1H - ^{13}C edt. HSQC NMR Experiments abgeleitet.

^{B/D} Zuordnungen innerhalb einer Spalte sind möglicherweise vertauscht.

^C Überlagerung durch den Lösemittelpeak.

^{E/F} Überlagerung von Signalen innerhalb einer Spalte.

* Von weiteren Signalen überlagert.

Es zeigten sich hierbei drei Maxima bei 241 nm (-84), bei 222 nm (+24) und bei 204 nm (-110). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Literaturangaben (241 nm (-22), 222 nm (+5,6), 203 nm (-30)), so fällt auf, dass die entsprechenden Werte nahezu identisch sind bzw. in einem quantitativen Verhältnis stehen.⁹⁵ Die Struktur von Ircinianin wurde zwar 1977 von Hofheinz und Schönholzer mittels Kristallstrukturanalyse beschrieben, allerdings konnte nur die relative Stereochemie abgeleitet werden, weswegen aus den Literaturwerten alleine noch keine Aussagen zur absoluten Konfiguration der jeweiligen Stereozentren gemacht werden konnte. Die finale dreidimensionale Struktur der Substanz konnte später durch asymmetrische Syntheseveruche aufgeklärt werden, wobei anhand des spezifischen Drehwerts sowohl das synthetische Derivat als auch das 1977 publizierte Ircinianin als (-)-Ircinianin identifiziert werden konnten.⁹² Somit konnte auch auf Grundlage der CD-Ergebnisse, die aus Her 6 gewonnene Substanz ebenfalls als (-)-Ircinianin identifiziert werden. Um diese Ergebnisse aber weiter abzusichern, wurde zusätzlich auch noch der Drehwert der isolierten Substanz bestimmt. Im Unterschied zu den gerade erwähnten Arbeiten, wurde die Substanz jedoch nicht in Chloroform, sondern in

Methanol gelöst und vermessen. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Referenzwerte zum Vergleich aus den Arbeiten von Balansa et al. und Coll et al. entnommen.^{113, 118} Die Messung wurde bei 26°C Raumtemperatur durchgeführt und lieferte einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{26} -97,6$ (c=0.328, MeOH). Die Literaturwerte lagen jedoch bei $[\alpha]_D -206$ (c=0.5, MeOH) bzw. $[\alpha]_D^{20} -167$ (c=0.004, MeOH). Das Vorzeichen der jeweiligen Drehwerte stimmte somit immer überein, allerdings unterschieden sich die Absolutwerte erheblich. Diese Unterschiede waren so deutlich, dass sie (vermutlich) nicht allein durch die Temperaturunterschiede erklärt werden konnten. Aus diesem Grund wurde nun, zur finalen Klärung der Stereochemie, eine Strukturanalyse von Ircinianin-Kristallen durchgeführt. Hierzu wurde ein neues Kristallisationsprotokoll etabliert, das, im Gegensatz zur 1977 publizierten Variante,

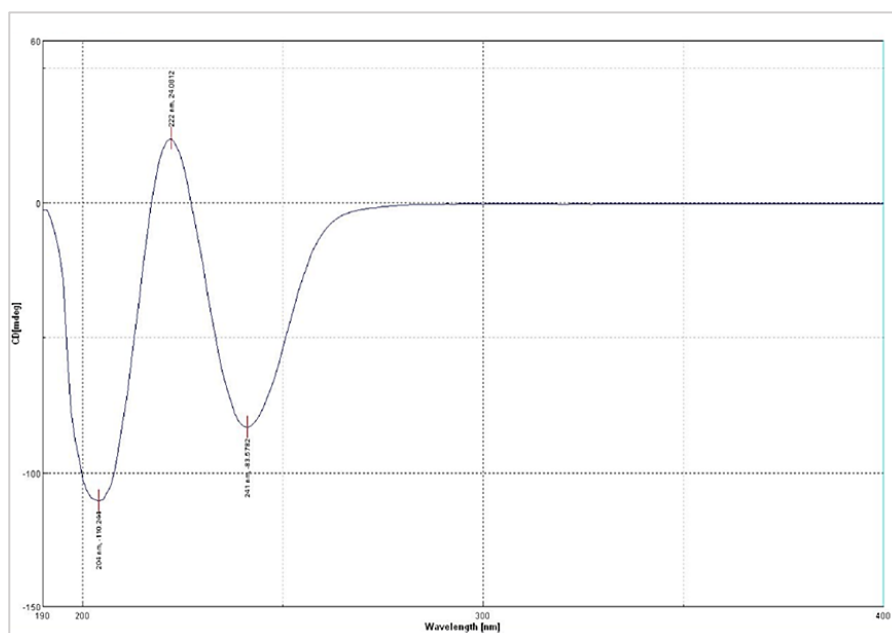


Abbildung 15 CD-Spektrum von Ircinianin in Methanol.

auf einer Acetonitril-Wasser-Lösung basierte. Die erhaltenen orthorhombischen Kristalle wurden bei 120 K vermessen. Die Messung wurde dabei von Herrn Dr. Schollmeyer, Johannes Gutenberg Universität Mainz, vorgenommen und die Auswertung der erhaltenen Datensätze von Ihm zusammen mit Herrn Professor Koch, Universität Regensburg, durchgeführt. Die erhaltenen kristallographischen Daten sind in Abbildung 16 veranschaulicht. Anhand der Kristallstrukturanalyse konnten alle

Stereozentren bestimmt und das Molekül als (-)-Ircinianin ((2*S*,3'*S*,3*a*'*R*,5'*R*,7*a*'*R*)-5'-

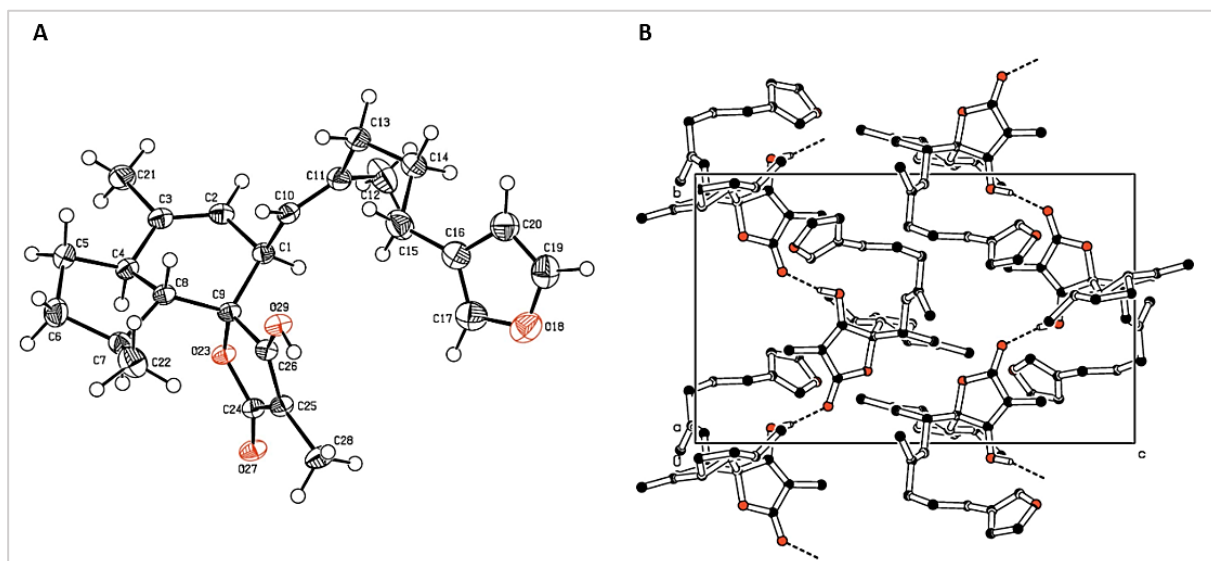


Abbildung 16 Ircinianin³ – räumliche Darstellung auf Grundlage einer kristallographischer Datenanalyse (CCDC reference: 2047802). A: dreidimensionale Ansicht von Ircinianin. B: Molekülanordnung innerhalb des Kristalls – Ansicht entlang der *a*-Achse.

[(*E*)-5-(Furan-3-yl)-2-methylpent-1-en-1-yl]-3-hydroxy-3',4,7'-trimethyl-

1',2',3',3*a*',5',7*a*'-hexahydro-5*H*-spiro[furan-2,4'-inden]-5-on) benannt werden. Die, auf Grundlage der CD-Ergebnisse, getroffene Einschätzung zu den stereochemischen Verhältnissen der Molekülarchitektur, stimmten somit mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse überein.

Die in Abbildung 16 gezeigten Darstellungen verdeutlichen den polyzyklischen Charakter des Moleküls und geben weitere Einblicke in das Strukturgefüge der Verbindung. So ist die Tetronsäure-Einheit im Vergleich zum Inden-Baustein um nahezu 90° verdreht und der Kristallaufbau wird durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Tetronsäure-Einheiten der einzelnen Moleküle bestimmt, die zu einer charakteristischen Packung der Moleküle innerhalb des Gesamtsystems führen.

Um die spektroskopische Analyse zu komplettieren, wurde zudem noch ein IR-Spektrum von Ircinianin aufgenommen, das in Abbildung 17 dargestellt ist. Die charakteristischen Banden zeigten sich bei: IR (ATR) ν_{\max} 2928, 2870, 1714, 1654, 1456, 1308, 1200, 1143, 1023, 873, 801, 765, 723, 669, 599 cm^{-1} , was in

³ Reproduced with permission of the International Union of Crystallography (permission certificate is shown in the supplementary) from: Majer, T.; Schollmeyer, D.; Koch, P.; Gross, H. (2*S*,3'*S*,3*a*'*R*,5'*R*,7*a*'*R*)-5'-[(*E*)-5-(Furan-3-yl)-2-methylpent-1-en-1-yl]-3-hydroxy-3',4,7'-trimethyl-1',2',3',3*a*',5',7*a*'-hexahydro-5*H*-spiro[furan-2,4'-inden]-5-one. *IUCrData* **2020**, 5, x201578, doi:10.1107/S2414314620015783.

Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten ist: IR (KBr) ν_{\max} 3400-2600 br, 1709, 1659, 1620, 1261, 1119, 1022, 865, 751 cm^{-1} und IR (KBr) ν_{\max} 3437, 1720, 1652, 1118 cm^{-1} .^{92, 95}

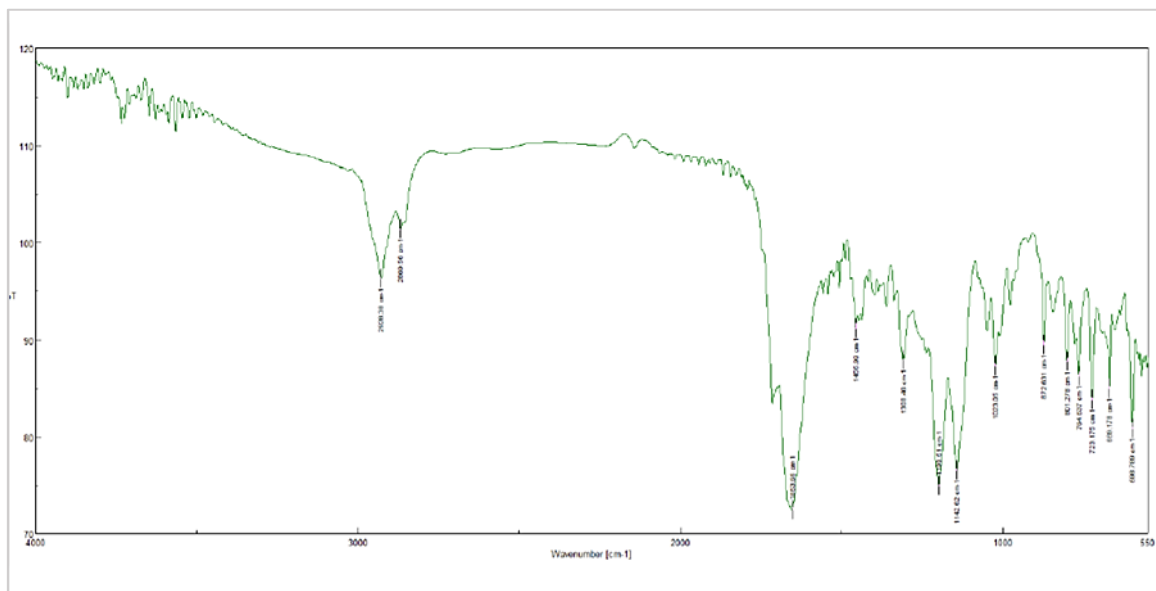


Abbildung 17 IR-Spektrum von Ircinianin.

3.1.4. Aufarbeitung der 50%-Fraktion

3.1.4.1. Isolation der Substanzen aus der 50%-Fraktion

Ausgehend von dem HPLC Profiling der Fraktionen und der anschließenden massenspektroskopischen Untersuchung, konnten in der 50%-Fraktion Molekülmassen nachgewiesen werden, die mit denen der Ircinianin-Metaboliten übereinstimmten und deshalb von besonderem Interesse waren (siehe Tabelle 4 und Abbildung 6). Aus diesem Grund wurde diese Fraktion für weitere Isolationsversuche herangezogen.

Tabelle 4 Übersicht der (+)-HRESIMS-Ergebnisse mit zugehörigen Summenformeln sowie mit diesen Massen assoziierten Substanzen der Ircinianin-Familie.

Subfraktion	I	II
Masse [Da]	470.2540	486.2486
Summenformel [M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₆ NO ₆	C ₂₇ H ₃₆ NO ₇
assoziierte Naturstoffe	Ircinianin Lactam A	Oxoircinianin Lactam A

Ergebnisse und Diskussion

Im weiteren Verlauf wurde die HPLC-Methode dahingehend optimiert, die Auflösung der jeweiligen Peaks und Subfraktion zu verbessern und gleichzeitig die Laufzeit so kurz wie möglich zu halten, um den Aufreinigungsprozess zu beschleunigen. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 18 gezeigt.

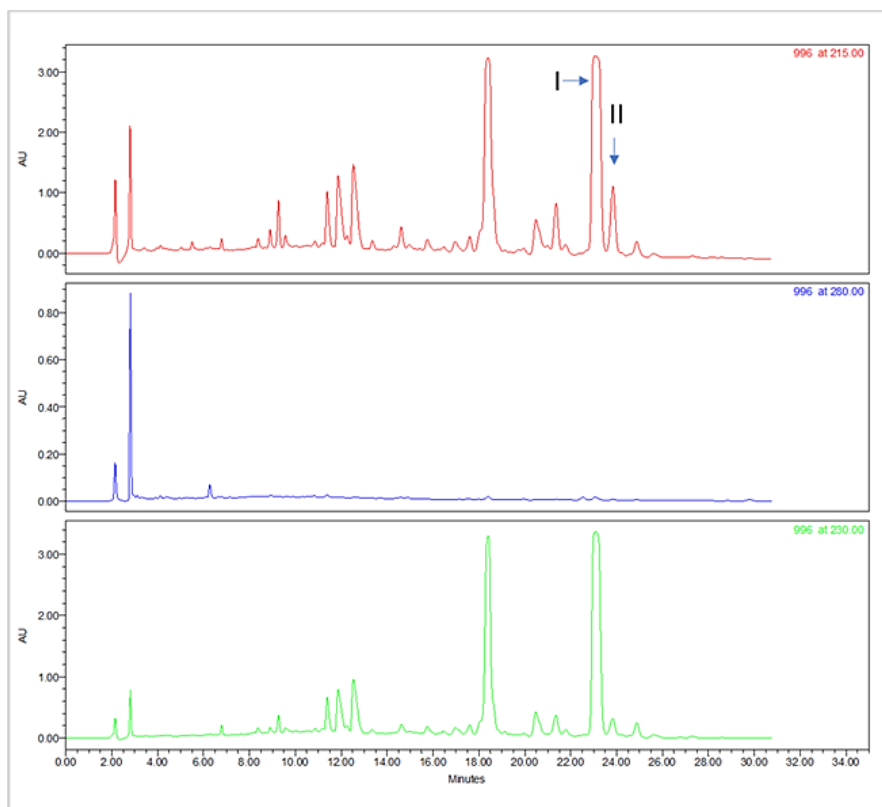


Abbildung 18 Chromatogramm der 50%-Fraktion mit der für die Isolierung optimierten Methode. Die römischen Ziffern bezeichnen die jeweils isolierten Bereiche. Oben: Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 215 nm; Mitte: Detektionswellenlänge von 280 nm; unten: Detektionswellenlänge von 230 nm.

Aus den ursprünglichen 45 mg der Fraktion konnten so ausreichende Mengen an Reinsubstanz isoliert werden, um weitergehende spektroskopische Analysen durchzuführen, die im Folgenden dargestellt werden. Tabelle 5 gibt die isolierten Mengen wieder.

Tabelle 5 Übersicht der Subfraktionsgewichte der 50%-Fraktion.

Subfraktion	I	II
Gewicht [mg]	2.0	1.8

3.1.4.2. Strukturuntersuchungen von Peak I (Ircinianin Lactam A)

Basierend auf den LC-HRESIMS Studien konnte vermutet werden, dass es sich bei Peak I um Ircinianin Lactam A handelte.

Um diese Vermutung bestätigen zu können, wurden deshalb die isolierten 2.0 mg Reinsubstanz in deuteriertem Methanol gelöst und am NMR Spektrometer ein ^1H - und ^{13}C -Experiment durchgeführt, um die gemessenen chemischen Verschiebungen mit den Daten aus der Literatur vergleichen zu können.

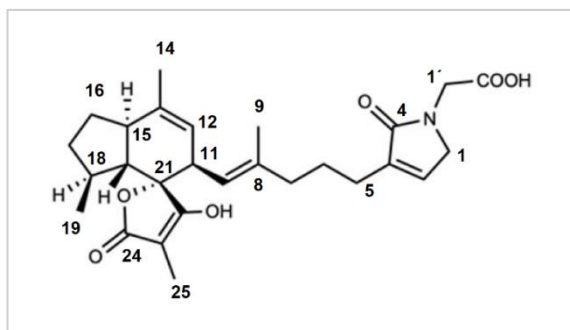


Abbildung 19 Ircinianin Lactam A – Strukturformel mit Positionsnummern.

Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Werte stimmten mit den in der Literatur festgehaltenen chemischen Verschiebungen überein, weswegen Subfraktion I zweifelsfrei als Ircinianin Lactam A identifiziert werden konnte.¹¹⁸ Im Vergleich zur Literatur konnten sogar die Kohlenstoffsignale der Tetransäure-Einheit detektiert werden.

Tabelle 6 ^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) Daten von (-)-Ircinianin Lactam A. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_4 . Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

(-)-Ircinianin Lactam A		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}
1	4.07, m ^A	53.2
2	6.94, m	139.1
3	-	140.1
4	-	172.5
5	2.22-2.29, m	26.2
6	1.71, m ^B	27.0
7	2.08, dd (7.2, 6.9)	40.4
8	-	136.2
9	1.57, d (1.1)	16.2
10	5.13, d (10.2)	125.5
11	3.07, dm (10.2)	48.8 ^E
12	5.02, m	123.5
13	-	137.0
14	1.71, m ^B	20.71 ^F
15	2.39-2.47, m	46.1
16	a. 1.87-1.92, m ^C b. 1.19-1.42, m ^D	27.3
17	a. 1.99, m ^C b. 1.19-1.42, m ^D	33.6
18	1.66-1.69, m ^r	33.2
19	0.93, m ^r	20.71 ^F
20	1.58-1.64, m	51.7
21	-	[86.8]
22	-	179.2
23	-	97.4
24	-	[177.7]
25	1.65, s	6.1
1'	4.07, br s ^A	[44.4]
2'	-	[174.6]

^{A/B/C/D/F} Überlagerung von Signalen innerhalb einer Spalte.

^r Überlagerungen durch eine n-Butanol Verunreinigung.

^E Überlagerung durch den Lösemittelpeak.

[] Zuordnung basierend auf Vergleichen mit den Literaturwerten der bekannten Verbindungen.

3.1.4.3. Strukturanalyse von Peak II (Oxoircinianin Lactam A)

Mit Peak II wurde wie mit Peak I verfahren. Da die Massen-Analyse nahelegte, dass es sich um Oxoircinianin Lactam A handelte, wurde auch hier die isolierte Reinsubstanz in Methanol- d_4 gelöst und am NMR-Spektrometer vermessen. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 7 gezeigt. Anhand eines Vergleichs mit den in der Literatur festgehaltenen Werten, zeigte sich eindeutig, dass es sich bei der isolierten Substanz um Oxoircinianin Lactam A handelte.¹¹⁸

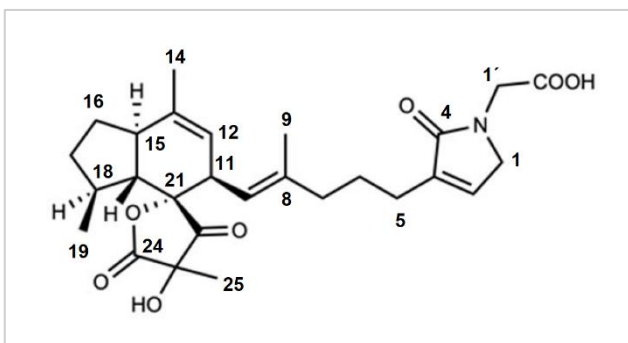


Abbildung 20 Oxoircinianin Lactam A – Strukturformel mit Positionsnummern.

Tabelle 7 ^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) Daten von (-)-Oxoircinianin Lactam A. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_4 . Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

(-)-Oxoircinianin Lactam A		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}
1	4.07, m	53.1
2	6.96, m	139.0
3	-	140.1
4	-	174.5
5	2.26, br t (7.5)	26.3
6	1.64-1.70, m*	26.9 ^A
7	2.05, dd (7.3, 7.1) ^B	40.4
8	-	137.7
9	1.58, d (1.1)	16.5
10	5.00, m ^C	124.1
11	3.34, m ^F	48.2
12	5.03, m ^C	121.6
13	-	137.2
14	1.72, d (1.2) ^E	21.3
15	2.36-2.49, m	45.6
16	a. 1.89-1.95, m b. 1.28-1.36, m ^D	26.8 ^A
17	a. 2.05, m ^B b. 1.28-1.36, m ^D	34.1
18	1.73, m ^E	33.0
19	0.83, d (6.1)	20.8
20	1.65-1.73, m*	51.9
21	-	92.9
22	-	208.0
23	-	70.2
24	-	175.7
25	1.38, s	19.8
1'	4.23, s	44.6
2'	-	172.6

^A Zuordnung sind möglicherweise vertauscht.

* Von anderen Signalen überlagert.

^{B/C/D/E} Überlagerte Signale innerhalb einer Spalte.

^F Überlagerungen durch Lösemittelpeak.

3.1.5. Aufarbeitung der 100%-Fraktion

3.1.5.1. Isolation der Substanzen aus der 100%-Fraktion

Im weiteren Verlauf wurde die 100%-Fraktion für weitere Isolationsvorhaben herangezogen, da die Ergebnisse der Massenspektrometrie darauf hindeuteten, dass

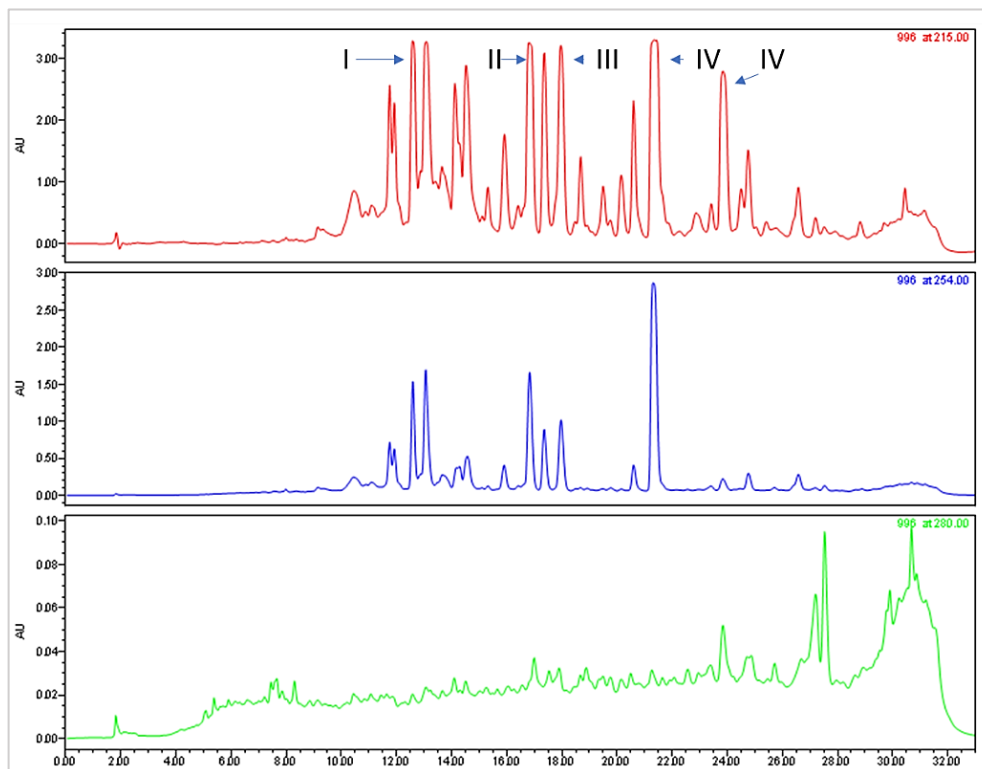


Abbildung 21 Chromatogramm der 100%-Fraktion mit der für die Isolierung optimierten Methode. Die römischen Ziffern bezeichnen die jeweils isolierten Bereiche. Oben: Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 215 nm; Mitte: Detektionswellenlänge von 254 nm; unten: Detektionswellenlänge von 280 nm.

bereits bekannte Ircinianin-Derivate vorhanden sein könnten. Es konnten allerdings auch Molekulargewichte nachgewiesen werden, die bisher nicht in der Literatur beschrieben wurden, obschon das Fragmentierungsmuster aber darauf hindeutete, dass die betrachteten Substanzen ebenfalls dieser Substanzklasse zuzuordnen waren. Tabelle 8 gibt die Ergebnisse der Massenanalyse wieder.

Tabelle 8 Übersicht der (+)-HRESIMS-Ergebnisse mit zugehörigen Summenformeln und assoziierten Substanzen der Ircinianin-Familie.

Peak	I	II	III	IV	V
Masse [Da]	429.2281	443.2431	413.2327	397.2376	413.2325
Summenformel [M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ O ₆	C ₂₆ H ₃₅ O ₆	C ₂₅ H ₃₃ O ₅	C ₂₅ H ₃₃ O ₄	C ₂₅ H ₃₃ O ₅
assoziierte Naturstoffe	unbekannt	unbekannt	Ircinianin Lacton A	Ircinianin	Oxoircinianin

Da sich auf Grundlage der HRMS-Experimente keine finalen Aussagen zur Struktur der betrachteten Moleküle machen ließ, wurde mit der Isolation und Aufreinigung der jeweiligen Substanzen begonnen, weshalb die Trennungsmethode an der HPLC auf optimale Separation der jeweiligen Signale, bei einer möglichst kurzen Gesamtlaufzeit, hin optimiert wurde. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 21 gezeigt. Aus den ursprünglichen 84 mg der Gesamtfraktion konnten so ausreichende Mengen an Reinsubstanz isoliert werden, um weitergehende spektroskopische Analysen durchzuführen, die im Folgenden dargestellt werden. Tabelle 9 gibt die isolierten Mengen wieder.

Tabelle 9 Übersicht der Subfraktionsgewichte der 100%-Fraktion.

Subfraktion	I	II	III	IV	V
Gewicht [mg]	2.4	2.5	2.1	24.0	2.3

Von jeder Subfraktion konnte eine ausreichende Menge in entsprechender Reinheit gewonnen werden, sodass alle Substanzen einer ausführlichen chemischen Strukturanalyse unterzogen werden konnten. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargelegt.

3.1.5.2. Strukturuntersuchungen von Peak III-V

Gemäß den Daten der HR-MS-Analyse wurde vermutet, dass es sich bei der Substanz von **Peak III** um Ircinianin Lacton A handelte. Für die vollumfängliche Bestätigung, dass es sich bei dem isolierten Naturstoff wirklich um diese Verbindung handelte, wurde die Probe in Methanol- d_4 gelöst und ein ^1H - und ^{13}C NMR Spektrum aufgenommen und die Daten mit den Literaturwerten verglichen.¹¹⁸ Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

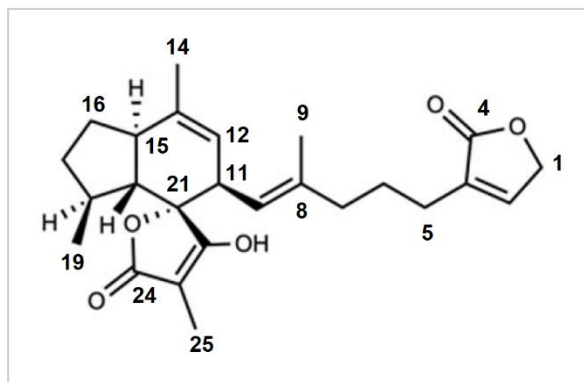


Abbildung 22 Ircinianin Lacton A – Strukturformel mit Positionsnummern.

Tabelle 10 ^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) Daten von (-)-Ircinianin Lacton A. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_4 . Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

(-)-Ircinianin Lacton A		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}
1	4.83, br q (1.7)	72.1
2	7.37, br quin (1.4)	147.9
3	-	134.4
4	-	177.0
5	2.26, m	25.7
6	1.69, m ^B	26.7
7	2.08, dd (7.6, 7.4)	40.3
8	-	136.0
9	1.58, d (1.1)	16.1
10	5.14, d (10.4)	125.3
11	3.07, dm (10.4)	48.6 ^F
12	5.03, m	123.3
13	-	137.0
14	1.71, d (1.1) ^B	20.5 ^C
15	2.41, m	46.0
16	a. 1.89, m ^A b. 1.32, m ^C	27.1
17	a. 2.01, m ^A b. 1.30, m ^C	33.5
18	1.64, m ^E	33.1
19	0.92, d (6.1)	20.6 ^C
20	1.61, m [*]	51.7
21	-	86.7
22	-	179.3 ^D
23	-	97.3
24	-	177.6 ^D
25	1.64, s ^E	6.0

^{A/B/E} Überlagerungen von Signalen innerhalb einer Spalte.

^{C/D} Zuordnungen sind möglicherweise vertauscht.

* Überlagerungen von anderen Signalen.

^F Überlagerungen durch Lösemittelpeak.

Der Vergleich mit den Literaturwerten zeigte eindeutig, dass es sich bei dem isolierten Stoff um (-)-Ircinianin Lacton A handelte.

Bei **Peak IV** wurde vermutet, dass es sich, wie schon bei Peak V der 90%-Fraktion, um Ircinianin handelte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde ein Vergleich der ^1H NMR-Spektren von Ircinianin (90%-Fraktion, Peak V) und Peak IV der 100%-Fraktion durchgeführt. Die Spektren waren, von einer kleinen Verunreinigung abgesehen, deckungsgleich, was bewies, dass die isolierte Verbindung auch (-)-Ircinianin war. Abbildung 23 illustriert den Vergleich der beiden NMR-Spektren.

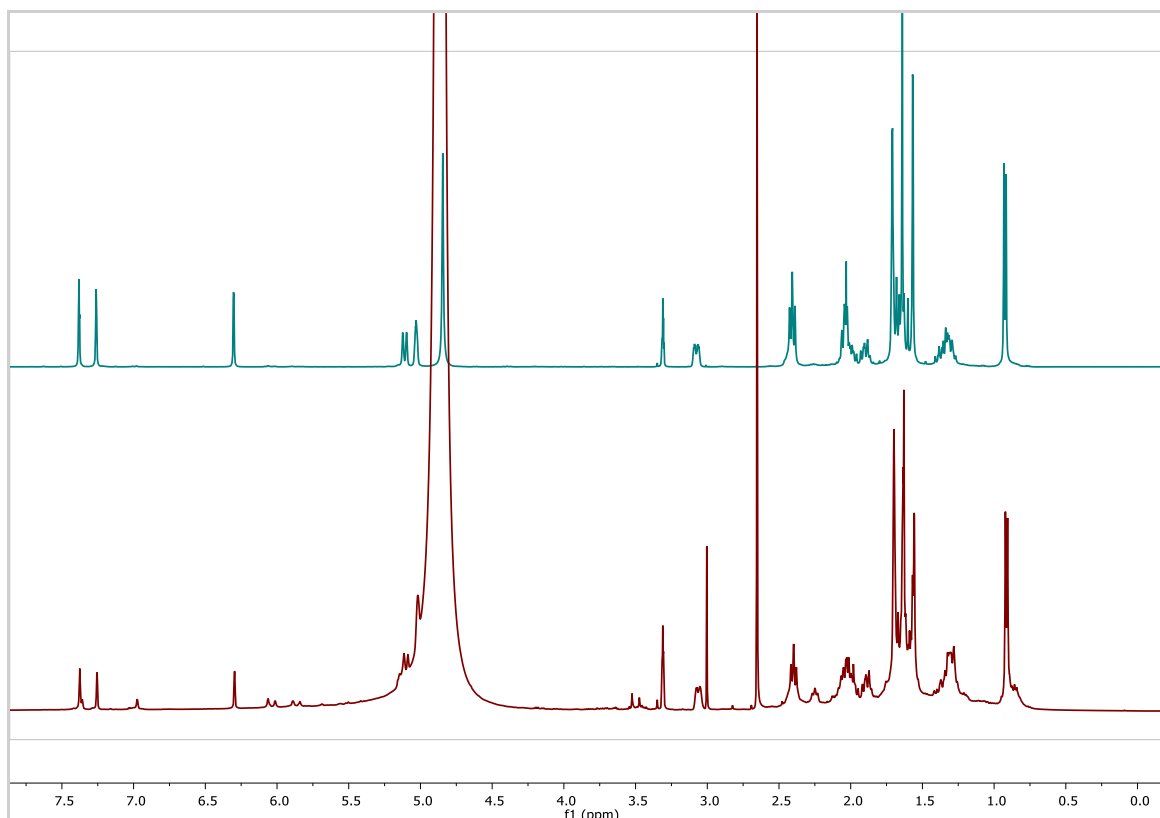


Abbildung 23 Strukturbestimmung von Peak IV – Vergleich der ^1H NMR Spektren (400 MHz) von Ircinianin (90%-Fraktion, oben) und Peak IV (100%-Fraktion, unten) in $\text{MeOH-}d_4$.

Peak V wurde anhand seiner Summenformel als Oxoircinianin identifiziert und die Klassenzugehörigkeit durch eine MS^2 -Analyse im Vergleich zu Ircinianin und Oxoircinianin (Peak II, 50%-Fraktion) anhand seines Fragmentierungsmusters verdeutlicht (vgl. Abbildung 24). Die Analyse der MS -Fragmente zeigte, dass sich die Fragmentierungsmuster aller drei Moleküle sehr ähnlich sind, im Detail aber an einigen Stellen merklich unterscheiden. Die beiden Derivate mit der höher oxidierten Tetronsäure-Variante wiesen ein charakteristisches, intensives Fragment mit einer Masse von 237.1124 / 237.1126 Da auf, das sich bei der klassischen Tetronsäure-Formation von Ircinianin nicht nachweisen ließ. Hier zeigte sich ein intensives Signal bei 229.1227 Da, welches wiederum bei den beiden anderen Verbindungen nicht

Ergebnisse und Diskussion

erzeugt werden konnte. Diese Untersuchungen unterstrichen somit die Beschreibung von Peak V als Oxoircinianin anhand des Nachweises der höher oxidierten Tetronsäure.

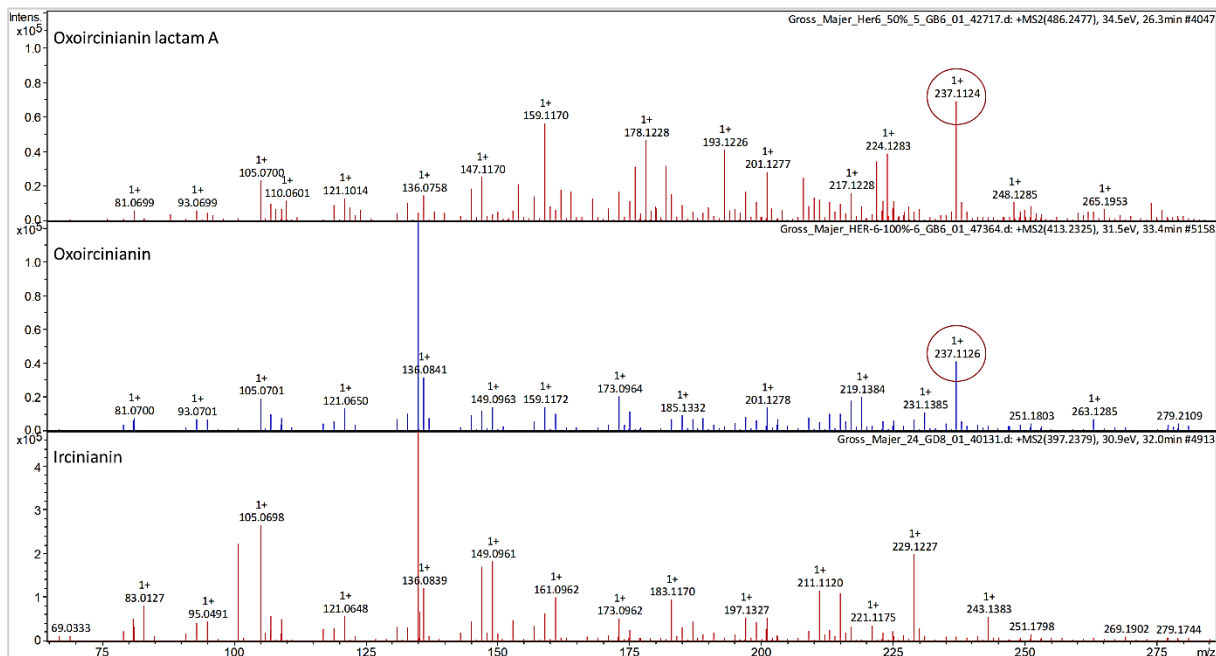


Abbildung 24 Vergleich der Fragmentierungsmuster von Oxoircinianin Lactam A (Subfraktion II, 50%-Fraktion), Oxoircinianin (Subfraktion V, 100%-Fraktion) und Ircinianin (Subfraktion V, 90%-Fraktion). Ein für die „Oxo“-Form typisches Fragment ist hervorgehoben.

Um diese Ergebnisse weiter abzusichern, wurde zusätzlich ein ^{13}C NMR-Spektrum der mit Oxoircinianin angereicherten Subfraktion V angefertigt. So konnten die charakteristischen Verschiebungen der mit den beiden Carbonylen bzw. der Hydroxygruppe substituierten Kohlenstoffe innerhalb der modifizierten Tetronsäure-Einheit nachgewiesen werden. Die Zuordnung erfolgte dabei durch den Vergleich mit dem Kohlenstoffspektrum von Oxoircinianin Lactam A, das dasselbe Motiv in seinem Grundgerüst aufwies. Somit konnte die höher oxidierte Tetronsäure-Form final bestätigt werden. Die Ergebnisse des Strukturvergleiches, anhand der jeweiligen Spektren, sind in Abbildung 25 dargelegt.

Ergebnisse und Diskussion

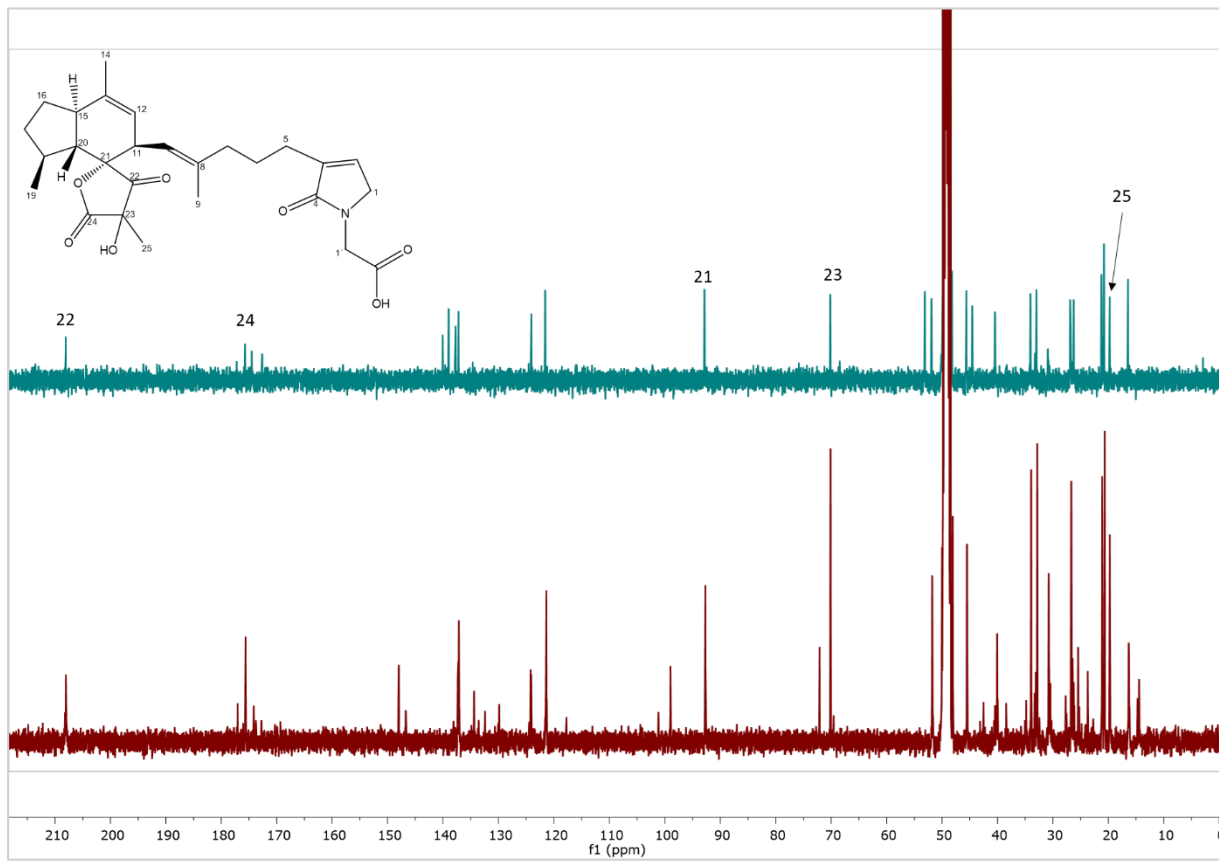
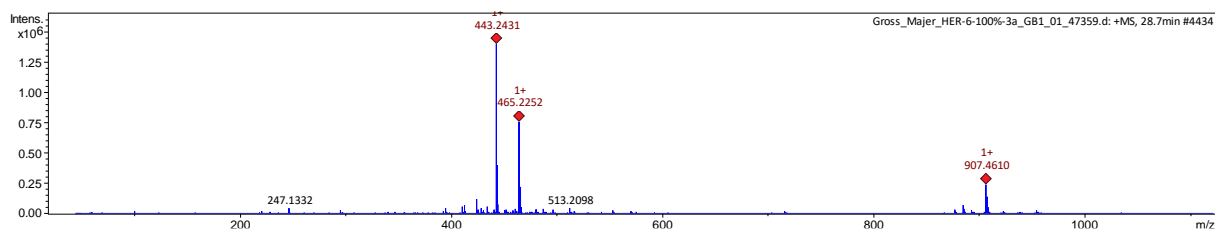


Abbildung 25 ¹³C NMR Spektrum (100 MHz) von Oxoircinianin Lactam A (oben) und ¹³C NMR Spektrum (100 MHz) einer mit Oxoircinianin angereicherten Fraktion (unten) in MeOH-*d*₄. Die für die „Oxo“-Form charakteristischen Tetrensäure-Kohlenstoffe des Oxoircinianin lactam A sind im Spektrum mit ihrer korrespondierenden Positionsnummer im Kohlenstoffgerüst bezeichnet.

3.1.5.3. Strukturuntersuchungen von Peak II (Ircinianin Lacton B)

Die Untersuchungen zur molekularen Struktur von Peak II wurden anhand einer Vielzahl von NMR-Experimenten durchgeführt. Ausgangspunkt war die Summenformel von $C_{26}H_{35}O_6$ ($[M+H]^+$, 443.2431, berechnet als 443.2428) mit 10 Doppelbindungsäquivalenten, die auf Grundlage einer LC-HR-MS-Messung bestimmt wurde. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 26 gezeigt. Da diese Masse

A



B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
443.2431	1	$C_{26}H_{35}O_6$	443.2428	-0.6	-2.1	10.0	ok	even	3.2	7.1
443.2431	2	$C_{23}H_{27}N_{10}$	443.2415	-3.7	-5.2	16.0	ok	even	10.1	16.3
443.2431	3	$C_{27}H_{31}N_4O_2$	443.2442	2.4	1.5	15.0	ok	even	13.3	17.0
443.2431	4	$C_{22}H_{31}N_6O_4$	443.2401	-6.7	-7.9	11.0	ok	even	16.5	27.6

C

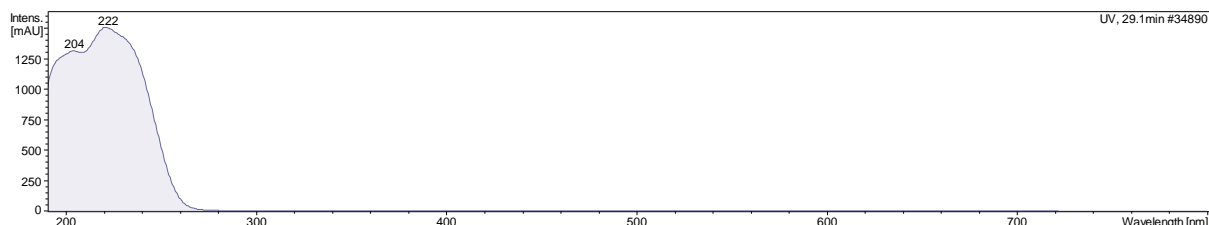


Abbildung 26 MS-Analyse von Peak II im Positiv-Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: extrahiertes UV-Profil.

bzw. die daraus abgeleitete Summenformel bisher nicht im Kontext der Ircinianin-Sesterterpene beschrieben war, aber auf Grundlage der Fragmentierungsversuche davon ausgegangen werden konnte, dass es sich hierbei um ein zusätzliches Derivat dieser Naturstoffklasse handelte, wurde eine ausführliche Strukturbestimmung mittels Kernresonanzspektroskopie angeschlossen.

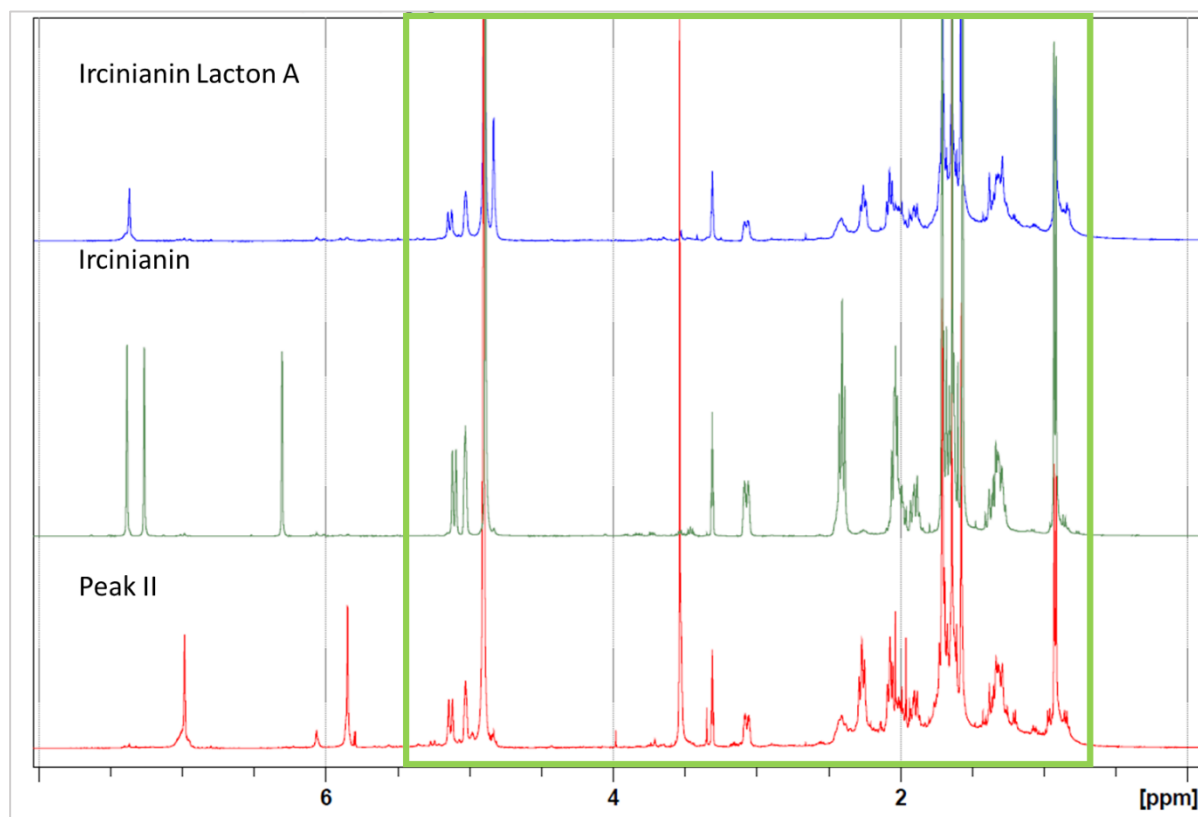


Abbildung 27 Gestaffelte ^1H NMR Spektren (400 MHz) von Ircinianin Lacton A, Ircinianin und Peak II, aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$. Der Vergleich veranschaulicht den „Fingerprint-Bereich“ des Ircinianin-Grundgerüsts zwischen 0.6-5.5 ppm, hervorgehoben durch den grünen Rahmen. Die Signale der terminalen Heterozyklen finden sich im Bereich zwischen 5.5-7.5 ppm.

Basierend auf einem ersten Vergleich der ^1H Spektren von Peak II mit Ircinianin und Ircinianin Lacton A konnte das zyklische Terpengrundgerüst zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zum einen fanden sich die Methylen-Signale der Alkylkette (δ_{H} 1.25-2.50), die den terminalen Heterozyklus mit dem Inden-Tetrone-Baustein verbindet, zum anderen zeigten sich aber auch mit dem Dublett vom Multiplett (δ_{H} 3.06) und den olefinischen Signalen (δ_{H} 5.01 und 5.12) des Penten-Motivs und der Kohlenwasserstoffkette typische Resonanzlagen und Aufspaltungsmuster der Ircinianin-Terpene. Somit konnte im ^1H NMR Spektrum der Bereich von 0.5-5.5 ppm als Fingerprint-Motiv der Ircinianin-Klasse mit ihrem Spiro-Inden-Tetrone-Aufbau identifiziert werden, was sich durch die Vergleiche mit den entsprechenden ^{13}C - und DEPT 135 Kohlenstoffspektren bestätigte. Die Abwesenheit eines Keto-Signals bei etwa δ_{C} 200, wie etwa bei Oxoircinianin, bekräftigte zudem das vinyloge Carbonsäure-Element der Tetrone im Grundgerüst (vgl. Abbildung 29). Die vorgestellte Analyse zeigte somit die Möglichkeit auf, die Sesterterpene der Ircinianin-Gruppe anhand der ^1H NMR Spektren zu identifizieren.

Ergebnisse und Diskussion

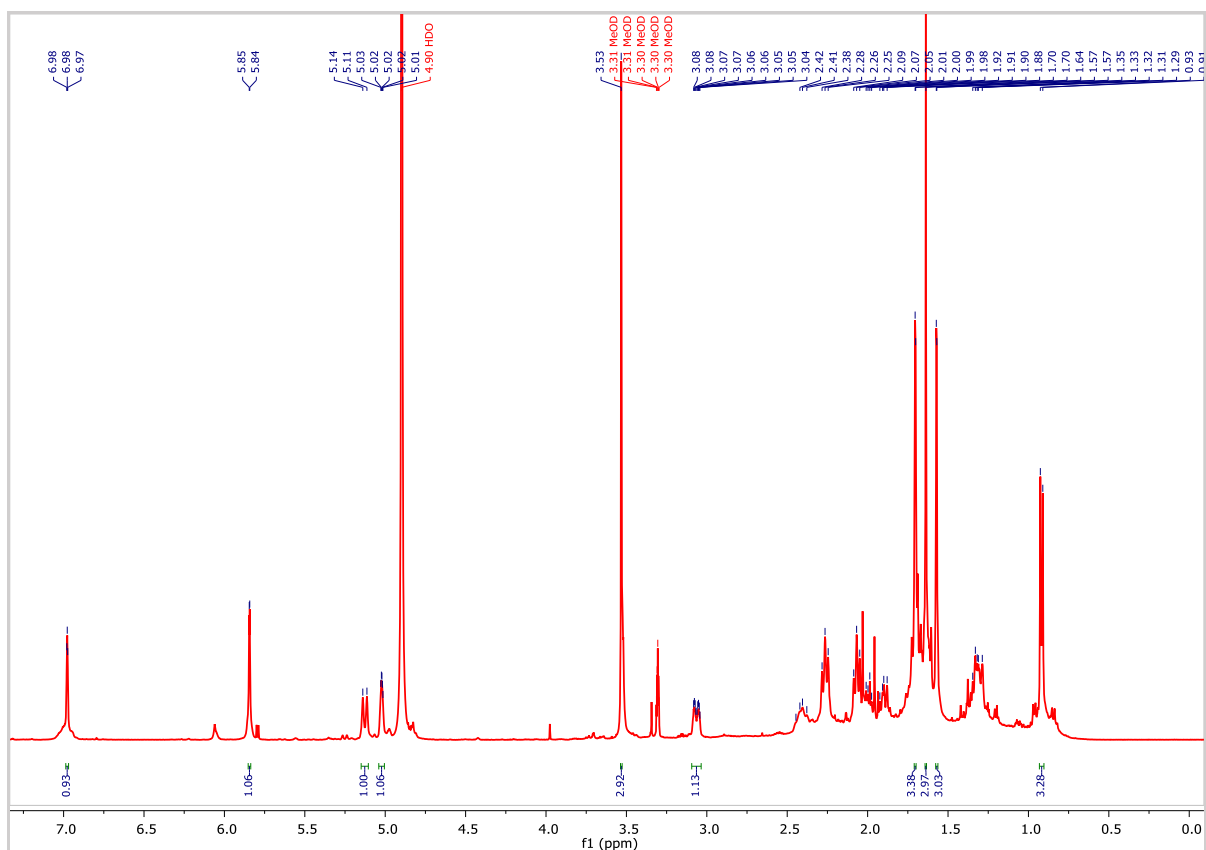


Abbildung 28 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) von Peak II in $\text{MeOH-}d_4$.

Im Bereich von 5.5-7.5 ppm, der Signallage der terminalen Heterozyklen, zeigten sich bei Peak II, im Vergleich zu Ircinianin und dessen Lacton-Derivat, zwei neue Signale bei H-1 (δ_{H} 5.84 (**1H**)) und H-2 (6.98 (1H)); siehe Abbildungen 27 und 28). Trotzdem war eine gewisse Ähnlichkeit zu Ircinianin Lacton A zu erkennen (H-1: 4.83 (**2H**), H-2: 7.37 (1H); siehe Anhang 20), wobei die Integrale aber ein anderes Substitutionsmuster an C-1 andeuteten. Die Subtraktion beider Summenformeln zeigte bei Peak II einen zusätzlichen OCH_2 -Baustein an. Dieser Eindruck wurde zudem durch die zusätzlichen Signale bei $\delta_{\text{H/C}}$ 3.52 / 57.1 (3H), den typischen Signalen einer Methoxygruppe, untermauert.¹⁰⁷ Die Substitution einer Methoxygruppe an C-1 würde somit zur Ausbildung eines Halbacetales führen, das von den Resonanzlagen im Einklang mit dem im $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ edt. HSQC Spektrum detektierten Signalpaar $\delta_{\text{H/C}}$ 5.84 / 104.4 stand.^{101, 123} Außerdem erklärte dieses Substitutionsmuster die leicht hochfeldverschobene Signallage von H-2.¹²³ Diese Beobachtungen wurden zudem von der Analyse der Phasenlage des δ_{C} 104.4 Signals im DEPT 135- als auch im $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ edt. HSQC Spektrum gestützt.

Ergebnisse und Diskussion

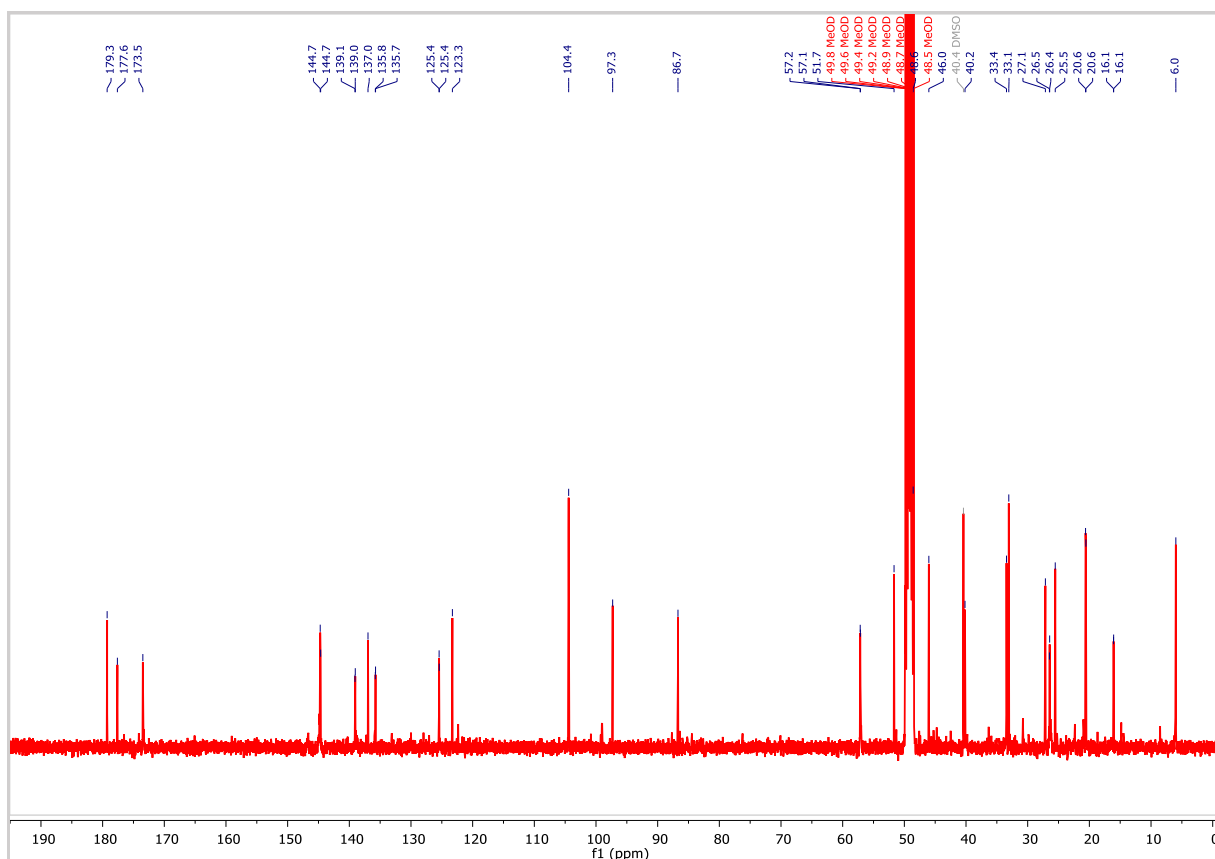


Abbildung 29 ^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von Peak II in $\text{MeOH-}d_4$.

Zudem zeigten die Analysen des $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY und des $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY Spektrums, dass H-1 / C-1 und H-2 / C-2 ein gemeinsames Spinsystem ausbildeten,

weswegen von einer an C-1 methoxylierten Variante des Ircinianin Lactons A ausgegangen wurde. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde

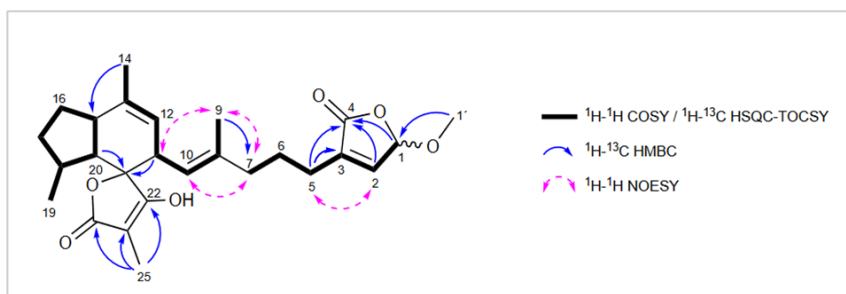


Abbildung 30 2D-NMR Schlüsselkorrelationen von Peak II.

das Lactonsystem mittels 2D-NMR Experimenten bestätigt (vgl. Abbildung 30), da im $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC Spektrum sowohl entsprechende Schlüsselkorrelationen von $\text{H}_3\text{-}1'$ zu C-1 das Substitutionsmuster klar belegten als auch Kopplungen von $\text{H}_2\text{-}5$ zu C-3 und H-1 zu C-4 den Lacton-Ringschluss sowie die Anknüpfung des Heterosystems an die Alkylkette aufzeigten. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Das so nachgewiesene Motiv des α -substituierten γ -Methoxy- γ -butenolid-Systems wurde zudem durch Vergleiche mit Literaturwerten anderer

Ergebnisse und Diskussion

Sekundärmetaboliten, die gleichartige Lactonsysteme aufweisen, abgesichert.¹²³⁻¹²⁵

Als zweiter Vertreter der Ircinianin-Gruppe, der einen Lactonring aufwies und der sich nur durch die Substitution an C-1 von Ircinianin Lacton A unterschied, wurde dieses Molekül als Ircinianin Lacton B bezeichnet. Tabelle 11 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 11 ¹H (400 MHz) und ¹³C (100 MHz) Daten von Ircinianin Lacton B. Aufgenommen bei 298 K in Methanol-*d*₄. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

Ircinianin Lacton B		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , Typus ^A
1	5.84, br q (1.2)	104.4, CH
2	6.98, br quin (1.2)	144.65, CH 144.72 ^E
3	-	139.03, C 139.08 ^E
4	-	173.5, C
5	2.26, br t (7.8)	25.5, CH ₂
6	1.67, m*	26.44, CH ₂ 26.47 ^E
7	2.07, dd (7.9, 7.2)	40.2, CH ₂
8	-	135.75, C 135.78 ^E
9	1.57, d (1.3)	16.06, CH ₃ 16.08 ^E
10	5.12, m	125.41, CH 125.44 ^E
11	3.06, dm (10.3)	48.6, CH ^C
12	5.01, m	123.3, CH
13	-	137.0, C
14	1.70, d (1.4)	20.56, CH ₃ ^D
15	2.40, m	46.0, CH
16	a. 1.89, m b. 1.32, m ^F	27.1, CH ₂
17	a. 2.00, m b. 1.29, m ^F	33.4, CH ₂
18	1.63, m*	33.1, CH
19	0.92, d (6,2)	20.62, CH ₃ ^D
20	1.61, m*	51.7, CH
21	-	86.7, C
22	-	179.3, C ^B
23	-	97.3, C
24	-	177.6, C ^B
25	1.63, br s	6.0, CH ₃
1'	3.52, br s	57.13, CH ₃ 57.16 ^E

^A Substitutionsgrade wurden aus den Ergebnissen des DEPT 135 und des ¹H-¹³C edt. HSQC NMR Experiments abgeleitet.

^{B/D} Zuordnungen innerhalb einer Spalte sind möglicherweise vertauscht.

^C Überlagerung durch den Lösemittelpeak.

^E Ein weiteres Signal wurde im Verhältnis von 1:1 beobachtet, dass auf eine Epimerisierung der γ -Methoxy- γ -butenolid Funktionalität an C-1 zurückzuführen ist.

^F Überlagerung von Signalen innerhalb einer Spalte.

* Von weiteren Signalen überlagert.

Nachdem die zweidimensionale Struktur bestimmt, durch verschiedenste Experimente bestätigt und über Literaturvergleiche zusätzlich abgesichert wurde,

Ergebnisse und Diskussion

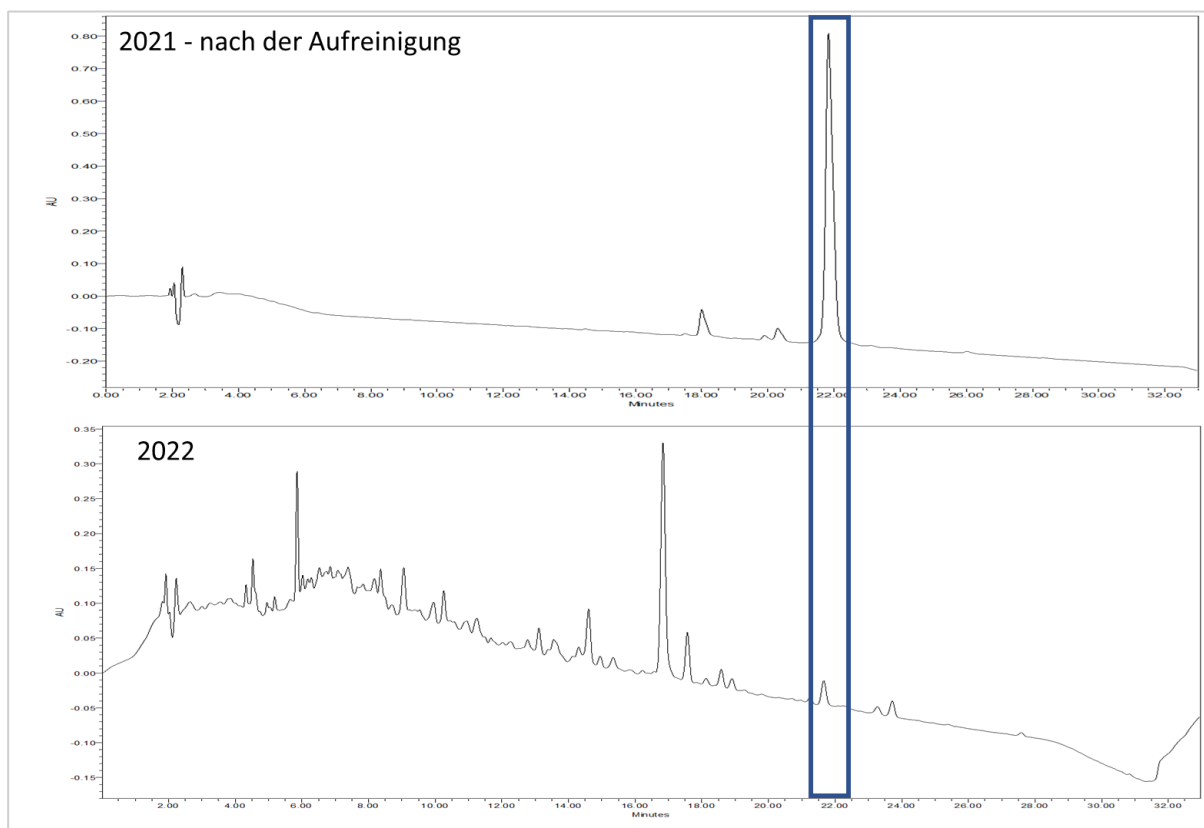


Abbildung 31 Ircinianin Lacton B – Instabilitäten. Der Vergleich der beiden Chromatogramme zeigte eine merkliche Instabilität der Substanz. Oben: Chromatogramm direkt nach der Isolation zur Überprüfung der Reinheit; unten: Chromatogramm nach mehreren Monaten während den Vorbereitungen zur Aufklärung der Stereostruktur.

wurde im Anschluss daran versucht die Konfiguration der jeweiligen Stereozentren zu bestimmen. Aufgrund einer Instabilität der Probe (vgl. hierzu Abbildung 31), konnten keine weiteren experimentellen Methoden zur Bestimmung der räumlichen Struktur des Moleküls herangezogen werden, weswegen, auf Grundlage der NMR-Daten und im Vergleich zu Ircinianin, versucht wurde, den dreidimensionalen Aufbau abzuleiten. Die Konfiguration der Doppelbindung zwischen C-8 und C-10 wurde auf Grundlage der NOE-Kontakte im ^1H - ^1H NOESY Spektrum zwischen H_3 -9 / H-7b, H_3 -9 / H-11 sowie H-7a / H-10, die die räumliche Nachbarschaft und Orientierung im Raum zueinander anzeigten, in Analogie zu Ircinianin (vgl. Abbildung 14 und 32), als *E* bestimmt. Die Konfiguration konnte zudem über die charakteristische Verschiebung der Methylgruppe in Position C-9 (δ_{C} 16.1) im Vergleich zu Literaturwerten belegt werden. Es wurden die für eine *E*-Konfiguration typischen Kohlenstoffverschiebungen von unter 20 ppm gemessen, die hier als Grundlage der Konfigurationsableitung dienten und

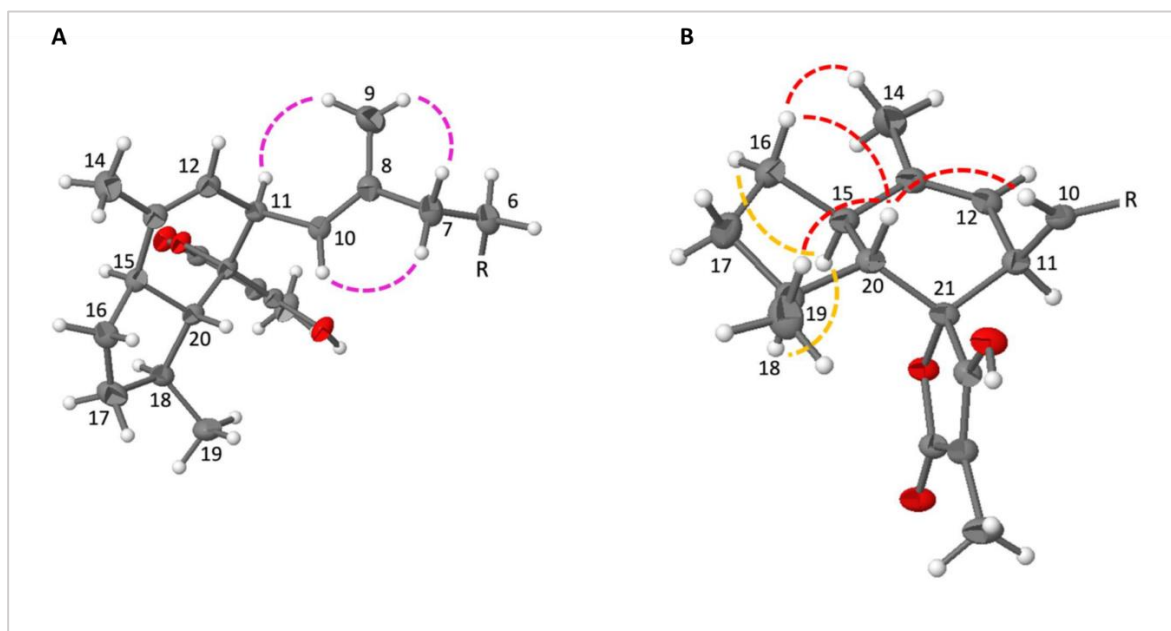


Abbildung 32 Darstellung der dipolaren Kopplungen des ^1H - ^1H NOESY Experiments von Ircinianin Lacton B zur Ableitung der Stereostruktur anhand der räumlichen intermolekularen Distanz. A: NOE-Interaktionen als gestrichelte Linien, die die Doppelbindungsgeometrie der olefinischen Funktion der Alkylkette veranschaulichen. B: NOE-Interaktionen (gestrichelte Linien) zur Ableitung der Konfiguration der chiralen Zentren in Position C-11, C-15, C-18 und C-20. In Rot sind Signale des oberen Molekülteils der Inden-Funktion dargestellt, in Gelb sind die entsprechenden Kopplungen der Unterseite illustriert.

auch zur Zuweisung der Doppelbindungsgeometrie in der einschlägigen Fachliteratur zur Strukturbestimmung von Naturstoffen in anderen Fällen herangezogen wurden.^{126,}

127

Die Konfigurationsbestimmung der verbliebenen drei chiralen Zentren innerhalb des Inden-Ringsystems erfolgte ebenfalls anhand der NOE-Kontakte H-10 / H-20, H₃-19 / H-20, H-20 / H-16b, H-16b / H₃-14, H-16a / H-15 sowie H-15 / H-18, die im Wesentlichen auch den NOE-Kontakten, die sich bei Ircinianin zeigten (vgl. Abbildung 14 und Anhang 9) entsprachen. Die Geometrien wurden als 11*R*^{*}, 15*R*^{*}, 18*S*^{*} und 20*R*^{*} bestimmt. Die Konfiguration von C-21 konnte nicht bestimmt werden, da die Tetronsäure-Einheit naturgemäß nur wenige Wasserstoffatome aufwies und somit für homonukleare ^1H - ^1H NOESY Experimente wenig zugänglich war. Zudem war von der Kristallstruktur des Ircinianins bekannt, dass die Tetronsäure-Einheit zum Inden-Ring räumlich um nahezu 90° verdreht ist und sich somit die Distanzen zu benachbarten Wasserstoffatome vergrößern, was mögliche dipolare Kopplungen zusätzlich erschwerte. Insofern verwunderte es nicht, dass keine NOE-Interaktion nachgewiesen werden konnten, die zur Beschreibung der räumlichen Anordnung der Tetronsäure hätten herangezogen werden können. Die dreidimensionale Struktur von Ircinianin wurde aber mit Hilfe kristallographischer Methoden, asymmetrischer Synthese und CD-Spektroskopie zweifelsfrei bestimmt. Da Ircinianin Lacton B, mit Ausnahme des

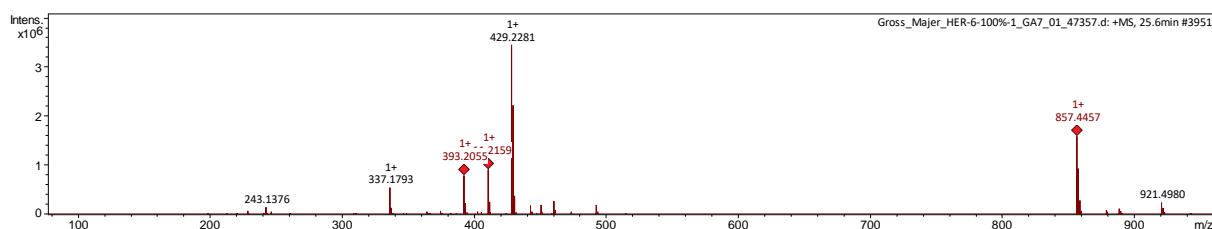
terminalen Heterozyklus, aber dasselbe Kohlenstoffgerüst wie Ircinianin aufwies, die auf NOE-Signalen basierende Konfigurationsableitung der Stereozentren immer dieselben Geometrie wie bei Ircinianin ergab, und die jeweiligen chemischen Verschiebungen für C-21 nahezu identisch waren, durfte auch in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass diese letzte Position in *S*-Konfiguration vorliegt. Auch bei den von Balansa et al. beschriebenen Derivaten wurde die Stereochemie nicht experimentell geprüft, sondern aus biosynthetischen Überlegungen heraus abgeleitet, die davon ausgingen, dass Ircinianin als Stammvater der Verbindungen fungierte und somit aus biosynthetischen Gründen die Derivate die gleiche Stereostruktur tragen müssten.¹¹⁸ Diese Hypothese erwies sich bei der bisherigen Beschreibung der absoluten Konfigurationen der chiralen Zentren bei Ircinianin Lacton B als zutreffend, weswegen das Argument zu den biosynthetischen Gegebenheiten nun auch im Fall von C-21 herangezogen werden konnte und somit zur Folge hatte, dass bei Ircinianin Lacton B dieselbe *S*-Konfiguration wie in Ircinianin vorliegen müsste.

Die Konfiguration des letzten verbliebenen Stereozentrums, das sich in Position C-1 im Lacton-Ring befand, konnte nicht bestimmt werden, da es sich bei Peak II um eine Mischung von C-1 Epimeren handelte. Beide Stereoisomere lagen etwa im Verhältnis von 1:1 vor, und wandelten sich beständig, über die azyklische Form als Zwischenstufe, ineinander um, was zu den jeweiligen Doppelpeaks im ¹³C-Spektrum führte (vgl. Tabelle 11). Die Tatsache, dass sich diese Signaldopplung aber nicht auf das Ringsystem beschränkte, sondern sich vielmehr von C-2 bis C-10 auf das Molekül übertrug, ist auch aus anderen Naturstoffen mit einem α -substituierten γ -Methoxy- γ -lacton bekannt und deutete eine enge räumliche Nachbarschaft dieser Atome zueinander an.¹²³

3.1.5.4. Strukturuntersuchungen von Peak I (Ircinianin Lacton C)

Die massenspektroskopische Untersuchung von Peak I wurde nochmals mit dem Reinstoff wiederholt. Gemäß (+)-HRESIMS wurde die Summenformel der Substanz ($[M+H]^+$, 429.2281; berechnet als 429.2272) als $C_{25}H_{33}O_6$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 wiedergegeben.

A



B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
429.2281	1	C ₂₅ H ₃₃ O ₆	429.2272	-2.3	-0.1	10.0	ok	even	185.1	242.6
429.2281	2	C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O ₂	429.2285	0.8	2.4	15.0	ok	even	200.5	225.2
429.2281	3	C ₂₂ H ₂₅ N ₁₀	429.2258	-5.4	-4.7	16.0	ok	even	214.4	247.7
429.2281	4	C ₂₁ H ₂₉ N ₆ O ₄	429.2245	-8.5	-7.5	11.0	ok	even	227.5	266.3
429.2281	5	C ₁₅ H ₂₉ N ₁₀ O ₅	429.2317	8.3	8.5	7.0	ok	even	256.8	314.9
429.2281	6	C ₁₄ H ₃₃ N ₆ O ₉	429.2304	5.1	5.8	2.0	ok	even	269.7	335.1
429.2281	7	C ₁₁ H ₂₅ N ₁₆ O ₃	429.2290	2.0	1.1	8.0	ok	even	270.5	340.7
429.2281	8	C ₁₀ H ₂₉ N ₁₂ O ₇	429.2277	-1.1	-1.5	3.0	ok	even	283.3	361.5
429.2281	9	C ₇ H ₂₁ N ₂₂ O	429.2263	-4.3	-6.9	9.0	ok	even	284.1	367.6

C

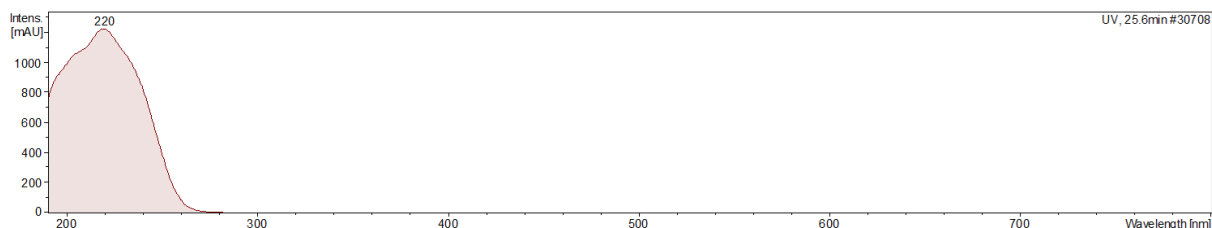


Abbildung 33 Ergebnisse der MS-Analyse von Peak I im Positiv-Modus; A: Massenspektrum; B: Summenformelanalyse; C: extrahiertes UV-Profil der Substanz.

Da diese Masse bisher nicht mit den Terpenen der Ircinianin-Metaboliten assoziiert war, das Fragmentierungsmuster aber diese familiäre Verbindung nahelegte, wurde eine ausführliche Strukturaufklärung mittels 1D / 2D-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Um im ersten Schritt eine Idee über die vorhandene Strukturmodifikation zu erhalten, wurde das ¹H NMR Spektrum von Peak I mit den Spektren von Ircinianin und Ircinianin Lacton A verglichen (siehe Abbildung 34). Der Vergleich der Spektren bestärkte die These der strukturellen Verwandtschaft dieser Verbindungen. Es zeigt sich im Bereich von 0.6-5.5 ppm der charakteristische „Ircinianin-Fingerprint“, der sich beispielsweise durch die vier Methylgruppen (δ_H 0.93 (3H), 1.59 (3H), 1.65 (3H), 1.71 (3H)), dem typischen Dublett vom

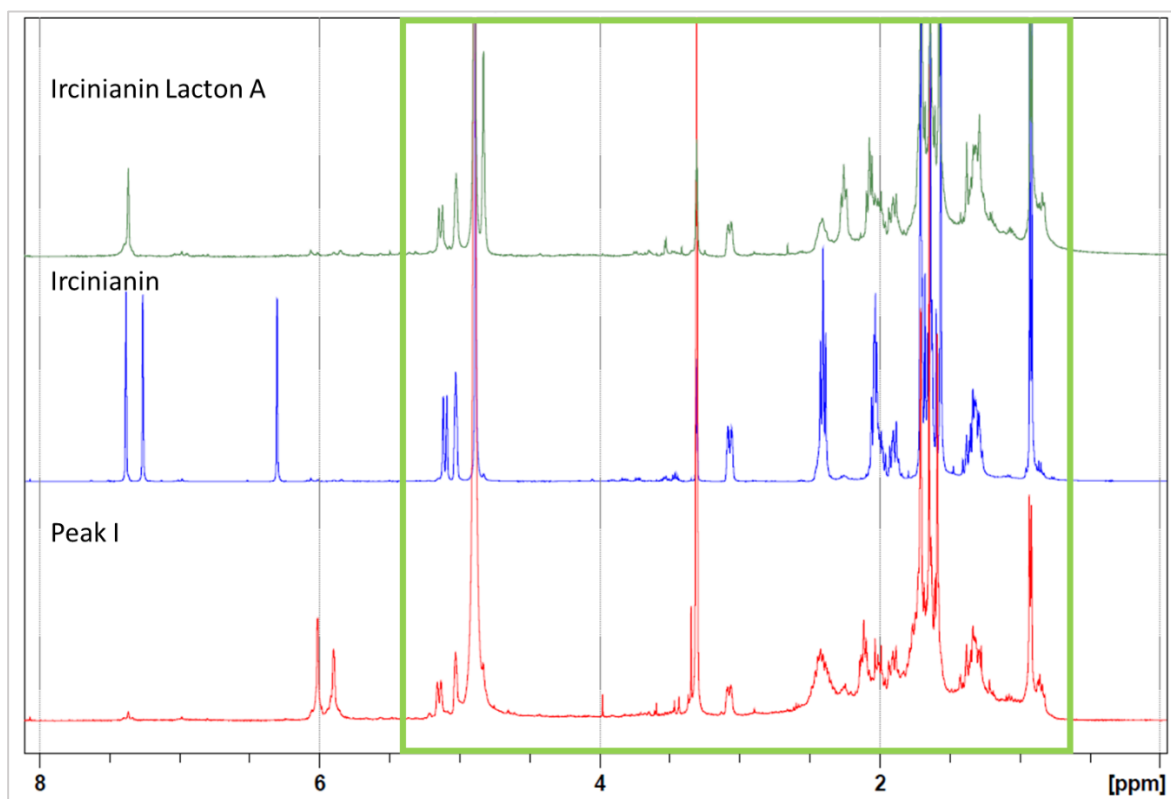


Abbildung 34 Gestaffelte ^1H NMR Spektren (400 MHz) von Ircinianin Lacton A, Ircinianin und Peak I, aufgenommen in $\text{MeOH-}d_4$. Der Vergleich veranschaulicht den „Fingerprint-Bereich“ des Ircinianin-Grundgerüsts zwischen 0.6-5.5 ppm, hervorgehoben durch den grün gehaltenen Rahmen. Die Signale der terminalen Heterozyklen finden sich im Bereich zwischen 5.5-7.5 ppm.

Multiplett bei δ_{H} 3.08, olefinische Signale bei chemischen Verschiebungen um 5 ppm und eine Vielzahl von Methylen-Signalen im Bereich von δ_{H} 1.25-2.50 ppm auszeichnete. Die Vielzahl an charakteristischen Signalen stimmte somit mit dem Strukturgefüge des trizyklischen Spiro-Tetrone-säure-Inden-Motivs sowie der olefinischen Alkylkette der Ircinianin-Metaboliten überein, sodass diese Molekülgestalt als gesichert angesehen werden konnte. Allerdings zeigten sich im Bereich der terminal liegenden Heterozyklen der Seitenkette zwischen 5.5-6.5 ppm zwei Signale (δ_{H} 6.02 und 5.90), die mit den bisherigen Funktionalitäten, nämlich Furan-, Lactam- und Lacton-Substituenten, nicht in Einklang gebracht werden konnten und somit eine neue Variation in diesem Molekülteil andeuteten. Basierend auf einem ausführlichen Vergleich der Wasserstoff- und Kohlenstoffspektren (^{13}C und DEPT 135) zwischen Peak I, Ircinianin und Ircinianin Lacton A, konnte eine hohe Übereinstimmung von Ircinianin Lacton A und Peak I festgestellt werden, wobei auch die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe das wohlbekannte Grundgerüst von Position 5-25 bestätigten. Die Abwesenheit eines Ketogruppen-Signals bei einer Verschiebung von rund 200 ppm (vgl. Abbildung 36), zeigte zudem, dass es sich nicht um die höher

Ergebnisse und Diskussion

oxidierte Form der Spiro-verknüpften Tetransäure handelte, weshalb das klassische Ircinianin-Kernelement auch in diesem Molekül zugrunde gelegt werden konnte.

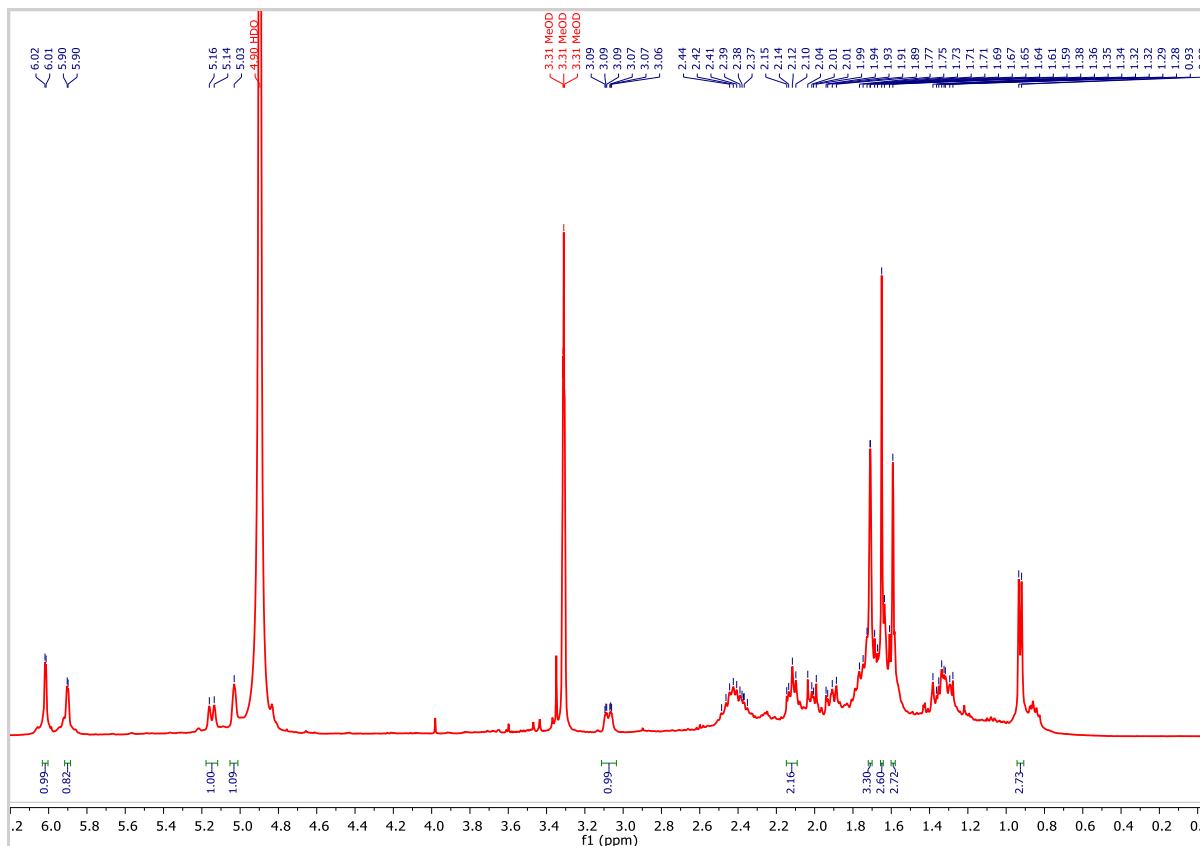


Abbildung 35 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) von Peak I in $\text{MeOH-}d_4$.

Von diesem Element ausgehend, blieb somit eine Restsummenformel von $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_3$ mit drei verbleibenden Doppelbindungsäquivalenten übrig, die den Rest des Moleküls, von Position 5 ausgehend, numerisch beschrieb. Ausgehend von den vier verbleibenden Kohlenstoffen und ihren chemischen Verschiebungen (δ_{C} 173.8 (C), 172.7 (C), 117.9 (CH), 101.1 (CH)) in Verbindung mit den drei verbleibenden Äquivalenten zur Beschreibung ungesättigter Funktionalitäten, wurde vermutet, dass diese Werte klar ein fünf-gliedriges, Sauerstoff-haltiges und olefinisches Ringsystem spektroskopisch beschrieben. Eine Verschiebung einer Methingruppe von δ_{C} 101.1 ist charakteristisch für ein Halbacetal, ein Motiv, das sich oft bei γ -Hydroxy- γ -butenoliden (γ -Hydroxy- γ -lactonen) findet und somit auf einen hydroxylierten, zyklischen Ester hindeutete, der auch mit den Resonanzlagen der verbliebenen drei Kohlenstoffe in Einklang stehen würde.^{101, 123} Dieses Ringsystem setzte sich dementsprechend aus den beiden quartären Kohlenstoffen (δ_{C} 173.8, 172.7), die die Carbonylgruppe des Lactons und den quartären sp^2 -Kohlenstoff in Position 2 repräsentierten, dem sp^2 -Methinkohlenstoff (δ_{C} 117.9) und dem Halbacetal in Position 1 zusammen. Der innerzyklische Ester

Ergebnisse und Diskussion

wurden durch eine 3J -Kopplung von H-1 zu C-4 im ^1H - ^{13}C HMBC Spektrum (vgl. Abbildung 37) belegt und das Lacton somit bestätigt. Die Auswertung des ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY Spektrums zeigte zudem, dass die zwei Wasserstoffe des Ringsys-

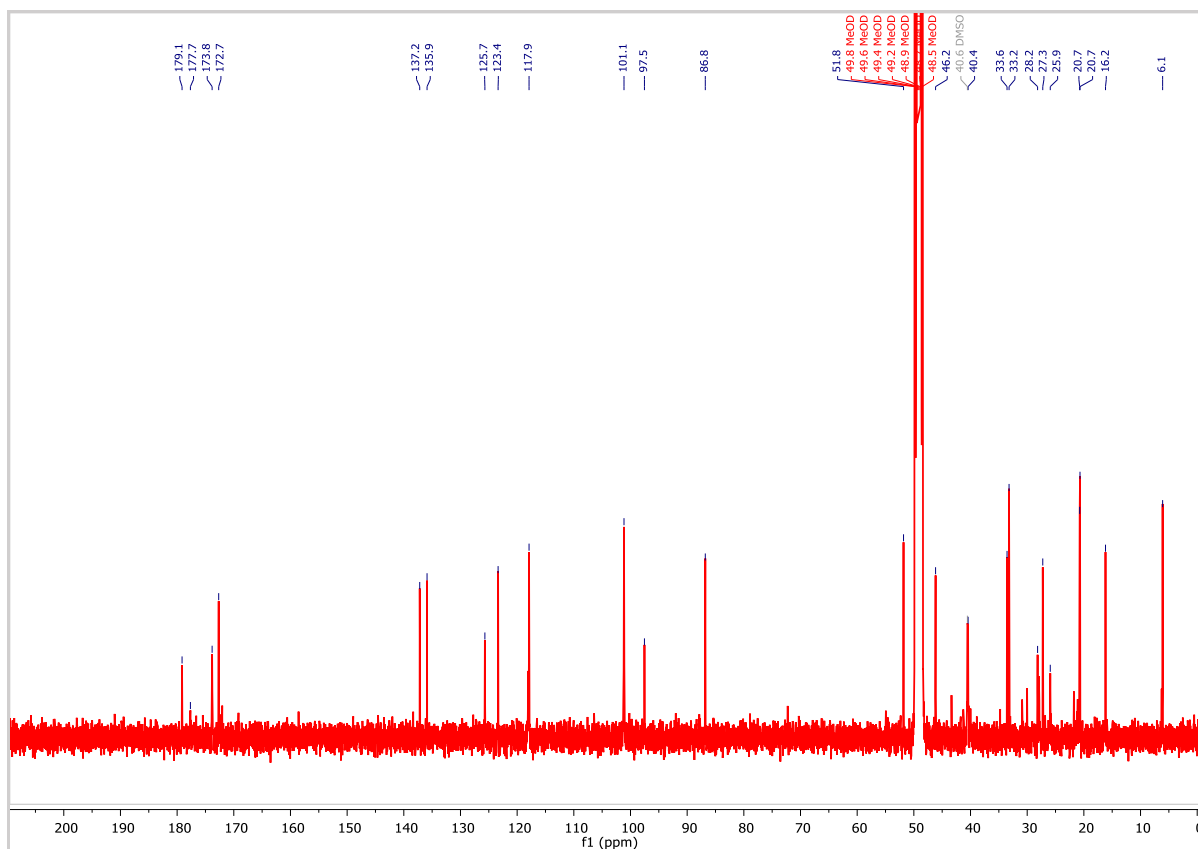


Abbildung 36 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz) von Subfraktion I C in $\text{MeOH-}d_4$.

tems (δ_{H} 6.02 und 5.90) nicht miteinander in Wechselwirkung traten und somit nicht innerhalb eines

gemeinsamen

Spinsystems

liegen

konnten, aber auf Basis

der Multipllett-Analyse

des ^1H NMR Spektrums

miteinander koppelten

(allylische $^4J_{\text{H,H}}$ 2.3 Hz)¹²⁸, was somit indirekt die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 belegte. Diese Beobachtungen, zusammen mit den Korrelationen von H₂-5 zu C-1, C-2 und C-3 im ^1H - ^{13}C HMBC Spektrum, belegten, dass beide Kohlenstoffe nicht zusammen ein gemeinsames Spinsystem aufbauten, sondern durch die jeweilige Nachbarschaft zu C-2 voneinander getrennt waren. Die Verknüpfung von C-2 zu C-5 konnte außerdem erklären, warum C-2 eine so ungewöhnlich hohe Tieffeld-

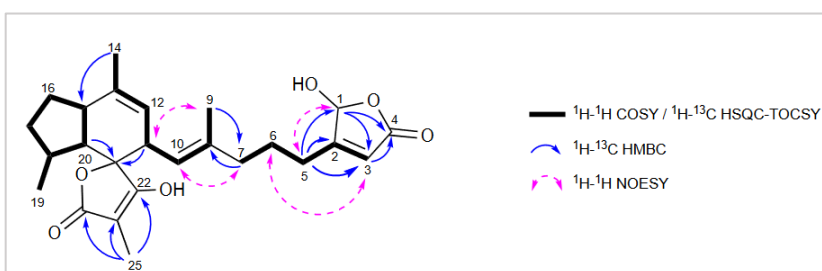


Abbildung 37 2D NMR-Schlüsselkorrelationen von Peak I.

Ergebnisse und Diskussion

verschobene chemische Verschiebung von 172.7 ppm aufwies. Die im ^1H - ^{13}C HMBC Spektrum beobachteten Korrelationen von H-1 zu C-3 und H-3 zu C-4 komplettierten die Untersuchungen zum Aufbau dieses Heteroringsystems und bestätigten den Aufbau eines β -substituierten γ -Hydroxy- γ -lactons, was im Übrigen auch durch Vergleiche mit Literaturwerten von Naturstoffen mit demselben Motiv untermauert wurde.^{101, 125, 129} Tabelle 12 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 12 ^1H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) Daten von Ircinianin Lacton C. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_4 . Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

Ircinianin Lacton C		
Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , Typus ^A
1	6.02, d (2.3)	101.1, CH
2	-	172.7, C
3	5.90, d (2.3)	117.9, CH
4	-	173.8, C
5	2.43, m ^F	28.2, CH ₂
6	1.76, m ^E	25.9, CH ₂
7	2.11, m	40.4, CH ₂
8	-	135.9, C
9	1.59, m	16.2, CH ₃
10	5.15, d (10.3)	125.7, CH
11	3.08, dm (10.1)	48.7, CH ^C
12	5.03, m	123.4, CH
13	-	137.2, C
14	1.71, m	20.68, CH ₃ ^D
15	2.42, m ^F	46.2, CH
16	a. 1.89, m b. 1.34, m ^G	27.3, CH ₂
17	a. 2.02, m b. 1.31, m ^G	33.6, CH ₂
18	1.64, m ^E	33.2, CH
19	0.93, d (6.2)	20.74, CH ₃ ^D
20	1.62, m ^E	51.8, CH
21	-	86.8, C
22	-	179.1, C ^B
23	-	97.5, C
24	-	177.7, C ^B
25	1.65, br s	6.1, CH ₃

^A Substitutionsgrade wurden aus den Ergebnissen des DEPT 135 und des ^1H - ^{13}C edt. HSQC NMR Experiments abgeleitet.

^{B/D} Zuordnungen innerhalb einer Spalte sind möglicherweise vertauscht.

^C Überlagerung durch den Lösemittelpeak.

^{F/G} Überlagerung von Signalen innerhalb einer Spalte.

^E Von weiteren Signalen überlagert.

Wie bei Ircinianin Lacton B dargelegt, bestätigte die Verschiebung von δ_{C} 16.2 der Methylgruppe von C-9, zusammen mit den in Abbildung 37 dargelegten ^1H - ^1H NOESY Korrelationen, die Geometrie der Doppelbindung zwischen C-8 und C-10 als *E*-Konfiguration. Analog zur Ableitung der Konfigurationen der Stereochemie der chiralen Kohlenstoffe bei Ircinianin Lacton B, wurden auch in diesem Fall die entsprechenden

dipolaren Kopplungen im ^1H - ^1H NOESY Spektrum herangezogen und die Konfiguration auch auf Grundlage von biosynthetischen Überlegungen (vgl. hierzu auch Kapitel 3.1.6. *Biosynthetische Betrachtungen*) als $11R^*$, $15R^*$, $18S^*$, $20R^*$ und $21S^*$ bestimmt.

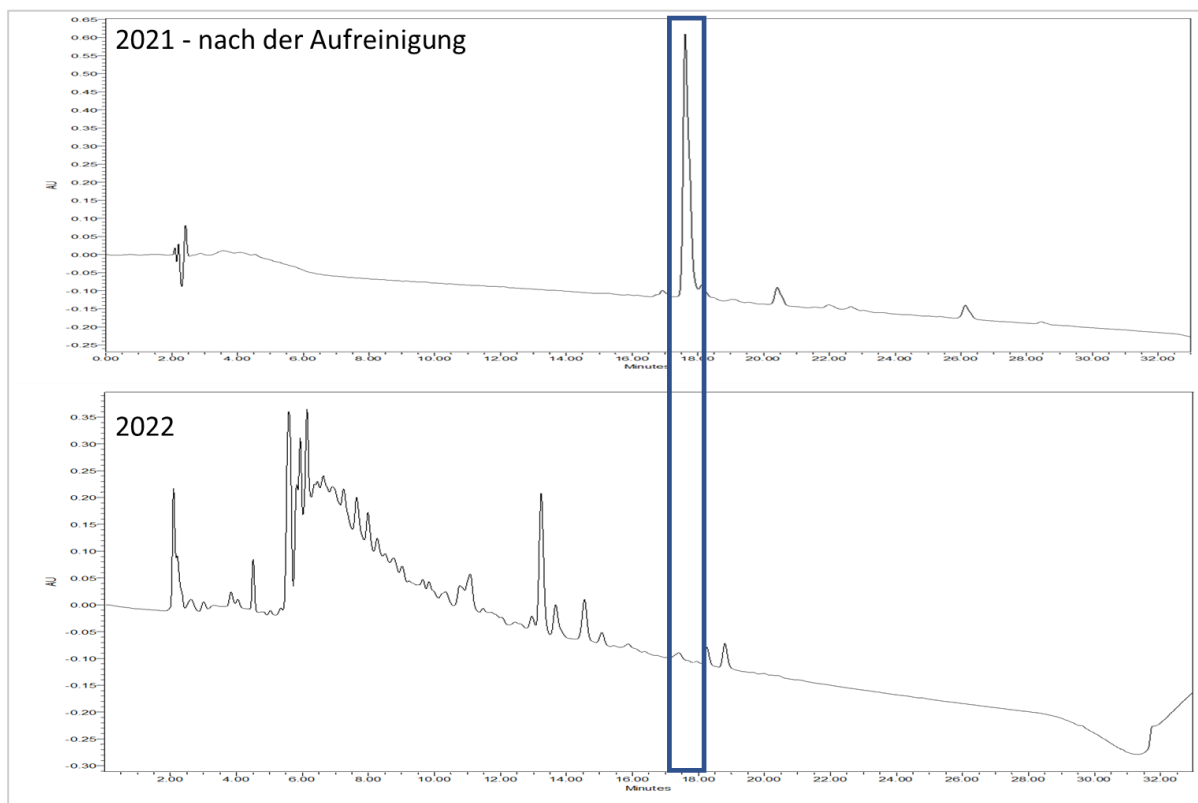


Abbildung 38 Ircinianin Lacton C – Instabilitäten. Der Vergleich der beiden Chromatogramme zeigte eine merkliche Instabilität der Substanz. Oben: Chromatogramm direkt nach der Isolation zur Überprüfung der Reinheit; unten: Chromatogramm nach mehreren Monaten zur Vorbereitung der Analyse der Stereozentren.

Die Konfiguration des neuen Stereozentrums bei C-1 konnte aufgrund der chemischen Instabilität, die anhand zweier Chromatogramme in Abbildung 38 veranschaulicht wird, nicht weiter auf experimenteller Grundlage ermittelt werden. Aus diesem Grund wurden *in silico*-Methoden angewandt, um, auf Grundlage von quantenmechanischen Berechnungen, Vorhersagen zu den jeweiligen ^1H und ^{13}C Verschiebungen des $1S$ - bzw. $1R$ -Epimers zu machen. Hierzu wurden, auf Basis der in Abbildung 16 dargelegten Kristallstruktur, die räumlichen Gegebenheiten der beiden Epimere analysiert und eine Konformationsuntersuchung auf Basis stochastischer Berechnungen (vom Arbeitskreis von Herrn Professor Böckler, Eberhard Karls Universität Tübingen) durchgeführt und graphisch ausgearbeitet. Die Konformationen der beiden Stereoisomere mit der geringsten Energie sind in Abbildung 39 A dargestellt. Beide Epimere bilden dabei eine Wasserstoffbrücke, ausgehend vom

Wasserstoffatom der Tetronsäure-Hydroxygruppen (C-22) zum Sauerstoff der OH-Gruppe in Position 1 des Lactonrings, aus, wobei die Abstände dieser beiden Atomgruppen bei 2.7 / 2.6 Å im 1*S*- bzw. 1*R*-Epimer liegen. Um diese spezielle, für die

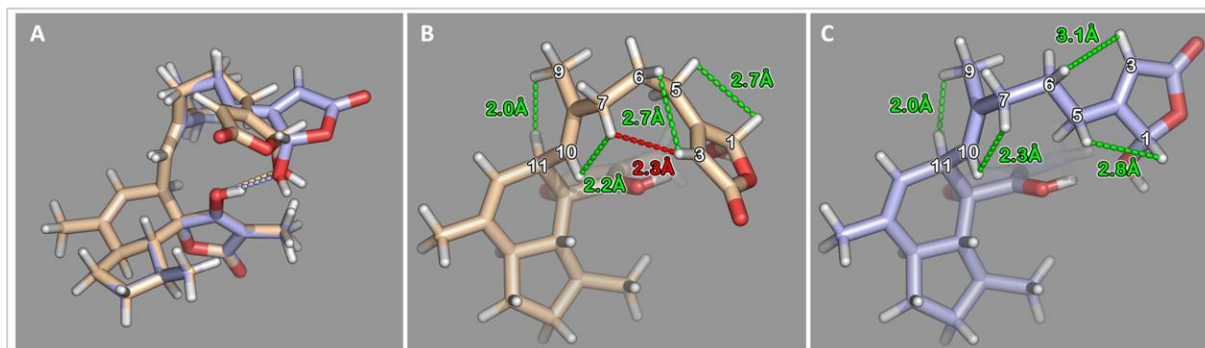


Abbildung 39 A: Überlagerung der räumlichen Darstellung des 1*S*- (violett) und 1*R*-Epimers (braun) von Ircinianin Lacton C in der jeweiligen Konformation mit der niedrigsten Energie. Gestrichelte Linien deuten die Wasserstoffbrücke zwischen OH-1 und OH-22 an. B: 1*R*-Epimer von Ircinianin Lacton C. Die gestrichelten Linien deuten die Abstände zwischen den jeweiligen Atomgruppen an. In Grün sind die Raumkopplungen dargestellt, die auch experimentell im ¹H-¹H NOESY Spektrum nachgewiesen werden konnten. In Rot sind NOE-Kontakte hervorgehoben, die experimentell nicht gefunden wurden. C: 1*S*-Epimer von Ircinianin Lacton C. Grün-gestrichelte Linie illustrieren Raumkopplungen, die auch im ¹H-¹H NOESY Spektrum gefunden wurden.

Ausbildung für Wasserstoffbrücken notwendige Geometrie zu erreichen, sind die Lactonringe beider Epimere in gegensätzlicher Position im Raum angeordnet. Basierend auf diesen Berechnungen wurden die chemischen Verschiebungen für die beiden Isomere bestimmt, wobei für beide Epimere Werte erzielt wurden, die in guter Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Verschiebungen waren. Dementsprechend konnte auf Basis dieser Berechnungen die Konfiguration des chiralen Zentrums in Position 1 nicht bestimmt werden. Aber aufgrund der verschiedenen räumlichen Orientierungen bzw. Positionierungen der Alkylketten und der Lage des terminalen Butenolids zum restlichen Molekülgerüst, konnten auf dieser Grundlage verschiedene Distanzen zwischen den jeweiligen Wasserstoffatomen bestimmt und mit den im ¹H-¹H NOESY Spektrum (vgl. Abbildung 40) detektierten Signalen verglichen werden. Eine Vielzahl von beobachteten NOE-Signalen war sowohl mit dem 1*R*- als mit dem 1*S*-Epimer in Einklang zu bringen, allerdings konnte die dipolare Kopplung zwischen H-3 und H-7 beim 1*R*-Epimer, die aufgrund der nahen räumlichen Distanz der beiden Wasserstoffatome zu erwarten gewesen wäre, nicht im ¹H-¹H NOESY Spektrum nachgewiesen werden. Eine entsprechende Interaktion war im *S*-Epimer allerdings nicht zu erwarten. Der Vergleich der experimentell gewonnen Daten mit der quantenmechanischen Konformationsbeschreibung der beiden Stereoisomere, legte somit nahe, dass das betrachtete chirale Zentrum in der *S*-

Konfiguration vorlag. Als dritte Vertreter der Lacton-Klasse innerhalb der Ircinianin-Familie, wurde das Molekül somit als Ircinianin Lacton C bezeichnet.

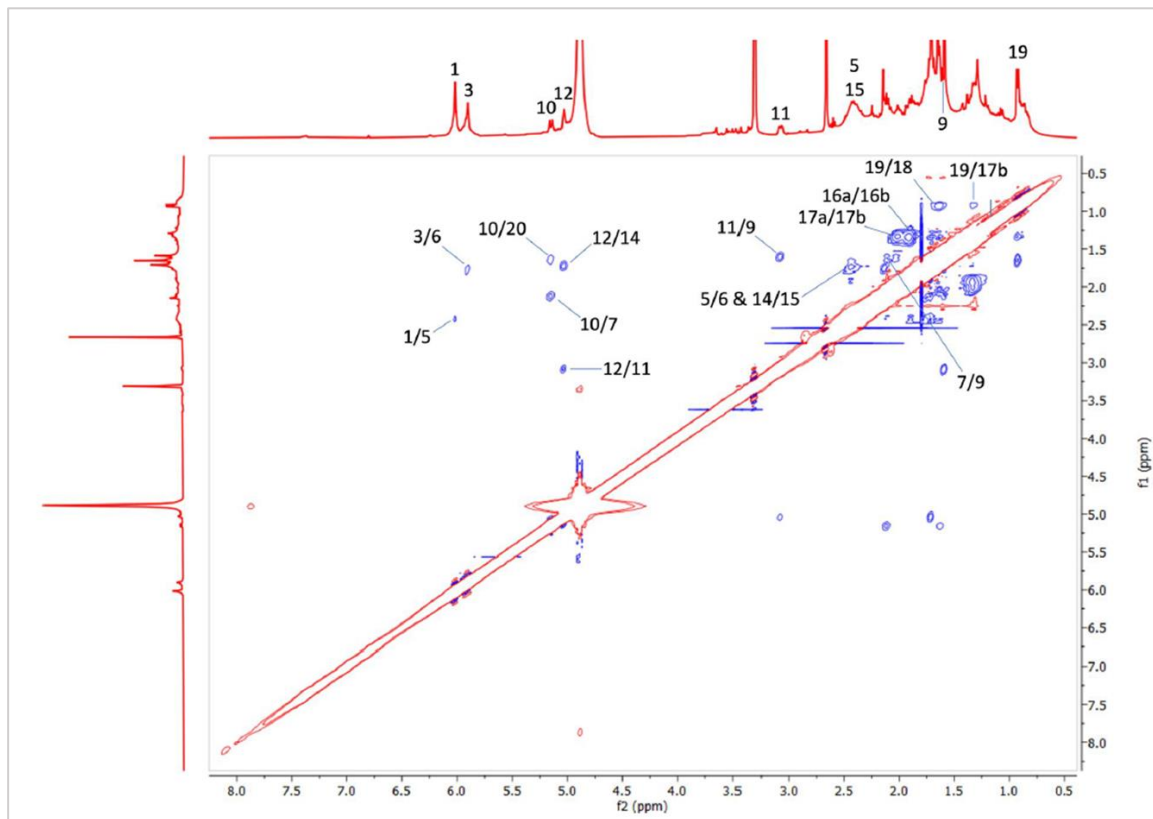


Abbildung 40 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (400 MHz) von Ircinianin Lacton C. NOE-Signale sind mit den beteiligten Kopplungspartnern bezeichnet.

3.1.6. Biosynthetische Betrachtungen

Die Strukturaufklärung niedermolekulare Verbindungen ist ein komplexes Unterfangen und basiert im Regelfall auf der Anwendung spektroskopischer Techniken. Die Interpretation dieser experimentellen Daten birgt aber auch immer die Gefahr, dass diese in ihrer Komplexität falsch verstanden, also missinterpretiert, werden können, was gelegentlich dazu führt, dass strukturellen Beschreibungen chemischer Verbindungen postuliert (und publiziert) werden, die mit den realen Gegebenheiten nicht übereinstimmen.¹³⁰ Im Kontext der Naturstoffchemie ist die Bandbreite dieser Interpretationsfehler dabei weit gefächert und reicht von der Beschreibung chemischen Absurditäten, die so kaum möglich sind, bis hin zu Falschbeschreibungen, die der Komplexität des jeweiligen Moleküls geschuldet sind und ohne synthetisch-chemische Ergänzungen so nie hätten geklärt werden können.¹³⁰⁻¹³² Ergänzt werden diese „handwerklichen Fehler“ noch durch Artefaktbildungen, die aufgrund der chemischen

Aufarbeitung der natürlichen Proben, vorherrschenden Lagerungsbedingungen oder strukturellen Instabilitäten dazu führen, dass Moleküle entstehen, die mit den „realen“ Naturstoffen nicht mehr übereinstimmen.¹³³⁻¹³⁵ Das heißt, die Quellen für mögliche Fehler, die zur Veröffentlichung falscher Strukturen führen, sind reichhaltig, weswegen in der Naturstoffanalytik der allgemeine Konsens gilt, die molekulare Architektur der jeweiligen chemische Verbindung durch eine Vielzahl verschiedenster Ergebnisse und Überlegungen abzusichern und sich nicht nur auf spektroskopische Daten alleine zu verlassen, wobei insbesondere auch (wann immer möglich genom-basierte) biosynthetische Betrachtungen eine wichtige Rolle spielen (sollten).^{130, 136, 137}

Das Grundgerüst der Ircinianin-Familie, mit seinem polyzyklischen Spiro-Tetrone-säure-Inden Aufbau, ist in der Sesterterpen-Klasse nahezu einzigartig und wird durch eine Fülle verschiedenster terminaler Heterozyklen ergänzt. Aber zu den zugrunde liegenden Synthesewegen, wie diese im Detail zusammenhängen könnten und ob diese Metabolitenvielfalt wirklich mit dem Biosynthesepotential eines Schwamms (bzw. symbiotisch assoziierter Lebensformen) in Übereinstimmung gebracht werden könnte, fand sich bis dato in der Literatur keine ausführliche Beschreibung und ließ somit auch immer noch die Möglichkeit zu, dass es sich bei manchen Derivaten um Artefakte handeln könnte. Aus diesem Grund wurde, ausgehend von einer detaillierten Literaturrecherche, ein potenzieller Biosynthese-Stammbaum entwickelt. Die Übersicht ist in Abbildung 41 dargestellt.

Bereits bei der Erstbeschreibung von Ircinianin waren verschiedene lineare Sesterterpene aus *Ircinia* spp. bekannt und aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde postuliert, dass sich das trizyklische Ircinianin-System aus einem solchen linearen Vorläufermolekül ableiten könnte.⁹⁵ Takeda et al. konnten anhand einer biomimetischen Synthese, die diesem Prinzip folgte, zeigen, dass sich die für das Ringsystem benötigten zusätzlichen Kohlenstoffverknüpfungen mittels einer intramolekularen Diels-Alder Reaktion ausbilden konnten, wobei vermutet wurde, dass im Schwamm selbst diese Reaktion durch Enzym- bzw. thermische Katalyse begünstigt wird.^{92, 138}

Ergebnisse und Diskussion

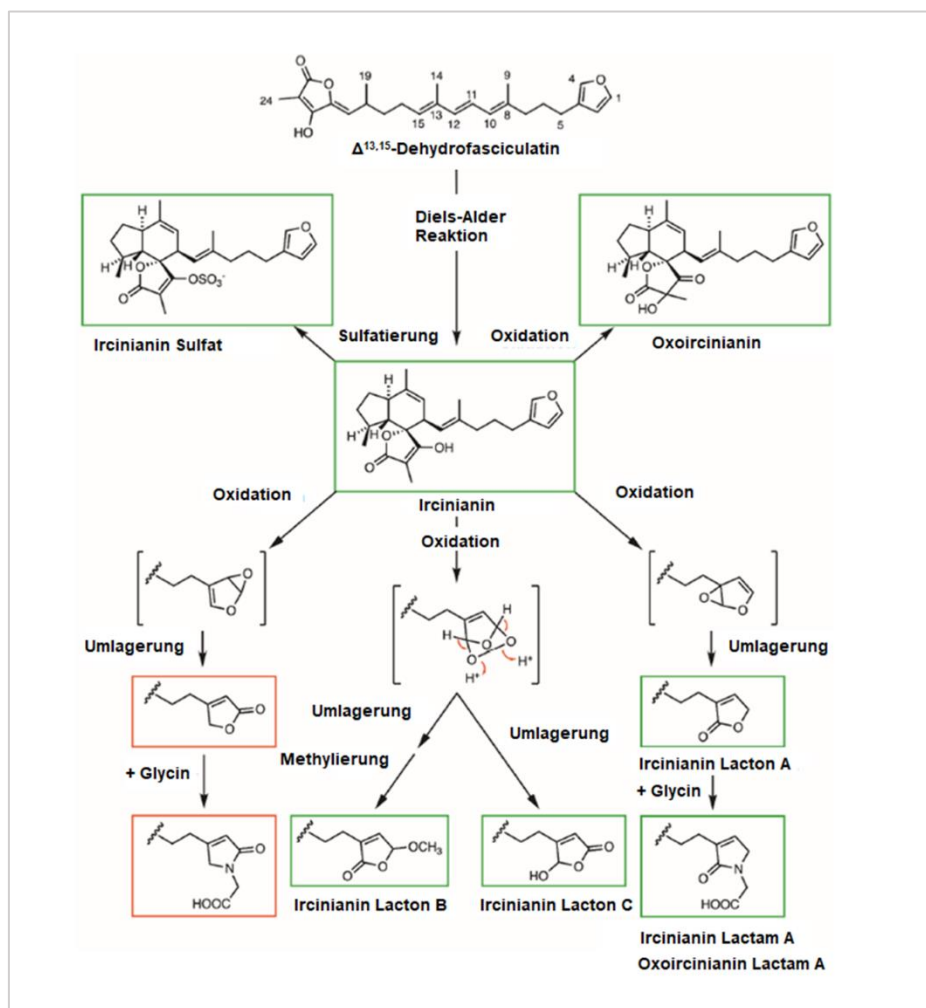


Abbildung 41 Biosynthese-Stammbaum der Ircinianin-Familie. Vorgeschlagene biochemische Zusammenhänge zum Aufbau der jeweiligen Derivate. Grüne Rahmen deuten bekannte (isolierte) Derivate an; rote Rahmen geben bislang lediglich hypothetische (unbeschriebene) Derivate wieder, die zum jetzigen Zeitpunkt allein aufgrund biosynthetischer Zusammenhänge vorgeschlagen werden.

Mit der Beschreibung der weiteren Terpen-Derivate im Jahr 2013, gingen Capon und seine Mitarbeiter davon aus, dass Ircinianin die Stammverbindung dieser Klasse darstellt und sich die weiteren terminalen Systeme aus dem Furan-Ring des Ircinianin entwickeln, wobei keine detaillierten Prinzipien zu deren Darstellung oder sonstige Biosynthesezusammenhänge dargelegt wurden.¹¹⁸ Anhand gängiger Syntheseprinzipien von Sesterterpenen konnte aber abgeleitet werden, dass partielle Oxidationsreaktionen notwendig sind, um die intramolekularen Zyklisierungen und nachfolgenden Umlagerungsreaktionen zu ermöglichen, die für die Ausbildung der verschiedenen terminalen Ringsysteme erforderlich sind.¹³⁹ D.h. die biosynthetische Verwandtschaft dieser α,β -substituierten Furan-, Lactam- und Lacton-Funktionalitäten der Seitenkette sowie deren jeweilige Umwandlung ineinander, ließ sich auch so logisch nachvollziehen und mit dem metabolischen Potential des Produzenten in

Einklang bringen. Die Gattung *Ircinia* ist generell dafür bekannt, solche Ringsysteme bei Sesterterpenen auszubilden, was durch eine Vielzahl weiterer Naturstoffe eindrucksvoll belegt wurde (vgl. 1.2.3. *Naturstoffe von Schwämmen der Gattung Ircinia*). Die Ausarbeitung zu den detaillierten mechanistischen Zusammenhängen konnten dabei von Prasad et al., die diese bei der Beschreibung von Ircinialacton A, einem linearen Furano-Tetrone-Sesterterpen, das aus einem australischen Schwamm isoliert wurde, vorschlugen, übernommen werden.¹⁴⁰ Ausgehend von einer Mono-Epoxidierung der Furan-Funktion aufgrund alternierender Oxidationsreaktionen, nachfolgenden Umlagerungs- und ggf. daran anschließenden nukleophilen Additionsreaktionen, könnten so die verschiedenen α,β ungesättigten Lactone und Lactame gebildet werden.

Allerdings reichte die theoretische Beschreibung dieser Synthesewege noch nicht aus, um die Darstellung einer β -substituierten γ -Hydroxy- γ -butenolid Verbindung, wie etwa Ircinianin Lacton C, zu erläutern. Deswegen wurde eine weitere Literatursuche zu möglichen Biosynthesewegen mariner Terpene angeschlossen, die sich explizit mit solchen Funktionalitäten beschäftigte. Eine detaillierte Ausarbeitung zu den (bio)chemischen Zusammenhängen fand sich hierbei bei der von Khushi et al. vorgestellten Analyse des metabolischen Profils eines Schwammes der Gattung *Cacospongia*, die zur Beschreibung einer neuen Hydroxy-butenolid-Sesterterpen-Familie, welche als Cacolide bezeichnet wurde, führte.¹²⁵ Auch hier wurde von einem β -substituierten Furan als Vorläufermolekül ausgegangen, aus dem, über mehrere Oxidations- und Umlagerungsreaktionen, die verschiedenen terminalen Ringsysteme entwickelt werden konnten. Insofern darf auch für die Ircinianin-Metaboliten von einem ähnlichen biosynthetischen Zusammenhang ausgegangen werden, da die betrachteten Positionen und Funktionalitäten in den jeweiligen betrachteten Systemen als (bio)chemisch gleichwertig angesehen werden können und eine logische und plausible Entwicklung der jeweiligen chemischen Entitäten geben. Somit konnte auch für Ircinianin Lacton B und C eine schlüssige biochemische Darstellung, ausgehend von Ircinianin, entwickelt werden, was diese als (zumindest theoretisch mögliche) reale Naturstoffe ausweist und die Strukturbestimmung auch von einem biosynthetischen Standpunkt aus nochmals bekräftigte. Zudem konnten durch die Entwicklung des metabolischen Stammbaums der Terpen-Familie auch noch weitere mögliche Mitglieder vorhersagt werden, die zudem die gleichen Summenformeln wie bereits publizierte Derivate aufweisen.

3.2. Untersuchungen zur Bioaktivität

3.2.1. Bioaktivitätstestungen von Ircinianin

Marine Naturstoffe gelten als reichhaltige Quelle verschiedenster Substanzen, die sich im Besonderen durch eine nahezu einmalige Vielfalt des chemischen Strukturraums auszeichnen. Dieser Strukturraum eröffnet häufig einmalige biologische Funktion, weshalb marine Naturstoffe weiterhin als wichtige Quelle für neue Leitstrukturen und Arzneistoffe gelten.^{45, 50}

Das Kohlenstoffgrundgerüst von Ircinianin wurde von Hofheinz und Schönholzer 1977 zum ersten Mal beschrieben und ist somit seit mehr als 45 Jahren bekannt, eine relevante Bioaktivität dieser Molekülklasse als Glycin-Rezeptor-Modulatoren konnte allerdings erst im Jahr 2013 beschrieben werden.^{95, 118} Das Naturstoffe von *Ircinia* spp. aber oft Bioaktivitäten aufweisen, zeigte sich anhand der Fachliteratur, wobei insbesondere zytotoxische Aktivitäten häufig beschrieben wurden.^{78, 94, 109, 111, 114, 141-144} Ausgehend von dieser Beobachtung wurde deshalb eine breite Testung auf antitumorale Effekte hin initiiert.

Im Kontext der zunehmenden Resistenzen gegenüber den Standardantibiotika und der damit vorhandenen Notwendigkeit aktiv nach neuen bioaktiven Verbindungen mit anderen Wirkmechanismen oder Zielstrukturen zu suchen, eröffnete auch bei dieser, zwar seit Jahrzehnten bekannten, aber in diesem Kontext noch unzureichend untersuchten, Terpen-Klasse die Möglichkeit, speziell in diesem Bereich mögliche Aktivitätsprofile aufzudecken.¹⁴⁵ Die Problematik der Infektionskrankheiten beschränkt sich aber nicht nur auf bakterielle Erreger, weswegen ein breites antimikrobielles Screening gegenüber einer Vielzahl von Erregern verschiedenster Organismen von Bakterien, Viren und Protozoen gestartet wurde. Die Zusammensetzung der jeweiligen Testpanel orientierte sich dabei an der Fachliteratur, da gerade auch bei den aus *Ircinia* spp. isolierten (Terpen-)Metaboliten oftmals Aktivitäten in diesem biomedizinisch hochrelevanten Bereich nachgewiesen werden konnten.^{93, 103, 105, 108, 146, 147}

Diese, im Kontext der biomedizinische Forschung angesiedelten, Testserien wurde durch eine dritte, eher ökologisch orientierte, Testreihe ergänzt, die insbesondere das marine biofouling, also die, in dem hier dargestellten Kontext, zunächst beständige oder zeitlich begrenzte Anhaftung / Besiedlung und ggf. nachfolgende Überwucherung von Oberflächenstrukturen eines Schwammes mit anderen Meeresorganismen, in den

Fokus nahm.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Als sessile Lebensform haben Schwämme zur Abwehr dieser Epibionten eine Abwehrstrategie entwickelt, die in der Produktion von bioaktiven Substanzen gipfelte, die, im Sinne einer chemischen Abwehr, eine Besiedlung mit solchen Lebensformen unterbinden.^{24, 151, 152} Die Aktivitätsbeschreibung solcher Verbindungen wird unter dem Oberbegriff des Antifouling zusammengefasst und Testungen, die diese Form der biologisch-ökologischen Funktion untersuchen, werden als Antifouling-Assays bezeichnet.¹⁵⁰ Aufgrund dieser wichtigen Funktion, die für das dauerhafte Überleben einer standorttreuen Spezies von höchster Bedeutung ist, verwundert es nicht, dass das chemische Spektrum von Sekundärmetaboliten, die eine so geartete biologische Aktivität aufweisen, nahezu unerschöpflich ist und sich in nahezu allen biosynthetischen Klassen der Naturstoffe findet, wobei insbesondere auch Terpene als besonders prominenter Vertreter dieser Klasse gelten.^{148, 151, 153} Aufgrund des hohen Gehalts an Ircinianin innerhalb der verschiedenen Fraktionen, lag auch eine ökologische Funktion dieses Moleküls nahe. Aus diversen Untersuchungen, die die Zusammensetzung des Naturstoffmetabolitenprofils bei *Ircinia* spp., im Hinblick auf die biologische Relevanz, untersuchten, ist bekannt, dass, zumindest auf der Ebene eines Vielstoffgemisches, auch diese Gattung potente Antifouling-Substanzen bildet, wobei Furan- und Tetrensäure-haltige Sesterterpene als mögliche Protektor-Moleküle andiskutiert wurden.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Aber auch Butenolide aus natürlichen und synthetischen Quellen sind für solche Aktivitäten bekannt, weswegen Ircinianin als besonders privilegierte Struktur für solche Testungen angesehen werden konnte.¹⁵⁷⁻

159

3.2.1.1. Antibakterielle Aktivität

Die Testungen wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Professor Brötz-Oesterhelt, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt.

Der antibakterielle Effekt von Ircinianin wurde gegenüber einem Testpanel, das neben klassischen Vertretern der „ESKAPE“-Linie¹⁶⁰ – (Krankenhaus)Keime, die oft Multiresistenzen aufweisen und sich aus *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter*-Spezies zusammensetzen – auch ein *Mykobakterium* sowie einen *Bacillus*- und *E. coli* Stamm beinhaltet. Getestet wurden, wie in Tabelle 13 dargestellt,

Ergebnisse und Diskussion

verschiedene Konzentrationen einer Ircinianin-Lösung, allerdings konnte selbst bei der höchsten Konzentration keine Aktivität nachgewiesen werden (MHK >32 µg/ml).

Tabelle 13 Ergebnisse der antibakteriellen Aktivität von Ircinianin.

Antibakterielle Aktivität	
Stamm	MHK [µg/ml]
<i>E. faecium</i> BM4147-1	>32
<i>S. aureus</i> ATCC29213	>32
<i>K. pneumoniae</i> ATCC12657	>32
<i>A. baumannii</i> 09987	>32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>32
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	>32
<i>E. coli</i> ATCC25922	>32
<i>B. subtilis</i> 168	>32
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	>32

3.2.1.2. Antivirale Aktivität

Die Testungen wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Schindler, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt.

Die antiviralen Eigenschaften von Ircinianin wurden gegenüber zwei viralen Erregern, dem Humanen Cytomegalivirus (HCMV) und dem Severen Acute Respiratory Syndrom Corona Virus Type 2 (SARS-CoV-2), untersucht. Dazu wurden Zellen mit einer Ircinianin-Lösung (10 µM) vorbehandelt und im Anschluss mit HCMV- bzw. SARS-CoV-2 Reporter-Viren, die fluoreszierende Proteine als Infektionsmarker exprimieren, infiziert. Die Infektion wurde dann anhand dieser fluoreszierenden Proteinen überprüft, wozu die Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie, nach definierten Zeitpunkten, in einem automatisierten Prozess auf eine Infektion hin untersucht wurden. Hierbei wurden die Zellen jeweils gezählt und die Zahl der infizierten Zellen bestimmt. Eine Übersicht hierzu gibt Abbildung 42. Innerhalb dieses Testsystems konnten auch bei der höchsten untersuchten Konzentration (10 µM) keine antiviralen Effekte, im Sinne einer Inhibition der Infektion, festgestellt werden.

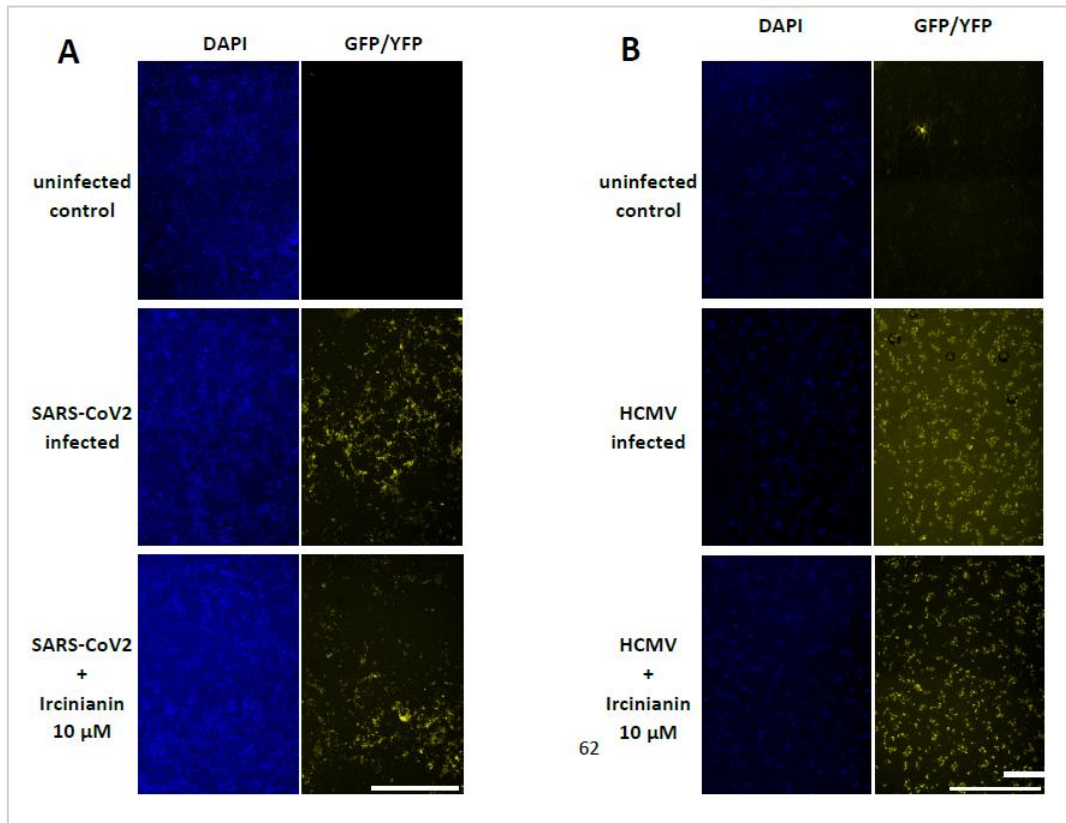


Abbildung 42 Antivirale Aktivität von Ircinianin gegen SARS-CoV-2 (A) und HCMV (B). Caco2 Zellen / humane Fibroblasten wurden mit einer Ircinianin-Lösung (10 µM) vorbehandelt und im Anschluss daran mit HCMV bzw. SARS-CoV-2 infiziert. Um die einzelnen Zellen sichtbar zu machen, wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Innerhalb der GFP / YFP Reihe ist die Infektion durch die Expression von mNeonGreen (SARS-CoV-2) oder GFP (HCMV) mit Hilfe des Viral reporter system visualisiert, was die Quantifizierung des Infektionslevels ermöglichte. Die Bilder wurden mit einem Cytation3 multiplate reader aufgenommen und mit der ImageJ Software koloriert. Der Maßstabsbalken gibt 1 mm an.

3.2.1.3. Antiprotozoische Aktivität

Die Testungen wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil, durchgeführt.

Um die antiprotozoischen Eigenschaften von Ircinianin zu testen, wurde ein *in vitro* Assay durchgeführt, wobei als Testorganismen *P. falciparum*, *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, und *L. donovani* eingesetzt wurden. Hierbei konnte eine moderate Aktivität von Ircinianin gegenüber *P. falciparum* (IC₅₀ 25.4 µM) und *L. donovani* (IC₅₀ 16.6 µM) nachgewiesen werden. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Die IC₅₀-Werte von *T. cruzi* und *T. brucei rhodesiense* überschreiten den Schwellenwert von 80 µM, der als Grenzwert für eine klinisch relevante Wirksamkeit angesehen wird, teilweise um ein Vielfaches.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14 *In vitro* antiprotozoische Aktivität von Ircinianin. Alle IC₅₀-Werte sind in µM angegeben und sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Assays; die jeweiligen Werte schwanken um weniger als Faktor 2.

Substanz	<i>P. falciparum</i>	<i>T. brucei rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>
Ircinianin	25.4	82.8	190.9	16.6
Melarsoprol	-	0.020	-	-
Miltefosin	-	-	-	0.486
Benznidazol	-	-	3.36	-
Chloroquin	0.006	-	-	-

3.2.1.4. Zytotoxische Aktivität

Die Testungen wurden vom National Cancer Institute, USA sowie von den Arbeitsgruppen von Frau Professor Brötz-Oesterhelt, Eberhard Karls Universität Tübingen, und Herrn Professor Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil, durchgeführt.

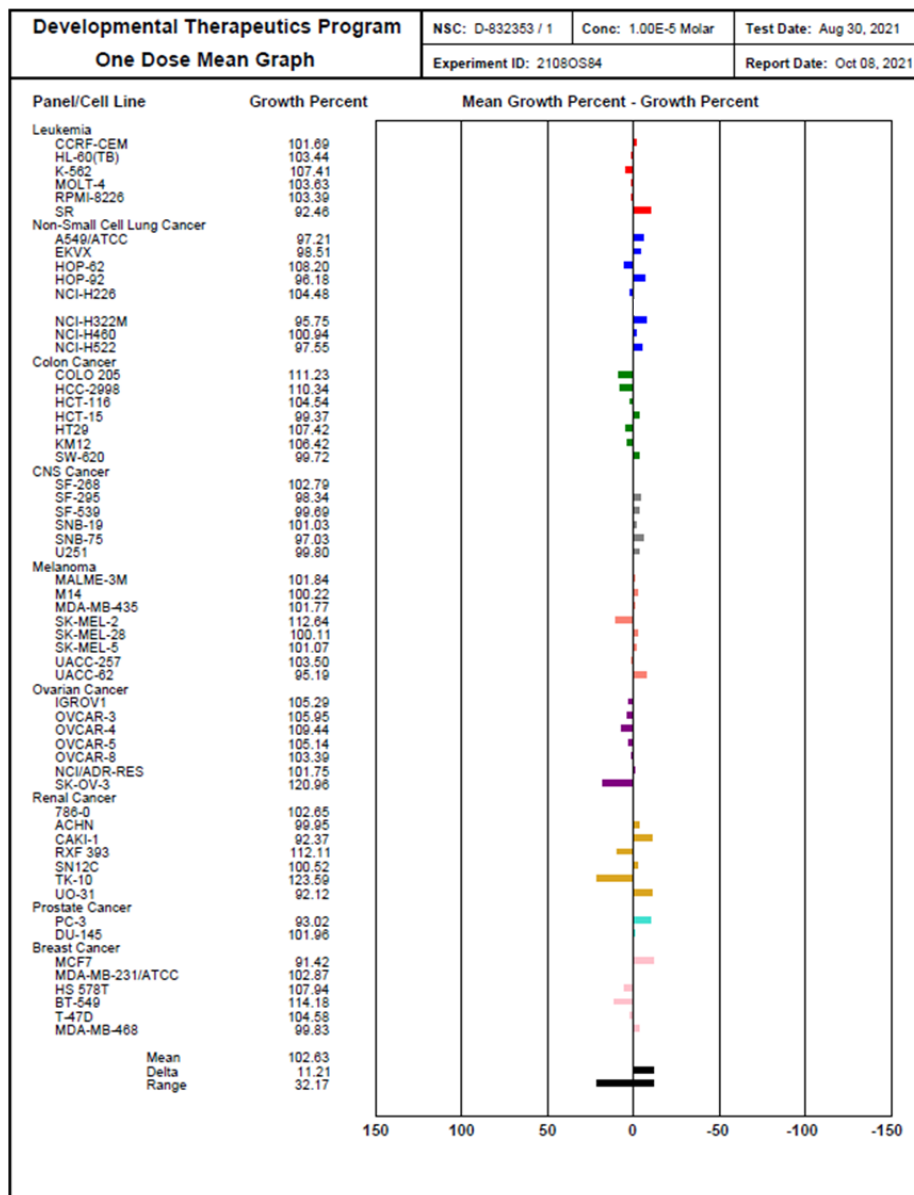
Zur Bestimmung der Antitumor-Aktivität von Ircinianin wurden 10 mg der Reinsubstanz an das National Cancer Institute (NCI), USA gesendet und im Rahmen eines Einzeldosentests gegen 60 verschiedene humane Krebszelllinien getestet. Außerdem wurden noch zusätzlich Aktivitäten gegenüber den zwei Einzelzelllinien L6 und HeLa untersucht. Bei allen Testungen zeigte sich jedoch, dass Ircinianin, unter den gegebenen Bedingungen, keine biologischen Effekte erzielen konnte. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 15 Zytotoxizität Ircinianin – Übersicht der Ergebnisse der Effekte gegenüber den Einzelzelllinien L6 und HeLa.

Zytotoxizität	
Zelllinie	IC ₅₀ [µg/ml]
HeLa	>64
L6	59.5

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16 Zytotoxizität Ircinianin – Übersicht der Ergebnisse im Rahmen des NCI 60 One Dose Cytotoxicity screening. Hierbei wurde Ircinianin gegenüber 60 verschiedenen Tumor-Zelllinien getestet. Aufgrund einer Information des NCI, dass die Identität der NCI-H23 Zelllinie nicht mehr gewährleistet war, wurde das Ergebnis auf Bitten des NCI aus der Übersicht entfernt, weswegen nur 59 Ergebnisse in der Tabelle gezeigt werden.



3.2.1.5. Antifouling-Effekte

Die Testungen wurden von Herrn Dr. Patrick Cahill und Herrn Dr. Johan Svenson am Cawthron Institute, Nelson (Neuseeland), durchgeführt.

Um die inhibitorischen Effekte von Ircinianin im Kontext des Antifouling-Prinzips zu untersuchen, wurden zwei Testmodelle zur Bestimmung der Aktivität herangezogen. Zum einen wurden in einem Assay die Effekte gegenüber der Seescheide *Ciona savignyi* getestet, wobei die Hemmung der Larven-Metamorphose und der Übergang

von der freischwimmenden Larven- zur sessilen, adulten Phase hin untersucht wurde. Die gleichen Versuche wurden auch mit dem zweiten Testorganismus *Mytilus galloprovincialis* durchgeführt. Allerdings konnten auch hier bis hin zu den höchst getesteten Konzentrationen (100 µg/ml) keine inhibitorischen Effekte nachgewiesen werden.

3.2.2. Bioaktivitätstestungen der Ircinianin-Derivate

Aufgrund der geringen Ausbeute der verschiedenen Ircinianin-Metaboliten und in Ermangelung weiterer Möglichkeiten, mehr Reinsubstanz isolieren zu können, war angedacht mit der Stammverbindung der Terpen-Familie, Ircinianin, ein umfassendes Vorscreening in den jeweiligen Assay-Systemen durchzuführen, um so die Grundaktivität des vorliegenden Kohlenstoffgerüsts analysieren und ableiten zu können. Auf den Ergebnissen dieses Vorscreenings aufbauend, war, bei nachgewiesenen biologischen Effekten, beabsichtigt, auch die weiteren Derivate in diesen standardisierten Labortests zu erproben. Unglücklicherweise traten jedoch bei den einzelnen Derivaten Stabilitätsprobleme auf, die zu einer Verunreinigung der Probe führten und eine erneute Aufreinigung der Substanzen erfordert hätten (vgl. hierzu Abbildungen 31 und 38). Allerdings waren die Mengen der Substanz von vornherein so gering, dass eine erneute Aufreinigung nicht mehr die für die Assays benötigten Mengen an Reinstoff aufbringen hätte können, weswegen auf die Bioaktivitätstestungen der weiteren Terpene verzichtet werden musste.

3.3. Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die hier vorgestellten Arbeiten zur chemischen Charakterisierung von *Ircinia wistarii* haben zur Isolierung sieben verschiedener Sesterterpenen geführt, wobei mit Ircinianin Lacton B und C auch zwei neue Derivate dieser Metaboliten-Familie vorgestellt werden konnten. Die chemischen Strukturen wurde über verschiedenste chemisch-analytische Verfahren sowie *in silico*-Methoden aufgeklärt und über Vergleiche mit Literaturdaten abgesichert. Aus naturstoffchemischer Sicht konnten somit alle relevanten Parameter bestimmt werden.

Die vorgelegte Bioaktivitätsstudie von Ircinianin umfasste eine Vielzahl verschiedenster, sowohl im biomedizinischen als auch im ökologischen Kontext

angesiedelten, Testsysteme und stellt eine der breitesten Screening-Studien zum Aktivitätsprofil mariner Naturstoffe der letzten Jahre dar.¹⁶¹ Mit der moderaten Aktivität gegenüber *P. falciparum* und *L. donovani* konnte so eine bisher unbekannte biologische Funktionalität des Terpens bestimmt werden, aber die nachgewiesenen Effekte waren zu gering, um Ircinianin als potentielle Leitstruktur für weitere Optimierungen zu empfehlen.

Neuere Studien zum Bioaktivitätsprofil mariner Naturstoffe zeigen jedoch, dass diese Verbindungen auch außerhalb der klassischen Assays zu antimikrobiellen und antitumoralen Effekten getestet werden sollten und, in diesem Sinne, eine Diversifikation der biologischen Testungen stattfinden müsste, um den Substanzen relevante biologische Funktionen zuordnen zu können.^{161, 162} Aus diesem Grund wurde Ircinianin auch außerhalb des klassischen biomedizinischen Kontexts getestet. Aufbauend auf der Tatsache, dass aus 800 g Rohmaterial über 200 mg Reinsubstanz Ircinianin isoliert werden konnten, was eine ungewöhnlich hohe Ausbeute darstellte, wurde die Hypothese entwickelt, dass diese Terpen-Familie eine wichtige ökologische Funktion für den Schwamm haben könnte. Die metabolischen Anstrengungen des Schwammes (oder eines symbiotischen assoziierten Mikroorganismus), die für die Synthese von Ircinianin aufgewendet wurden, waren, wie auch das Biosyntheschema in Abbildung 41 verdeutlicht, beträchtlich und die Mengen so groß, dass es nahe lag, dass der Schwamm einen direkten Nutzen davon haben könnte. Bestärkt wurde diese Hypothese dadurch, dass sich in der Literatur einige Beispiele dafür finden, dass Extrakte unterschiedlicher *Ircinia*-Spezies, aus verschiedensten geographischen Regionen, in Testungen diverse chemisch-ökologische Funktionen – von Quorum Sensing-Inhibition und Antifouling bis hin zu Schutzstoffen gegenüber Predatoren – aufwiesen.^{154-156, 163-165}

Die Produktion chemischer Schutzstoffe zur Abwehr von Besiedlungen und / oder Überwucherungen durch andere Organismen ist ein Grundpfeiler der Verteidigungsarchitektur sessiler mariner Lebewesen.^{5, 24} Im Kontext der Invertebraten ist eine Testung im Bereich des Antifoulings damit naheliegend, zumal in der Literatur sowohl Extrakte als auch (lineare) Sesterterpene von *Ircinia* spp. diesbezüglich vielversprechende Ansätze aufzeigten.^{154-156, 164, 165} Allerdings zeigte Ircinianin in den von uns gewählten Assays keine nennenswerten inhibitorischen Aktivitäten. Die Gründe dafür können vielfältiger Natur sein. Ähnlich wie bei der Bestimmung der

antibiotischen Aktivität, ist auch die Zuordnung der Antifouling Aktivität gegenüber Epibionten von der Auswahl der jeweiligen Testorganismen abhängig. Setzt sich das Test-Panel aus Organismen zusammen, die keine Empfindlichkeit gegenüber Ircinianin zeigen, bleibt eine mögliche Antifouling-Aktivität somit unentdeckt. D.h. die Auswahl der Testorganismen ist von entscheidender Bedeutung.¹⁵⁰ Allerdings ist diese Auswahl und die Gestaltung der Zusammensetzung auch auf Grundlage einer intensiven Literaturrecherche nicht notwendigerweise zielführend, da auch eventuelle geographische Besonderheiten berücksichtigt werden müssen. Selbst Schwämme derselben Spezies unterscheiden sich möglicherweise trotzdem, je nach Standort (und den damit variierenden Umweltfaktoren), in der Zusammensetzungen des jeweiligen chemischen Metabolitenprofils.^{54, 55} In der Karibik sind die epibiontischen Bedrohungen vermutlich anderer Natur als in der Nordsee. Deshalb wäre es, unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte, wahrscheinlich sinnvoller, sich bei der Recherche weniger von der Gattung eines Schwammes leiten zu lassen, sondern vielmehr, anhand lokaler geographischer Beobachtungen, mögliche Epibionten / Predatoren gezielt zu identifizieren und die Aktivitäten dann gegenüber diesen Organismen zu testen. Allerdings sind die meisten Assays relativ komplex, durch die benötigten Aquarien oftmals apparativ sehr aufwendig und fußen zum Teil auf aus der freien Wildbahn entnommenen Lebewesen (siehe Kapitel 9.2.6.5. *Antifouling-Aktivität im marinen Ökosystem*).¹⁵⁰ D.h. diese Testungen können nur von wenigen, spezialisierten Arbeitsgruppen weltweit durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde für die Testung von Ircinianin eine Kooperation mit dem Cawthron Institute aus Neuseeland gestartet. Aber die verwendeten Organismen wurden in Küstennähe von Neuseeland entnommen und entsprechen somit nicht notwendigerweise den Organismen denen *Ircinia wistarii* am Great Barrier Reef normalerweise ausgesetzt ist. Somit könnte dieser Umstand eine mögliche Erklärung liefern, warum in den Assays keine Aktivität festgestellt werden konnte. Aus diesem Grund sollte, für zukünftige ökologische Testungen von Naturstoffen aus der Tübinger Sammlung von Schwämmen des Great Barrier Reefs, über Kooperationen mit australischen Gruppen nachgedacht werden, da die dort zur Verfügung stehenden Testorganismen das natürliche Habitat viel besser abbilden können und somit die Chancen für die Bestimmung von biologischen Aktivitäten unter Umständen deutlich erhöhen würden.

Strukturaufklärung von Naturstoffen aus terrestrischen Quellen

4. Einleitung

4.1. Peptide im Kontext der Naturstoffforschung

Peptide sind eine bedeutende Gruppe innerhalb der Naturstoffe. Die Klassifizierung und Einteilung der Peptide in verschiedene Untergruppen kann dabei anhand verschiedener Faktoren vorgenommen werden: biochemisch lässt sich eine Einteilung gemäß den Mechanismen vornehmen, wie die Peptidbildungen ausgebildet werden, wobei die einfachste und weitläufigste Klassifikation den Energiestoffwechsel dieses Prozesses betrachtet und dementsprechend ATP-abhängige und ATP-unabhängige Gruppen definiert werden können. Biosynthetisch lassen sich die Peptide anhand der beteiligten Biosynthese-Maschinerie unterscheiden.¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ Generell werden hierbei ribosomale gebildete und nicht-ribosomal gebildete Peptide voneinander abgegrenzt: ribosomal gebildete Moleküle werden zur großen Gruppe der ribosomal gebildeten und posttranslational modifizierten Peptide zusammengefasst. Die nicht-ribosomal gebildeten Peptide werden wiederum, unter Berücksichtigung der beteiligten Biosynthese-Enzyme, deren Architektur sowie anhand der Mechanismen zur Auswahl, Aktivierung und Übertragung der einzelnen Aminosäuren, unterteilt, wobei sich neben tRNA-abhängigen und unabhängigen Biosynthese-Maschinerien, stellvertretend seien hier die Cyclodipeptid-Synthasen und ATP-abhängige Carboxylat-Amin-Ligasen genannt, vor allem die Megaenzyme der Nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen als größte Gruppe innerhalb dieses Verbundes hervorgeraten haben.¹⁶⁸⁻¹⁷¹

4.2. Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen und deren Produkte

Nicht-ribosomal gebildete Peptide stellen innerhalb der Naturstofffamilie eine bedeutende Gruppe dar, die häufig interessante Bioaktivitäten aufweisen.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Sie werden, wie der Namen bereits andeutet, nicht an Ribosomen gebildet, sondern leiten sich von so genannten Megaenzymen (Multimodulare Enzyme), den Nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPS), ab.^{173, 175, 176} Die Biosynthese-Maschinerie der jeweiligen Module setzt sich dabei, wie in Abbildung 43 veranschaulicht, aus verschiedenen Domänen zusammen, wobei jedes Modul im Regelfall mindestens drei Domänen aufweist: Adenylierungs (A) -Domänen sind für die Auswahl und Aktivierung der Aminosäuren verantwortlich, Kondensations (C) -Domänen katalysieren die Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren und Thiolierungs (T) -Domänen,

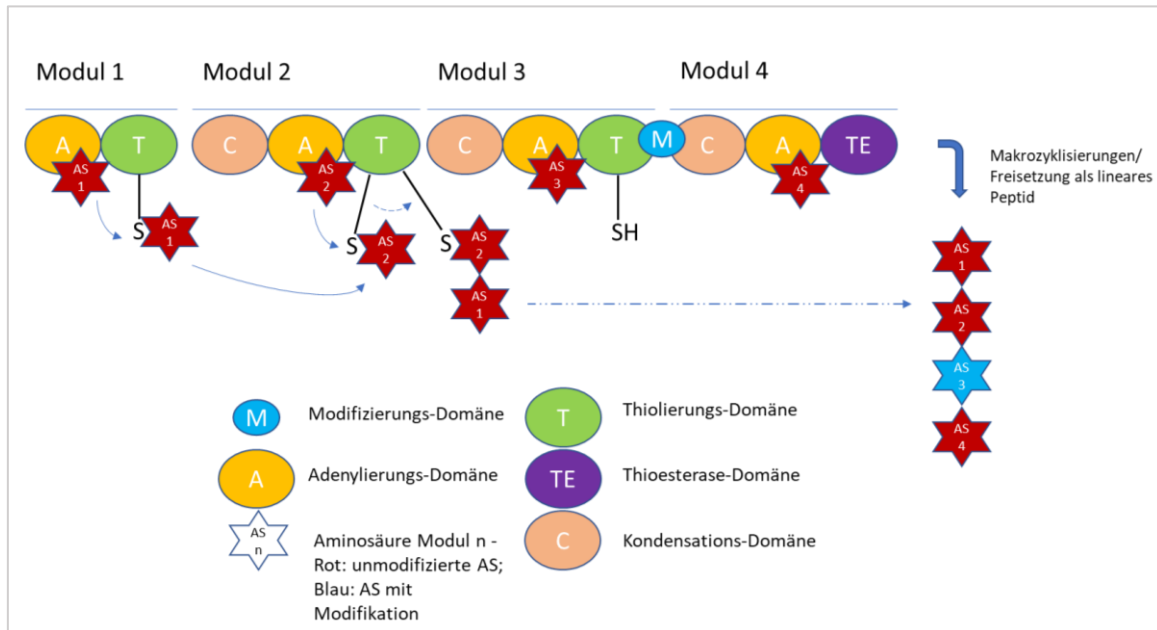


Abbildung 43 NRPS-Biosynthese – schematische Übersicht. Abbildung angelehnt an Mordhorst et al.¹⁷⁷

die synonym auch als PCP (‘Peptidyl carrier protein’) -Domänen bezeichnet werden, sorgen für den Weitertransport der sich verlängernden Aminosäurenkette zu den jeweilig nachfolgenden Domänen-Modulen. Ist die Aminosäurekette zum finalen Produkt zusammengesetzt und am letzten Modul angelangt, wird das Peptid durch die Thioesterase (TE) -Domäne vom Mega-Enzym abgespalten und als fertiges (zumeist zyklisches) Peptid freigesetzt. Ergänzt werden diese Module gelegentlich durch weitere Domänen und Enzyme, die bestimmte Modifikationen wie Methylierungen, Oxidationen und Epimerisierungen einzelner Aminosäuren sowie Zyklisierungen hervorrufen können. Dadurch wird die chemische Diversität der Peptide merklich erhöht.^{173, 175, 178}

4.3. Ribosomal gebildete und posttranslational modifizierte Peptide

Im Gegensatz zu den NRPS werden ribosomal gebildete und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs) am Ribosom gebildet.^{179, 180} Ausgehend von einem bestimmten Gencluster wird mittels Transkription und Translation das so genannte Precursor-Peptid gebildet, das typischerweise 20-110 Aminosäuren umfasst. Dieses Vorläufer-Peptid ist (oftmals) inaktiv und erfährt nach seiner Synthese weitere Modifikationen, die namensgebend für die Peptidklasse waren. Es lässt sich wiederum in verschiedene Segmente unterteilen, wobei jedes Segment einzelne Aufgaben zu erfüllen hat. Im Regelfall finden sich hierbei zwei charakteristische Segmente: eine N-

terminale Leader- (C-terminal als Follower bezeichnet) und eine C-terminale Core-Sequenz (vgl. Abbildung 44).^{179-181, 183}

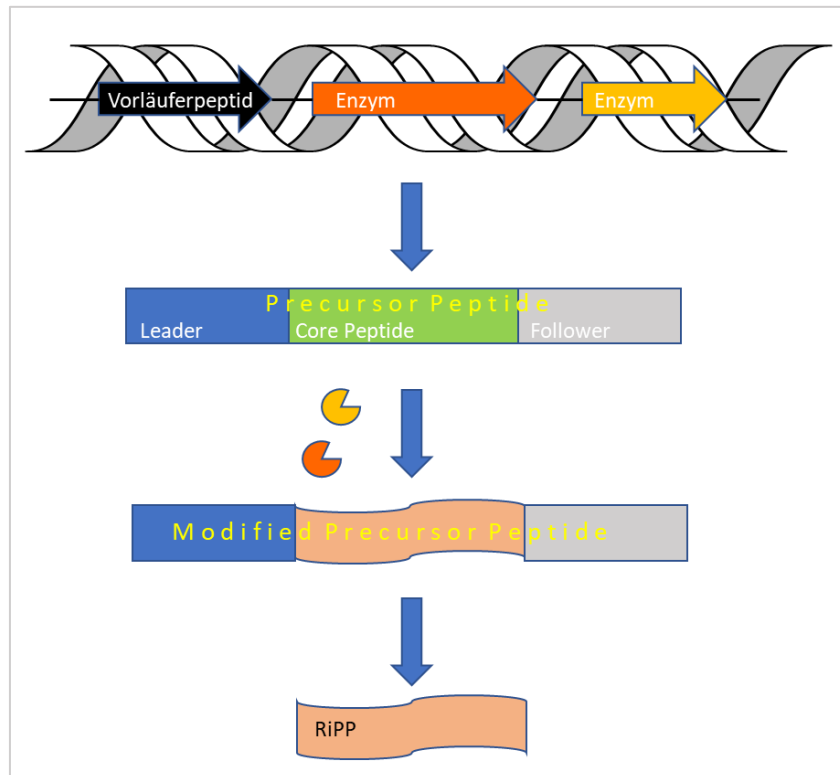


Abbildung 44 RiPP-Biosynthese – schematische Übersicht. Abbildung angelehnt an Lee und van der Donk sowie Vagstad.^{180, 182}

Ausgehend von diesem Vorläuferpeptid werden durch verschiedenste Enzyme Modifikationen am Core-Peptid vorgenommen, wobei innerhalb der leader / follower Region bestimmte Motive (‘recognition sequence’) enthalten sind, die dafür sorgen, dass das Enzym das Core-Peptid als Substrat erkennt. Nachdem diese Modifikationen vollzogen sind, wird das Core-Peptid aus dem Vorläuferpeptid – in Anlehnung an die eingeführten Modifikationen nun als Modified Precursor Peptide bezeichnet – proteolytisch freigesetzt und das (aktive) End-Peptid, das sogenannte RiPP, exportiert.^{179, 183, 184} Die RiPPs lassen sich dann wiederum in verschiedenen Klassen unterteilen, wobei hierzu charakteristische Strukturelemente, verwendete Biosynthesebausteine und sonstige architektonische Besonderheiten herangezogen werden.^{183, 185}

4.4. Lassoptide

4.4.1. Klassen und schematischer Aufbau

Lassoptide sind eine besondere Klasse innerhalb der ribosomalen Peptide und sind durch einen an Cowboy-Lassos erinnernden Aufbau gekennzeichnet, der auch namensgebend war (vgl. Abbildung 45). Das Gesamtpeptid setzt sich dabei aus 13-33 (ursprünglich) proteinogenen Aminosäuren zusammen.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Die ersten 7-9 Aminosäuren formen dabei einen Makrolaktamring unter Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem N-terminus der ersten Aminosäure – zumeist Glycin oder Cystein, wobei mittlerweile auch Peptide mit einem Leucin, Serin und Alanin in dieser Position beschrieben sind – und der Seitenketten-Carbonylfunktion einer Asparagin- bzw. Glutaminsäure. Der restliche lineare Teil („Lasso-Seil“) der Aminosäurekette wird dann durch diesen Ring hindurchgefädelt („Lasso-Schleife“).^{190-194, 215} Interessanterweise ist die Verknüpfung der an der Isopeptidbindung beteiligten Aminosäuren immer so gestaltet, dass die Aminosäuresequenz innerhalb des Ringsystems von den Positionen 1 bis 7-9 in einer nach rechter Hand / entgegen dem Uhrzeigersinn verlaufenden Formation angeordnet ist (vgl. Abbildung 45), obwohl auch eine Linksorientierung prinzipiell möglich und energetisch wohl gleichwertig wäre.^{189, 195, 196}

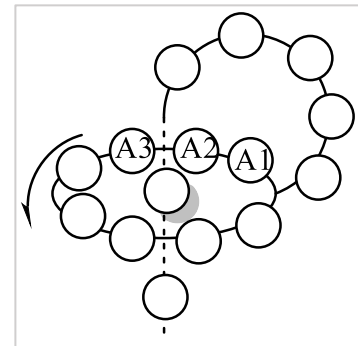


Abbildung 45 Schematischer Aufbau eines Lassoptides mit der charakteristischen „right handed topology“. Angelehnt an Maksimov et al.¹⁸⁹

Je nach Art und Weise, wie diese entropisch ungünstige räumliche Anordnung stabilisiert wird, lassen sich (zum jetzigen Zeitpunkt) vier Klassen von Lassozeptiden unterscheiden, wobei die Einteilung zu den jeweiligen Klassen auf Grundlage der im Molekül vorhandenen Disulfidbrücken-Bindungen und deren Ausgestaltung getroffen wird.¹⁹⁰ Die Zusammenhänge sind in Abbildung 46 veranschaulicht.

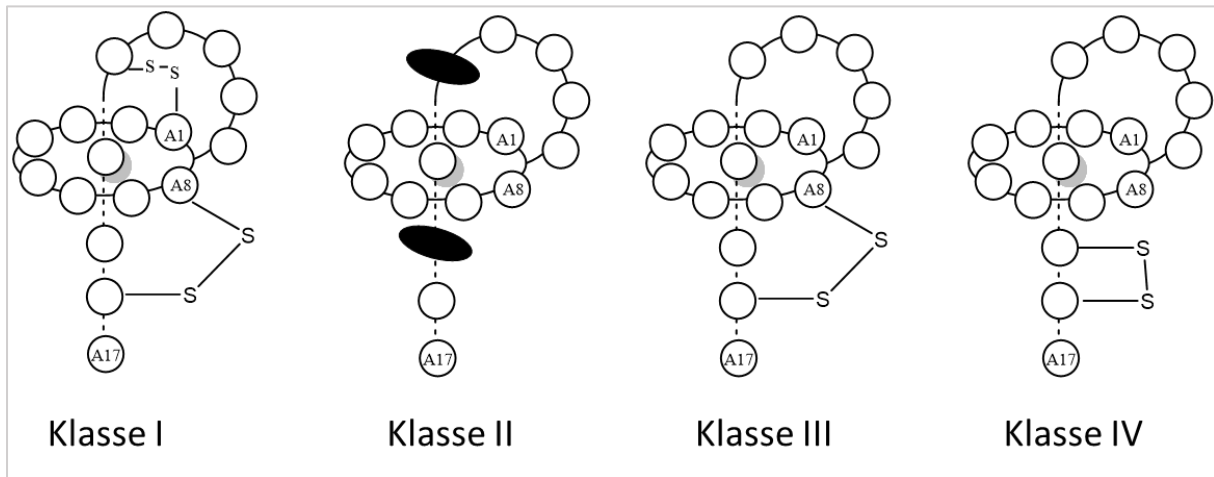


Abbildung 46 Übersicht der vier Lasso-peptid-Klassen. Angelehnt an Tietz et al.¹⁹³ Die Sequenzlänge von 17 sowie eine Ringgröße von acht Aminosäuren und die Lage der Disulfidbrücken sind zufällig gewählt und nicht Klassen-spezifisch.

Klasse I weist dabei in Position 1 ein Cystein auf, das, neben der Beteiligung an dem Makrolaktamring, über seine Seitenkette zu einem, im linearen Molekülteil befindlichen, weiteren Cystein eine Disulfidbrücke ausbildet. Zudem wird aus zwei weiteren Cysteinen eine weitere Ring-Schwanz-Brücke ausgebildet. Klasse II weist keine Disulfidbrücken im Molekül auf und die Architektur wird sterisch durch große Aminosäure-Seitenkettenreste ober- und unterhalb der Ringebene in Position gehalten und so in ihrer dreidimensionalen Gestalt stabilisiert.^{186, 189, 190, 197} Klasse III beschreibt ein weiteres System, das, neben dem typischen Makrolaktamring, noch zusätzlich eine Disulfidbrücke, unter Beteiligung zweier Cysteine, zwischen dem Ringsystem und der linearen Peptidkette ausbildet.^{189, 190, 198} Klasse IV weist ebenfalls nur eine Disulfidbrücke auf, wobei diese durch zwei Cysteingruppen innerhalb der unzyklisierten, linearen Peptidsequenz ausgebildet wird.^{190, 193}

Diese ungewöhnliche Topologie führt zu relativen rigiden Strukturen, die sich zumeist durch eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen, wie Hitze und Enzymen (Proteasen), auszeichnen.^{186, 190} Insbesondere die thermische Stabilität war lange Zeit auch als ein generelles Klassenmerkmal dieser Peptide angesehen worden, wobei neuere Untersuchungen zeigten, dass dieses Merkmal insbesondere innerhalb der Verbindungen der Klasse II Lasso-peptide (ohne kovalente Bindung zwischen Ring und linearer Aminosäurekette) nicht notwendigerweise gegeben ist.^{199, 200} Im Detail scheint hierbei vor allem die Größe und Ausgestaltung des Makrolaktamringes sowie die raumfüllende Ausdehnung der Seitenketten jener Aminosäuren, die das Ausfädeln / Durchrutschen des linearen Peptidteils unterbinden sollen, entscheidend.^{191, 192, 199-}

²⁰² Aber gerade diese hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen ist einer der Gründe dafür, warum Lassoptide, innerhalb der gesamten Peptidklasse, als besonders privilegierte Strukturen im Kontext der Wirkstoffsuche bzw. -entwicklung betrachtet werden.¹⁹⁰

4.4.2. Lassoptide sind bioaktive Substanzen

Peptide gelten als Arzneistoffe der Zukunft. Aufgrund ihrer hohen chemischen Variabilität, ihrer (im Regelfall) geringen Toxizität / Immunogenität und ihrer hohen Target-Spezifität, rücken sie zunehmend in den Fokus der Wirkstoffforschung, weil sie – so zumindest die Theorie – die Wirkstoffspezifität von Proteinen, wie etwa Antikörpern, mit einigen, auch für die Bioverfügbarkeit ausschlaggebenden, Vorteilen von klassischen small molecule-Kandidaten verbinden.^{203, 204} Aber gerade lineare Peptide weisen eine geringe proteolytische Stabilität auf, zeigen, aufgrund ihrer strukturellen Flexibilität, eine geringere Bindungsaffinität / Spezifität für ihre Zielstruktur und sind somit per se als Arzneistoffkandidaten eher ungeeignet. Viele dieser physikochemischen Nachteile lassen sich aber durch eine einfache Zyklisierung bereits vermindern oder sogar komplett unterbinden.^{205, 206} Und durch die etablierten chemisch-biologischen Screening- und medizinalchemischen Synthese-Techniken lassen sich etwaige Arzneistoffkandidaten zudem relativ leicht modifizieren und optimieren.^{206, 207}

Lassoptide vereinen aber nicht nur die genannten positiven physiko- und medizinalchemischen Eigenschaften zyklischer Peptide, sie zeigen zudem auch interessante Aktivitätsprofile, die von antimikrobiellen Aktivitäten über selektive Rezeptorinteraktionen bis hin zur Unterbindung der Krebszellmigration reichen (vgl. Tabelle 17). Tan et al. zeigten aber in ihrer Übersichtsarbeit, dass bei Lassozeptiden insbesondere Aktivitäten im antimikrobiellen Umfeld häufig festzustellen sind.²⁰⁸ Aufgrund der fortschreitenden Resistenzen im Bereich der antibakteriellen Therapie werden neue Antibiotika dringend benötigt.^{145, 209, 210} Innerhalb der antibiotisch aktiven Lassoptide ist von einigen Vertretern bekannt, dass sie auf molekularer Ebene mit der Zellwandbiosynthese der Bakterien wechselwirken und die Ribonukleinsäure-Synthese beeinflussen, wobei insbesondere die RNA-Polymerase als Zielstruktur ausgemacht werden konnte.^{194, 208, 211-215} Interessanterweise könnten aber gerade Lassoptide auch andere, neuartige Wirkmechanismen aufweisen / Zielstrukturen

Einleitung

Tabelle 17 Übersicht (Auswahl) verschiedener Lasso peptide und ihr jeweiliges biomedizinisches Potential.

Substanz	Produzenten	Bioaktivität (repräsentativer Testorganismus / Target)
Chaxapeptin ²¹⁶	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C58	Inhibitor der Krebszellinvasion (A549-Zellen; Lungenkarzinom)
Ulleungdin ²¹⁷	<i>Streptomyces</i> sp. KCB13F003	Inhibitor der Krebszellinvasion und -migration (A549-Zellen; Lungenkarzinom)
Cloacaenodin ²¹⁸	Spezies des <i>Enterobacter cloacae</i> complex (ECC)	Antibakterielle Effekte (<i>Enterobacter cloacae</i> UC1102)
Triculamin ²¹⁹	<i>Streptomyces griseocarneus</i> NRRL 24281 <i>Streptomyces triculaminicus</i> JCM 4242	Antibakterielle Effekte (<i>Mycobacterium phlei</i>)
Ubonodin ²¹³	<i>Burkholderia ubonensis</i> MSMB2207	Antibakterielle Effekte (<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416)
BI-32169 ^{198, 220}	<i>Streptomyces</i> sp. DSM 14996	Antagonist des Glucagon Rezeptors
Sphaericin ²²¹	<i>Planomonospora sphaerica</i>	Antibakterielle Effekte (<i>Micrococcus luteus</i>)
Siamycin I ^{189, 222}	<i>Streptomyces</i> AA6532 (ATCC 55290)	Antivirale Effekte (HIV)
RES-701-1 ^{189, 223}	<i>Streptomyces</i> sp. RE-701	Endothelin Rezeptor Antagonist

adressieren, da – basierend auf der Übersichtsarbeit von Tan et al. aus dem Jahr 2019 – in den meisten Fällen die molekularen Zusammenhänge der antibakteriellen Wirkung der jeweiligen Peptide bisher nicht bekannt sind.²⁰⁸

Lasso peptide vereinen also besondere strukturelle Besonderheiten mit (zum Teil) vielversprechenden Bioaktivitäten, weswegen Sie als privilegierte Strukturen im Umfeld der bioaktivitäts-orientierten Naturstoffforschung angesehen werden können.

5. Vorarbeiten

In der Doktorarbeit *Expanding The Chemical Space of RiPPs in Rare Actinobacteria Employing a Tunable Metabologenomic Approach* von Herrn Dr. Hamada Saad wurden unter anderem neue ribosomal gebildete Peptide aus *Nocardia terpenica* IFM 0406 vorgestellt.²²⁴ Neben der kompletten Strukturanalyse der Nocathioamide wurden auch zwei Lasso-peptid-Familien mittels genome mining identifiziert, die, nach ihren Produzenten entsprechend, als Nocapeptine bzw. Longipeptine benannt wurden, wobei im Folgenden auf die weiteren Ergebnisse zur strukturellen Ancharakterisierung der Nocapeptine eingegangen werden soll.

Aufbauend auf weiteren bioinformatischen Untersuchungen konnte schlussendlich ein mögliches Biosynthesegencluster (BGC), das für diese Lasso-peptide kodiert, identifiziert werden. Interessanterweise offenbarte die Gencluster-Analyse zusätzliche Enzyme, wie etwa CYP P450 Monooxygenasen, die weitere Modifikationen andeuteten, wobei gerade CYP-Enzyme oftmals mit zusätzlichen C-C / C-N Quervernetzungen einhergehen und somit, auf bioinformatischer Ebene, interessante Variationen in der chemischen Architektur der Moleküle andeuteten. Daraufhin wurde ein LC-MS basierter Screening-Ansatz initiiert, um zu überprüfen, ob das entsprechende

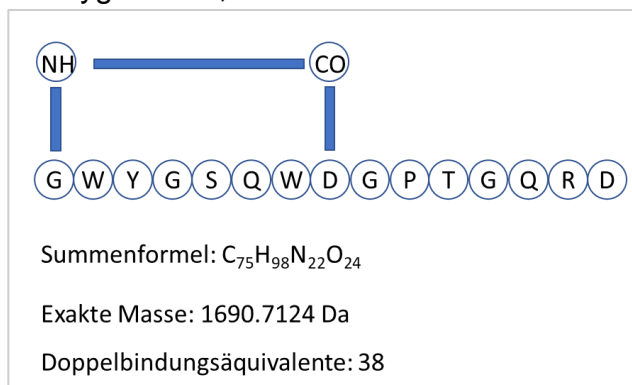


Abbildung 47 Strukturvorhersage der Nocapeptin-Familie auf Grundlage bioinformatischer Vorhersagen. Abbildung gezeichnet nach Saad.²²⁴

Produkt dieses Genclusters – ein entsprechender Massenbereich für das gesuchte Lasso-peptid konnte auf Grundlage der bioinformatischen Untersuchungen und der damit einhergehenden Strukturvorhersage definiert werden (vgl. Abbildung 47) – auch unter den gewählten Kultivierungsbedingungen gebildet wird. So wurde, im Sinne eines OSMAC-Ansatzes, das metabolische Verhalten des Bakteriums in verschiedenen Kulturmedien getestet und massenspektroskopisch analysiert.

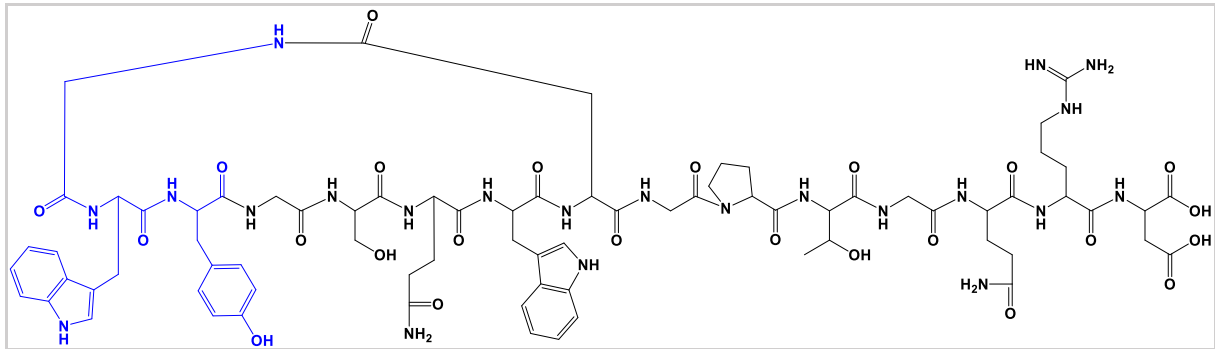


Abbildung 48 Nocapeptin A – Strukturvorschlag auf Grundlage der bioinformatischen Vorhersage und von MS²-Fragmentierungsversuchen. In Blau: Strukturmotiv, das weitere Modifikationen enthält. Gezeichnet nach Saad.²²⁴

In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass das gesuchte Molekulargewicht bei Kultivierungsansätzen mit dem modifizierten R4-Medium nachgewiesen werden konnte. Aufbauend auf der Fragmentierungsmuster-Analyse in Kombination mit der Aminosäuresequenzvorhersage, konnte so ein Großteil des vorhergesagten Molekül-Skeletts experimentell bestätigt werden (siehe Abbildung 48), wobei eine Massendifferenz von 2 Da zum vorhergesagten Peptid festgestellt werden konnte. In Kombination mit dem vorhandenen CYP P450 Enzym und der Fragmentierungsmuster-Anomalie innerhalb der Glycin-Tryptophan-Tyrosin Sequenz, lag somit der Verdacht einer zusätzlichen Quervernetzung innerhalb dieses Motivs nahe, was die beobachtete Massendifferenz als Verlust zweier Wasserstoffatome innerhalb des Strukturgefüges ausweisen würde. Somit stellten die Nocapeptide die ersten potenziellen Vertreter der Klasse II-Lasso peptide mit einem polyzyklischen Peptid-Grundgerüst dar.

6. Ziel der Arbeit

Aufbauend auf den Vorarbeiten von Herrn Dr. Hamada Saad soll im Weiteren die genaue Struktur der Nocapeptin-Familie anhand des Stammvaters der Klasse, Nocapeptin A, aus *Nocardia terpenica* IFM 0406 untersucht werden. Hierbei wird zunächst über verschiedene Kultivierungsansätze genügend Rohmaterial produziert, aus dem dann der Reinstoff mittels chromatographischer Methoden isoliert werden kann. Nachfolgend wird die Substanz einer umfassenden NMR-basierten spektroskopischen Analyse unterzogen, mit der die komplette Struktur dargelegt werden und auf ihren polyzyklischen Charakter hin untersucht wird. Im ersten Schritt werden so die einzelnen Positionen der Aminosäuren im Gesamtgefüge bestimmt und daran anschließend die Besonderheit des zweiten Ringschlusses durch verschiedenste Experimente untersucht werden, um die molekulare Architektur final darzulegen. Anhand verschiedenster NOE-Kontakte kann zudem Aufschluss über die dreidimensionale Struktur von Nocapeptin A gegeben werden. Ergänzt werden diese Strukturanalysen zudem durch weitere Studien zum bioaktiven Verhalten des dargelegten Kohlenstoffgerüsts, um so sein Wirksamkeitspotential innerhalb der Klasse der Lassoptide bewerten zu können.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Kultivierung und Isolierung von Nocapeptin A

Ausgehend vom Screening-Ansatz von Herrn Dr. Saad wurden die Kultivierungsbedingungen beibehalten und lediglich das Volumen des Ansatzes vergrößert, um entsprechende Mengen an Rohextrakt zu generieren.²²⁴ Dieser wurde im Anschluss mittels Säulenchromatographie in zehn Fraktionen (von 10% bis 100% Methanol) aufgetrennt und die Fraktionen anschließend an der LC-MS auf die gesuchte Masse hin ($[M+2H]^{2+}$ 845.3562; Summenformel: $C_{75}H_{98}N_{22}O_{24}$) überprüft. Dabei zeigte sich, dass sich Nocapeptin A in der 60%-Methanol-Fraktion angereichert hatte, weswegen diese Fraktion zur weiteren Aufreinigung und Isolierung der Reinsubstanz ausgewählt wurde.

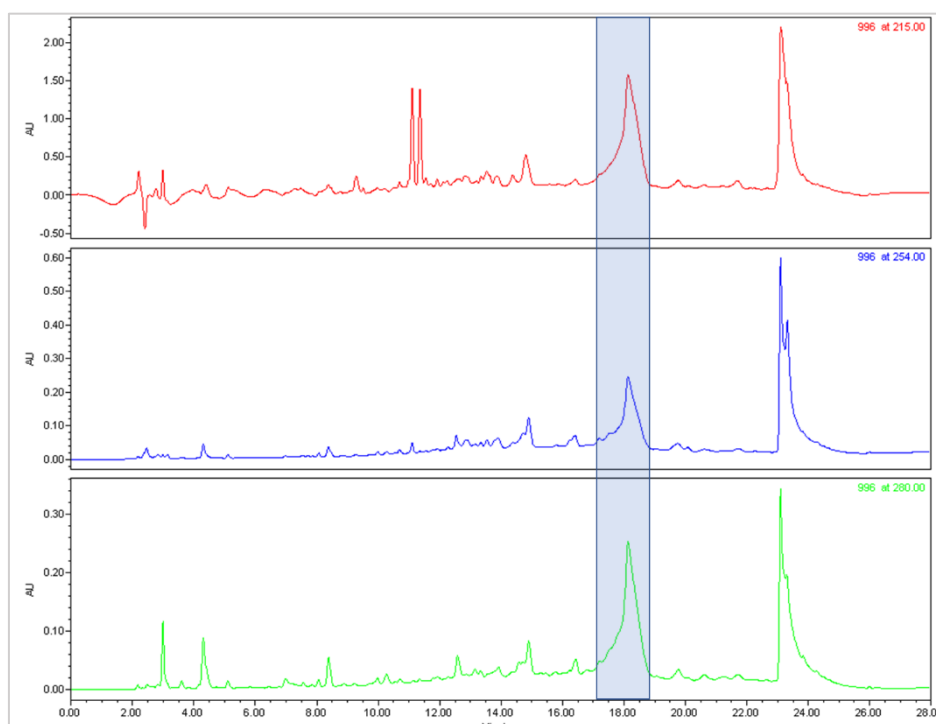


Abbildung 49 Chromatogramm der 60%-Methanol Fraktion. In Blau ist der Nocapeptin A-Peak hervorgehoben. Oben: Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 215 nm, Mitte: Detektionswellenlänge von 254 nm, unten: Detektionswellenlänge von 280 nm.

Ausgehend von einem Standardgradienten wurde dann eine Methode optimiert, die, bei möglichst kurzer Laufzeit, einen optimal aufgelösten Peptid-Peak zeigte. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 49 gezeigt. Mit dieser Methode wurde die komplette Fraktion aufgereinigt, sodass schlussendlich etwa 18 mg an Reinsubstanz von Nocapeptin A vorlagen. Mit diesen wurden die nachfolgend beschriebenen Strukturanalysen durchgeführt.

7.2. NMR basierte Strukturaufklärung von Nocapeptin A

Ausgehend von der in Abbildung 48 gezeigten Vorhersage der Verbindung ($C_{75}H_{96}N_{22}O_{24}$, 39 Doppelbindungsäquivalente) sollte die komplette Struktur mittels Kernresonanzspektroskopie bestimmt werden. Auf dem gängigen Prinzip der Peptid-NMR-Analytik aufbauend, wurden zunächst die einzelne Aminosäure anhand ihrer Spinsysteme identifiziert. Im nachfolgenden Schritt wurden die so ermittelten Fragmente zur finalen Aminosäuresequenz zusammen gefügt.²²⁵ In den nachfolgenden Kapiteln wird die Strukturaufklärung ausführlich Schritt für Schritt erläutert. Für Aussagen zu typischen chemischen Verschiebungen von Aminosäuren im Allgemeinen, wie auch für einzelne Vertreter, wurde dabei auf die in der Fachliteratur benannten Werte zurückgegriffen.^{226, 227} Die Literaturstellen werden im Weiteren aber nicht fortlaufend angeführt. Tabelle 18 gibt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 18 1H (700 MHz) und ^{13}C (176 MHz) Daten von Nocapeptin A. Aufgenommen bei 298 K in Methanol- d_3 / Wasser (96:4). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben.

Aminosäure	Position	δ_H , mult (J in Hz)	δ_C , Typus ^a	δ_N , Typus ^a
1 Gly	NH	8.31, t (6.3)	-	111.7, NH
	α	3.59, dd (11.6, 5.0) 4.27, m	43.5, CH ₂	-
	CO	-	172.0, C	-
2 Trp	NH	8.60, m	-	123.7, NH
	α	5.09, m	54.55 ^A , CH	-
	β	3.05, m 3.44, dm (14.0)	29.15, CH ₂	-
	N	-	-	120.8, N
	C2	6.74, m*	147.2, CH	-
	C3	-	120.3, C	-
	C3a	-	135.5, C	-
	C4	7.90, d (7.6)	121.4, CH	-
	C5	7.30, m*	124.4, CH	-
	C6	7.32, m*	126.4, CH	-
	C7	7.48, d (7.7)	118.1, CH	-
	C7a	-	153.0, C	-
	CO	-	171.8, C	-
3 Tyr	NH	6.74, m	-	125.7, NH
	α	4.84, m ^v	54.64 ^A , CH	-
	β	2.70, m 2.75, m	38.2, CH ₂	-
	C1	-	128.51 ^C , C	-
	C2	5.45, d (2.0)	130.8, CH	-
	C3	-	130.4, C	-

Ergebnisse und Diskussion

		C4	-	151.8, C	-
		OH	n.d.	-	-
		C5	6.77, d (8.4)	119.1, CH	-
		C6	6.70, dd (8.4, 2.0)	129.7, CH	-
		CO	-	170.6, C	-
4	Gly	NH	8.12, d (7.8)	-	105.4, NH
		α	3.52, m 4.18, dd (17.4, 7.8)	44.0, CH ₂	-
		CO	-	170.27 ^B , C	-
5	Ser	NH	8.09, d (9.4)	-	113.5, NH
		α	4.61, m ^W	57.8, CH	-
		β	3.80, m 4.01, dd (11.2, 4.1)	64.6 (64.5) ¹ , CH ₂	-
		OH	n.d.	-	-
		CO	-	172.8, C	-
6	Gln	NH	8.89, d (9.5)	-	119.4, NH
		α	4.82, m ^W	52.8, CH	-
		β	2.04, m 2.29, m	30.37, CH ₂	-
		γ	2.40, m 2.45, m	32.8; CH ₂	-
		CO	-	178.7, C	-
		NH ₂ <i>cis</i> ^F <i>trans</i> ^F	6.80, br s 7.72, br s	-	110.3, NH ₂
		CO	-	174.4, C	-
7	Trp	NH	8.64, m*	-	120.4, NH
		α	4.40, m	58.4, CH	-
		β	3.24, m 3.33, m	28.4, CH ₂	-
		NH	10.47, s	-	129.2, NH
		C2	7.30, m*	125.9, CH	-
		C3	-	110.3, C	-
		C3a	-	128.56 ^C , C	-
		C4	7.68, d (7.8)	120.0, CH	-
		C5	7.01, t (7.5)	120.6, CH	-
		C6	7.09, dd (7.8, 7.5)	123.0, CH	-
		C7	7.34, d (8.4)	112.4, CH	-
		C7a	-	137.5, C	-
		CO	-	174.0, C	-
8	Asp	NH	8.82, d (9.8)	-	123.8, NH
		α	4.67, m ^W	49.68, CH	-
		β	1.99, m 2.11, m	41.6, CH ₂	-
		CO	-	173.1, C	-
		CO	-	173.0, C	-
9		NH	5.30, m ^W	-	n.d.

Ergebnisse und Diskussion

	Gly	α	2.98, m 4.14, dd (16.3, 8.3)	42.7, CH ₂	-
		CO	-	(169.9) ^G , C	-
10	Pro	N	-	-	129.7, N
		α	4.28, m	63.4, CH	-
		β	1.99, m 2.33, m	31.3, CH ₂	-
		γ	2.03, m	25.8, CH ₂	-
		δ	3.51, m 3.78, m	47.8, CH ₂	-
		CO	-	174.3, C	-
		NH	7.31, m	-	105.9, NH
11	Thr	α	4.57, m ^W	58.8, CH	-
		β	4.09, m	69.6, CH	-
		OH	n.d.	-	-
		γ	1.09, d (6.4)	20.2, CH ₃	-
		CO	-	172.8, C	-
		NH	8.26, br s	-	108.3, NH
12	Gly	α	3.80, m 4.04, dd (17.1, 4.9)	43.8, CH ₂	-
		CO	-	170.30 ^B , C	-
		NH	7.43, d (9.2)	-	116.5, NH
13	Gln	α	4.86, m	54.24 ^D , CH	-
		β	1.67, m 1.84, m	33.5, CH ₂	-
		γ	2.05, m 2.12, m	33.6, CH ₂	-
		CO	-	178.4, C	-
		NH ₂ <i>cis</i> ^F <i>trans</i> ^F	6.56, br s 7.07, m*	-	107.8, NH ₂
		CO	-	172.6, C	-
		NH	8.63, m	-	114.8, NH
14	Arg	α	4.53, m ^W	54.26 ^D , CH	-
		β	1.74, m	30.79, CH ₂	-
		γ	1.28, m 1.45, m	24.0, CH ₂	-
		δ	3.25, m	42.4, CH ₂	-
		NH ϵ	7.39, m	-	84.9, NH
		ζ	-	158.9, C	-
		NH η 1	n.d.	-	n.d.
		NH η 2	n.d.	-	n.d.
		CO	-	172.5, C	-
		15	Asp	NH	8.62, m*
α	4.58, m			53.5, CH	-
β	2.70, m 3.01, m			39.0, C	-

Ergebnisse und Diskussion

COOH	n.d.	177.0 ^E , C	-
COOH	n.d.	176.9 ^E , C	-

^a Substitutionsgrade wurden anhand des ¹H-¹³C edit. HSQC bzw. des ¹H-¹⁵N HSQC Spektrums ermittelt. Die chemischen Verschiebungen des Stickstoffs (¹⁵N) wurden aus dem ¹H-¹⁵N HSQC / ¹H-¹⁵N HMBC Spektrum extrahiert.

^{A/B/C/D} Zuordnungen sind möglicherweise vertauscht.

^E Zuordnung auf Grundlage des band selective ¹H-¹³C HMBC Spektrums der Carbonylregion.

^F Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakter der Amidbindung sind die beiden Wasserstoffe der Carbamoylgruppe magnetisch nicht äquivalent und spalten in zwei diskrete Signale auf, die, je nach ihrer Lage zum Sauerstoff der Carbonylgruppe, als *cis* bzw. *trans* bezeichnet werden.²²⁸

^G Es gab keine eindeutige Korrelation, die die Position der Carbonylgruppe bestätigte. Allerdings wurden alle anderen Signale innerhalb des Moleküls zugeordnet oder als Verunreinigung identifiziert, sodass das letzte Signale im ¹³C NMR Spektrum entsprechend zugeordnet wurde.

^W von Wasserpeak überlagert.

¹ Kohlenstoffverschiebungen nahezu identisch; Signallagen und Intensitäten deuten die Lage bei 64.6 ppm an, das Signal bei 64.5 ppm wäre demnach eine Verunreinigung / Artefakt.

* von anderen Signalen überlagert.

7.2.1. Bestimmung der einzelnen Aminosäuren anhand ihrer Spinsysteme

Die bioinformatische Analyse sagte ein fünfzehn-Aminosäure umfassendes Lasso-peptid voraus, wobei sich die Aminosäuresequenz aus 4xGly, 2xGln, 2xAsp, 2xTrp, 1xSer, 1xTyr, 1xPro, 1xThr und 1xArg zusammensetzen sollte (vgl. Abbildungen 47 und 48). Ausgehend von den Vorhersagen über die beteiligten Aminosäuren und deren Anordnung zum peptidischen Molekülsystem wurde die Strukturanalyse begonnen. Hierzu wurden zur Ermittlung der Spinsysteme die eindimensionalen ¹H-, ¹³C- sowie die zweidimensionalen ¹H-¹H COSY-, ¹H-¹H TOCSY-, ¹H-¹³C HSQC-TOCSY-, ¹H-¹³C edit. HSQC- und ¹H-¹⁵N HSQC- Spektren herangezogen.

Aufbauend auf einer ersten Analyse der ¹H- und ¹³C NMR Spektren, konnte der peptidische Charakter der Probe zweifelsfrei belegt werden. Es zeigten sich die typischen Signale der aciden (austauschbaren) Amidgruppen zusammen mit den aromatischen Wasserstoffen der Arylsysteme der drei Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin im Bereich von δ_H 6.4-8.95, was durch ein Indol-Aminsignal bei 10.47 ppm ergänzt wurde. Die zahlreichen, im höheren Feld gelegenen, Signale (δ_H 1.2-4.2) zeigten das typische Muster der CH₂-Gruppen der jeweiligen β -, γ - und δ -Seitenkettenmethylenfunktionen langkettiger Aminosäuren. Die charakteristischen Signale der α -Wasserstoffe wurden durch den Wasserpeak, das Teil des Lösemittelgemisches war, überdeckt. Allerdings waren die entsprechenden Kohlenstoffsignale des ¹³C NMR Spektrums im Bereich von δ_C 42-64 jedoch

zweifelsfrei nachzuweisen, wobei insbesondere das Signal bei 63.4 ppm die Anwesenheit eines Prolin-Bausteins verdeutlichen konnte. Im Verbund mit den Ergebnissen des ^1H - ^{13}C edt. HSQC Spektrums konnten, anhand der negativen Phasenlage der Signale, vier $\alpha\text{-CH}_2$ Gruppen im Bereich $\delta_{\text{C}} \sim 43$ / $\delta_{\text{H}} \sim 4.1$ identifiziert werden, was als klarer Hinweis auf die Beteiligung von vier Glycin-Bausteinen gewertet werden konnte. Mit den 19 quartären Carbonyl-Signalen im Bereich von 169-180 ppm konnten 15 Aminosäuren mit vier zusätzlichen Seitenketten-Carbonyl Gruppen, entsprechend der vorhergesagten Struktur, aus den Spektren abgeleitet werden.

Auf Grundlage der Korrelationen in den ^1H - ^1H TOCSY- und ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY Spektren wurden die jeweiligen Spinsysteme der Aminosäuren bestimmt, wobei sich im ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY Spektrum auch die Amid-Wasserstoffe des Peptidrückgrats (zumeist) durch Kopplungen mit den α -Kohlenstoffen zeigten. Die entsprechenden Resonanzlagen der kovalent gebundenen Stickstoffatome wurden dann über die ^1H - ^{15}N HSQC Ergebnisse zugewiesen. Im Zusammenspiel der Analyse von den genannten Spektren, konnten so zweifelsfrei die chemische Verschiebungen der Wasserstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffatome der einzelnen Aminosäuren bestimmt werden. Im nächsten Schritt wurden nun, anhand der im ^1H - ^{13}C edt. HSQC Experiment ermittelten $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen, die jeweiligen Kohlenstoffe mit ihren zugehörigen Wasserstoffen zusammengeführt, wobei der entsprechende Substitutionsgrad anhand der jeweiligen Phasenlage im ^1H - ^{13}C edt. HSQC Spektrum nochmals überprüft wurde. Dieses Vorgehen ist exemplarisch in Abbildung 50 veranschaulicht. Die jeweilige Position dieser Atomgruppen innerhalb der Aminosäure wurde im Anschluss daran, auf Grundlage der homonuklearen Kopplungen im ^1H - ^1H COSY Spektrum, zugewiesen, sodass (nahezu) sämtliche Aminosäuren vollständig aufgebaut werden konnten (vgl. hierzu Abbildung 51). Zur weiteren Absicherung wurden die chemischen Verschiebungen mit den in der Literatur festgehaltenen Referenzwerten abgeglichen.^{226, 227} Auf die Unterschiede im Tryptophan-Tyrosin-Motiv wird im Kapitel 7.2.3. *Quervernetzung der Seitenketten im Tryptophan-Tyrosin-Motiv* ausführlich eingegangen.

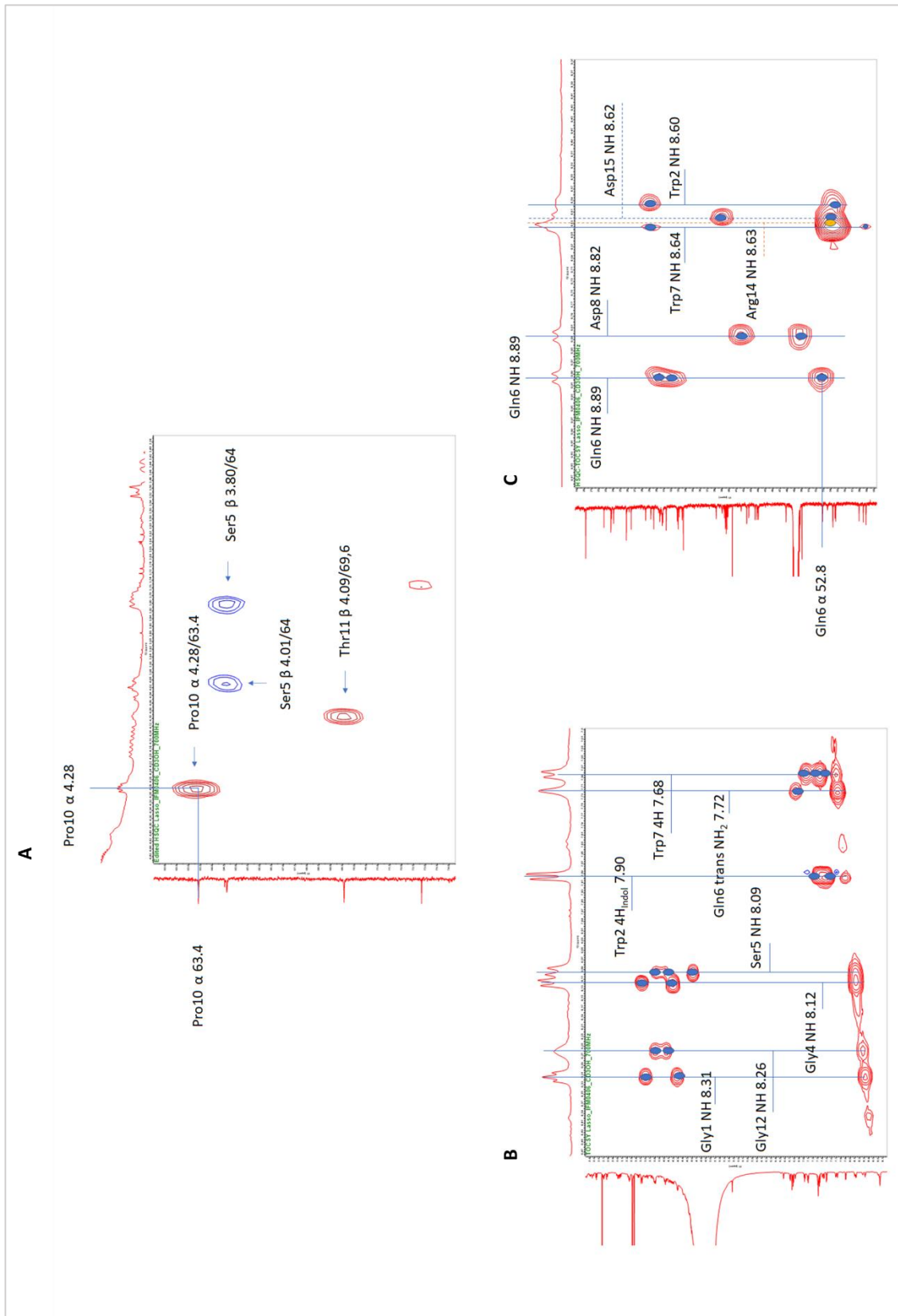


Abbildung 50 Strukturaufklärung Nocapeptin A – Übersicht. A: ^1H - ^{13}C edT HSQC Spektrum (blau: CH_2 ; rot: CH/CH_3); B: ^1H - ^1H TOCSY Spektrum; C: ^1H - ^{13}C HSQC TOCSY Spektrum. Die senkrechten Linien veranschaulichen die Korrelationen der Startkerne mit den Kopplungspartner (je nach Spektrum Wasserstoff- bzw. Kohlenstoffatome) und dienen zur Identifizierung der jeweiligen Aminosäuren auf Grundlage der beteiligten Spinsysteme.

7.2.2. Verknüpfung der Aminosäuren zur Peptidsequenz

Nachdem die fünfzehn einzelnen Aminosäuren anhand der spektroskopischen Daten identifiziert wurden und mit den vorhergesagten Bausteinen der bioinformatischen Analyse übereinstimmten, wurden diese Fragmente, auf Grundlage der zweidimensionalen NMR-Experimente, zur vollständigen Aminosäuresequenz verbunden.

Hierzu wurden in Summe drei verschiedene ^1H - ^{13}C HMBC Spektren aufgenommen: im ersten Spektrum zeigten sich nicht alle für die Zuordnung und Verknüpfung benötigten Signale, weswegen noch einmal ein identisches Spektrum einer etwas konzentrierteren Probe vermessen wurde, in der Hoffnung auch weitere (zusätzliche) Signale detektieren zu können. Zudem wurde ein speziell auf die Carbonyl-Region fokussiertes Spektrum, ein so genanntes band-selective ^1H - ^{13}C HMBC, aufgenommen, um den Auflösungsbereich zwischen den einzelnen Carbonyl-Signalen zu vergrößern und somit die Auswertung und Zuordnung der entsprechenden Signale zu erleichtern.²²⁹ Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 gezeigt.

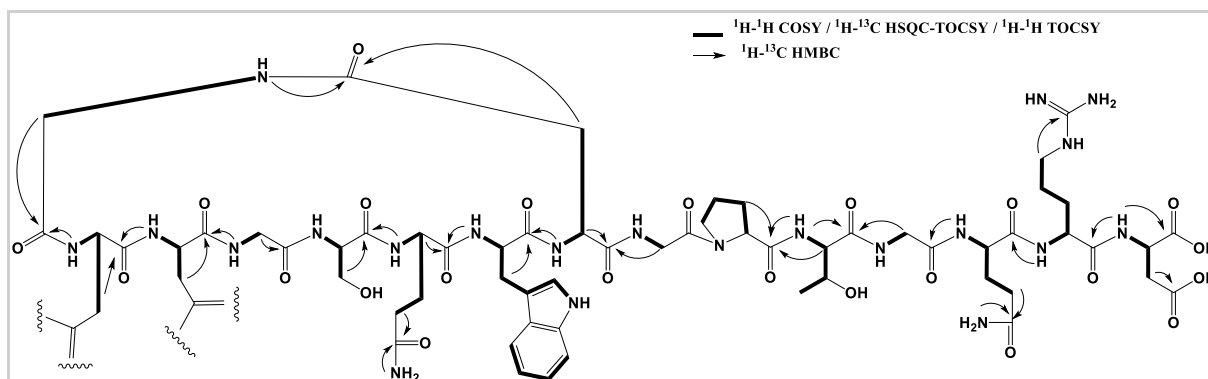


Abbildung 51 ^1H - ^{13}C HMBC basierte Schlüsselkorrelationen zur Verknüpfung der Aminosäure-Fragmente zur finalen Peptidsequenz.

Für die Verknüpfung der benachbarten Fragmente wurden die $^2J_{\text{C,H}}$ und $^3J_{\text{C,H}}$ Kopplungen in den jeweiligen ^1H - ^{13}C HMBC Spektren zwischen den Wasserstoffatomen der Aminosäure-Seitenketten (im Regelfall ausgehend von den α - und β -Positionen) mit den Carbonylgruppen der benachbarten Aminosäure herangezogen und so schlussendlich zum Gesamtpeptid verknüpft. Anhand der Kopplungen im ^1H - ^{13}C HMBC Spektrum zwischen den β -Methylengruppen und den Nachbaratomen innerhalb der Arylgruppen konnten auch die drei Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren (2xTrp und 1xTyr) mit dem linearen Molekülteil verknüpft werden. Die Verknüpfung zwischen den β -Kohlenstoffen und den Indol-Systemen der

beiden Tryptophan-Fragmente wurde zudem anhand der typischen allylischen $^4J_{H,H}$ Kopplung im 1H - 1H TOCSY Spektrum belegt.²³⁰ Die Guanidin-Gruppe des Arginins wurde anhand einer entsprechenden 3J -Kopplung mit dem ζ -Kohlenstoff zugewiesen.

7.2.3. Quervernetzung der Seitenketten im Tryptophan-Tyrosin-Motiv

Bei der Auswertung des 1H NMR Spektrums konnte lediglich ein typisches Signal für Indol-Amingruppen, im Bereich zwischen 10-11 ppm, detektiert werden, obwohl nachweislich zwei Tryptophan-Bausteine innerhalb des Lasso-peptid-Ringes eingegliedert sind. Da aus den Vorarbeiten bekannt war, dass es innerhalb des Tyr-Trp-Gly Motivs zu einer Strukturmodifikation kam, die mit dem Verlust zweier Wasserstoffatome einherging, deutet das Fehlen dieses Signals auf eine Beteiligung der Amingruppe an dieser Modifikation, im Sinne einer N-X-Verknüpfung, hin. Auch im 1H - ^{15}N HSQC Spektrum konnten für dieses Amin-Indol keine $^1J_{N,H}$ Kopplung zugeordnet werden, was als klarer Hinweis auf eine tertiäre Amingruppe gelten musste. Außerdem fehlten die charakteristischen Arylsignale eines AA'XX'-Spinsystems des Phenol-Tyrosins, das, aufgrund seiner Symmetrie und der damit verbundenen höheren Signalintensität, normalerweise leicht zu identifizieren gewesen wäre.²³¹ Anstelle dessen trat aber ein für aromatische Systeme relativ ungewöhnliches Signal bei δ_H 5.46 auf. Da Gly1 ausgehend von den bisherigen Untersuchungen keine Modifikation zeigte, deutete somit alles auf eine N-C-Quervernetzung zwischen dem Indol-NH des Tryptophans und einem aromatischen Kohlenstoff der Phenolgruppe des Tyrosins hin.

Der Nachweis einer so gearteten Verknüpfung mittels NMR-Spektroskopie ist nicht trivial, da die klassischen Experimente auf Kopplungen zwischen Kohlenstoff- und Wasserstoffkernen ausgelegt sind. Da aber solche Kopplungen selten über Heteroatome, wie etwa Stickstoff, hinweg Signale erzeugen, war es somit kaum wahrscheinlich, dass sich diese kovalente Verknüpfung mit klassischen 1H - ^{13}C HMBC Experimenten nachweisen lassen würden. Deshalb wurde ein 1H - ^{15}N HMBC Experiment ausgewählt, um diese Bindung, ausgehend von den Wasserstoffen des Tyrosin-Phenols zum tertiären Amin der Indol-Funktion des Tryptophans, nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 veranschaulicht. Die Aufklärung der strukturellen Zusammenhänge innerhalb des betrachteten Trp-Tyr-Fragments wurde dadurch erschwert, dass sowohl Tyr3 NH als auch Trp2 H2_{Indol} mit δ_H 6.74 eine

identische chemische Verschiebung aufwiesen, was durch das ^1H - ^{13}C - bzw. ^1H - ^{15}N HSQC Experiment klar belegt werden konnte. Im ^1H - ^{15}N HMBC Spektrum zeigten sich für das betrachtete Fragment drei Kopplungen. Zum einen die erwartbare Kopplung innerhalb der Amidfunktion von Tyr3 ($^1J_{\text{N,H}}$), die so auch schon aus dem ^1H - ^{15}N HSQC Experiment bekannt war. Zudem zeigten sich zwei Kopplungen mit einem bisher unbekanntem (tertiären) Stickstoff (δ_{N} 120.8). Das Signal bei δ_{H} 6.74 / δ_{N} 120.8 belegte, dass der koppelnde Stickstoff innerhalb der Indolgruppe liegen musste. Die Kopplung zwischen Tyr3 H2_{Phenol} und Trp2 N fungierte somit als eindeutiger Nachweis, dass die Verknüpfung zwischen den beiden Arylgruppen von Tyrosin und Tryptophan liegen musste.

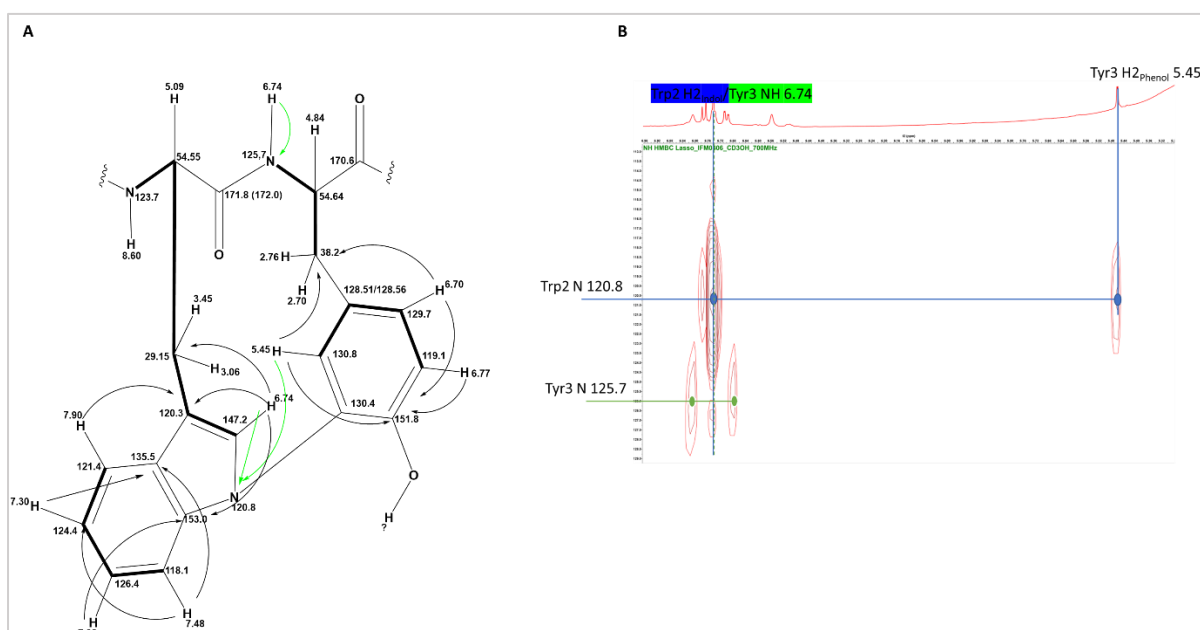


Abbildung 52 ^1H - ^{15}N HMBC NMR Spektrum von Nocapeptin A. A: Strukturausschnitt des Trp-Tyr-Motivs mit den für die Strukturanalyse notwendigen Schlüsselkorrelationen. ^1H - ^1H COSY / ^1H - ^1H TOCSY / ^1H - ^{13}C HSQC TOCSY: dicke Bindungen; ^1H - ^{13}C HMBC: schwarze Pfeile; ^1H - ^{15}N HMBC: grüne Pfeile. B: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{15}N HMBC Spektrum mit der Kopplung zwischen Tyr3 H2_{Phenol} und Trp2 N zum Beweis der Quervernetzung.

Außerdem ergab auch die Multipllett-Analyse des entsprechenden ^1H -Spektrums, dass es sich um einen *ortho*- und *para*-disubstituierten Phenolring handeln musste, was sich durch die meta-Kopplung ($^4J_{\text{H,H}}$) zwischen Tyr3 H2_{Phenol} (δ_{H} 5.45 (d)) und Tyr3 H6_{Phenol} (δ_{H} 6.70 (dd)) klar belegen ließ. Um die Quervernetzung aber noch weiter abzusichern, wurde in der Literatur nach ähnlichen Verbindungen gesucht: 2017 wurde von Clardy und seiner Gruppe das Peptid Tryptorubin A (isoliert aus *Streptomyces* sp. CLI2509) beschrieben, das ein nahezu identisches Strukturmotiv einer N-C-Verknüpfung von Trp N und Tyr C2_{Phenol} aufweist.²³² Wie eine kürzlich publizierte Studie zeigte, handelt es sich hierbei auch um ein ribosomales Peptid, wobei die

jeweiligen kovalenten Bindungen, der drei zusätzlichen C-C- und C-N- Verknüpfungen innerhalb der Ringstruktur, nachweislich von einer CYP P450 Monooxygenase ausgebildet wurden.²³³

Der in Abbildung 53 gezeigte Vergleich belegt eine hohe Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen der beiden betrachteten Fragmente, wobei insbesondere die hochfeldverschobene CH-Gruppe des Tyrosins (δ_{H} 5.76 zu δ_{H} 5.45) als charakteristisches Strukturmerkmal dieser so gelagerten C_{Phenol}-N_{Indol}-Verknüpfung identifiziert werden konnte.

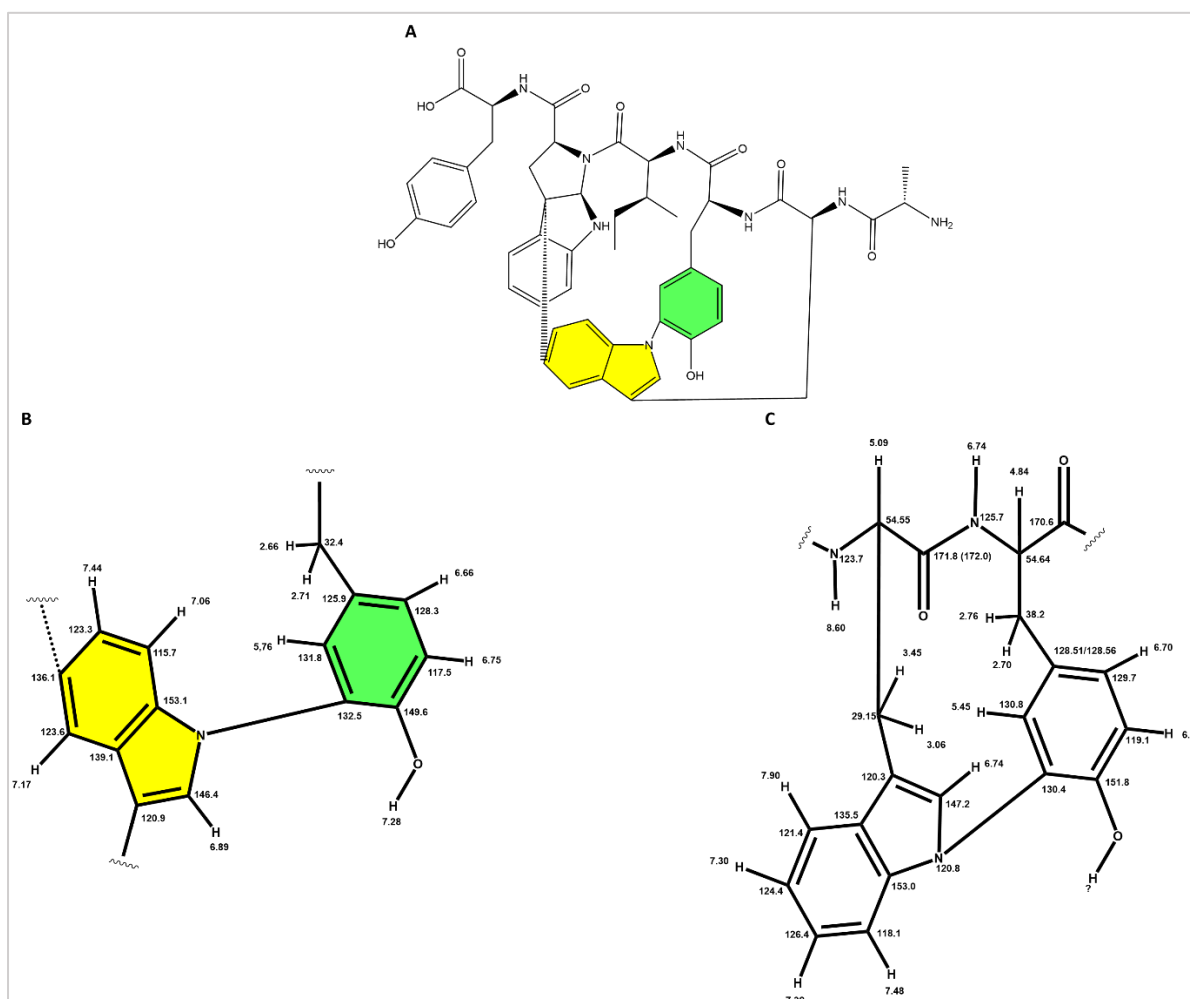


Abbildung 53 Vergleich von Nocapeptin A mit Tryptorubin A.²³² A: Struktur von Tryptorubin A; B: Kovalente Verknüpfung von Trp-Tyr via Indol-Amin mit den jeweiligen chemischen Verschiebungen von Tryptorubin A; C: Kovalente Verknüpfung von Trp-Tyr via Indol-Amin mit den jeweiligen chemischen Verschiebungen von Nocapeptin A.

Um diese ungewöhnliche Verknüpfung aber auch noch experimentell besser belegen zu können, wurde mit dem ^1H - ^{13}C LR-HSQMBC-Experiment eine speziell auf Fernkopplungen (4J und mehr) optimierte Pulssequenz gewählt, um so noch weitere Korrelationen zwischen den beiden Ringsystemen nachweisen zu können.²³⁴ Die

Ergebnisse sind in Abbildung 54 dargestellt. Auch hier musste wieder die identische chemische Verschiebung (δ_H 6.74) von Trp2 H2_{Indol} und Tyr3 NH berücksichtigt werden. Die Messungen wurde bei 4 Hz durchgeführt, was insbesondere $^3J_{C,H}$ Fernkopplungen begünstigte. Prinzipiell wären somit auch der Nachweis von $^5J_{C,H}$ und $^6J_{C,H}$ Kopplungen, ausgehend von Tyr3 NH, möglich gewesen. Gemäß Literatur würden solche Signale aber nur sehr schwache Signalmuster erzeugen.²³⁴ Basierend auf diesen Erkenntnissen, waren die in Abbildung 54 gezeigten Kopplungen innerhalb des Indolsystems zweifelsfrei durch Wechselwirkungen mit Trp2 H2_{Indol} verursacht. Die Signale wiesen eine deutliche Intensität auf und waren in ihrer Gesamtheit nur ausgehend von Trp2 H2_{Indol} plausibel zu erklären. Die Intensität der Signale war zudem ähnlich zu den detektierten Signalechos im Phenol des Tyrosins. Die Tatsache, dass sich hier also auch intensive Kreuzpeaks zeigten, in Verbindung mit der Beobachtung, dass im gesamten Spektrum keine weitere Korrelation für eine $^5J_{C,H}$ und $^6J_{C,H}$ Kopplung nachgewiesen werden konnten, ermöglichten es somit die entsprechenden Signale Trp2 H2_{Indol} zuzuweisen und als $^3J_{C,H}$ und $^4J_{C,H}$ zu bestimmen.

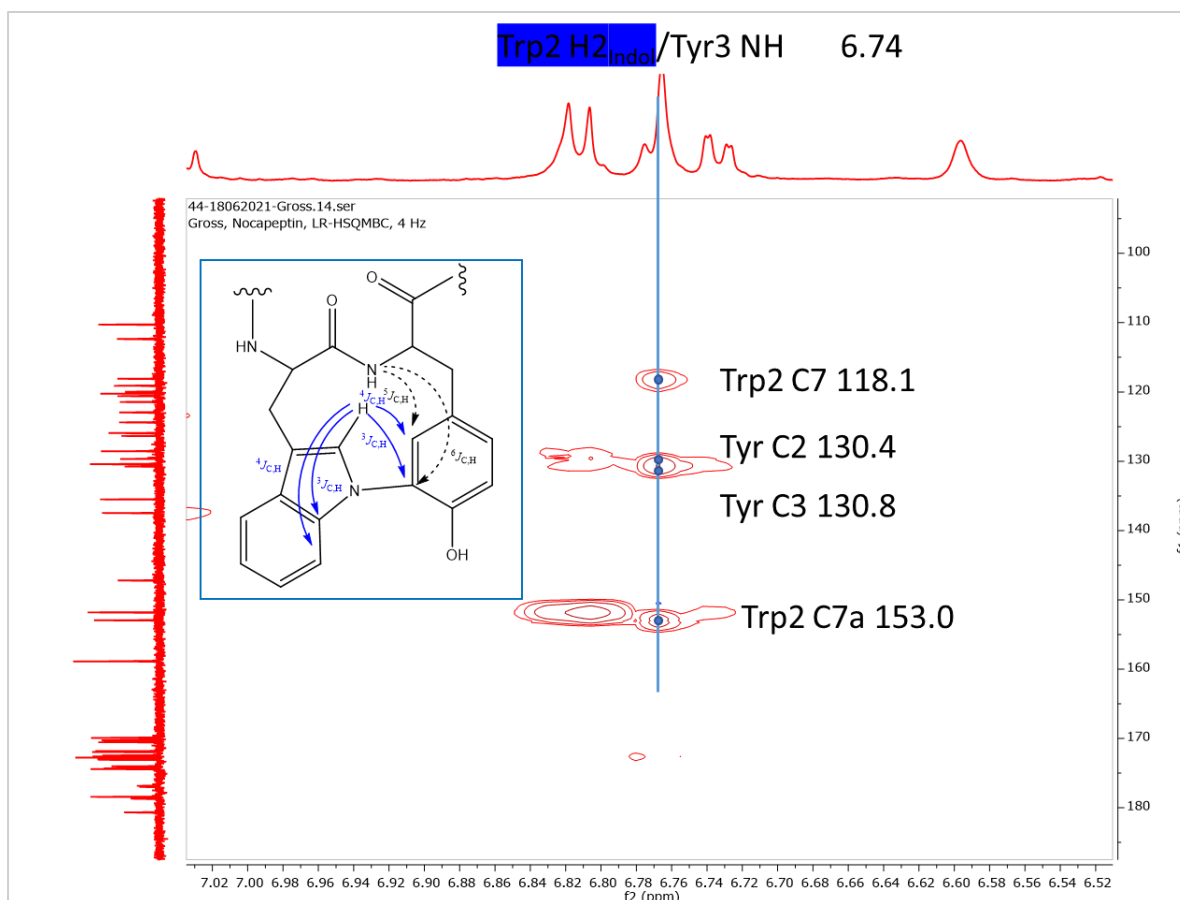


Abbildung 54 1H - ^{13}C LR-HSQMBC Spektrum (4 Hz) von Nociceptin A. Ausschnitt aus dem Spektrum. Die Kopplungspartner sind jeweils benannt. Blaue Pfeile: zugeordnete Korrelationen; schwarze Pfeile: theoretisch mögliche Kopplungen.

7.2.4. Analyse des ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrums von Nocapeptin A

Auf Grundlage der im ^1H - ^1H NOESY Spektrum zugeordneten dipolaren Kopplungen, die räumliche Nachbarschaften von Wasserstoffatomen anzeigen, ist es möglich, die dreidimensionale Struktur von Lassopeptiden zu bestimmen.²³⁵ Durch NOE-Kontakte von räumlich benachbarten Aminosäuren, die aber gemäß der Aminosäureabfolge weit voneinander entfernt sind, konnte klar gezeigt werden, dass der lineare Peptidteil – wie bei Lassopeptiden üblich – durch den Ring hindurchgefädelt ist. Die räumlichen Zusammenhänge sind in Abbildung 55 veranschaulicht. Die dipolaren Kopplungen wurden aber auch für einen weiteren Beleg der Aminosäuresequenz herangezogen. Die entsprechenden Korrelationen sind in Abbildung 56 dargestellt.

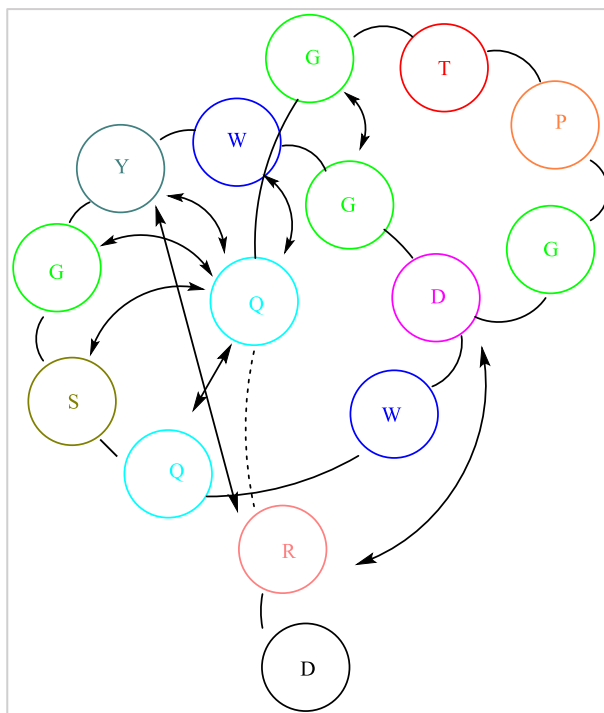


Abbildung 55 ^1H - ^1H NOESY Schlüsselkorrelationen zur Ableitung der räumlichen Ausrichtung von Nocapeptin A. NOE-Interaktionen sind als Doppelpfeile dargestellt.

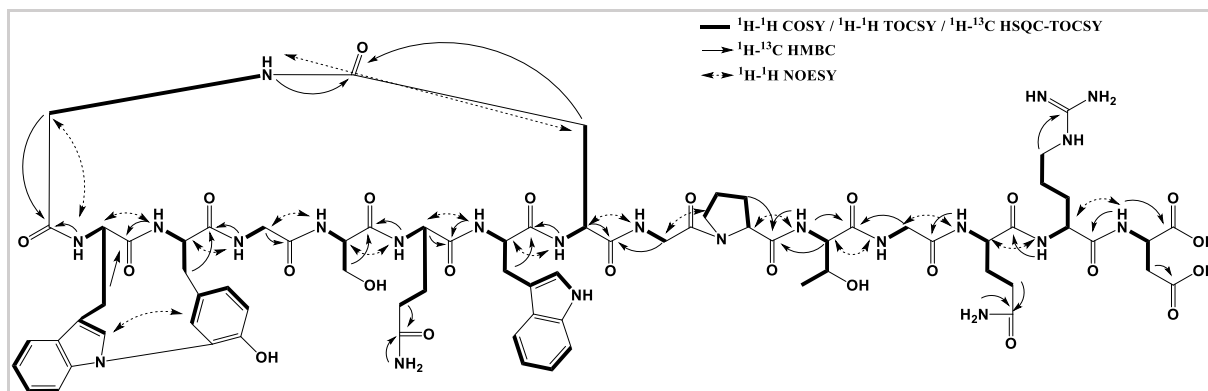


Abbildung 56 ^1H - ^1H NOESY Korrelationen zum Beweis der Aminosäuresequenz.

7.2.5. Sekundärstruktur der Glycin-Prolin-Peptidbindung

Aufgrund seiner zyklischen und damit rigiden Struktur kann Prolin in Peptiden und Proteinen mit den N-terminal verbundenen Aminosäuren sowohl *cis*- als auch *trans*-konfigurierte Peptidbindungen ausbilden (vgl. Abbildung 57).²³⁶ Der Charakter der Bindung kann dabei von den chemischen Verschiebungen der β - und γ -Kohlenstoffe des Prolins im ^{13}C NMR Spektrum abgeleitet werden, wobei empirisch gezeigt wurde, dass weniger die Absolutwerte, sondern vielmehr die Differenz der jeweiligen Verschiebungen zwischen den β - und γ -Kohlenstoffen valide und robuste Daten liefern und deswegen zur Bestimmung der Geometrie herangezogen werden sollten. Typischerweise liegen die Differenzen für *cis* bei $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ 8-11 ppm und für *trans* bei $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ 3-6 ppm.²³⁷ Die Differenz von ~ 5.5 ppm deutet somit auf eine *trans* Konfiguration der Peptidbindung zwischen Gly9 und Pro10 in Nocapeptin A hin. Allerdings sind Zuweisungen bei Differenzen von >4.8 ppm (zumindest bei Strukturuntersuchungen von Proteinen) nicht komplett valide, da im Bereich zwischen 4.8-9.15 ppm sowohl *cis*- als auch *trans*-Konfigurationen vorkommen können, weshalb hier die klassische Zuordnung auf Grundlage des ^1H - ^1H NOESY Spektrums empfohlen wird. Zeigen sich

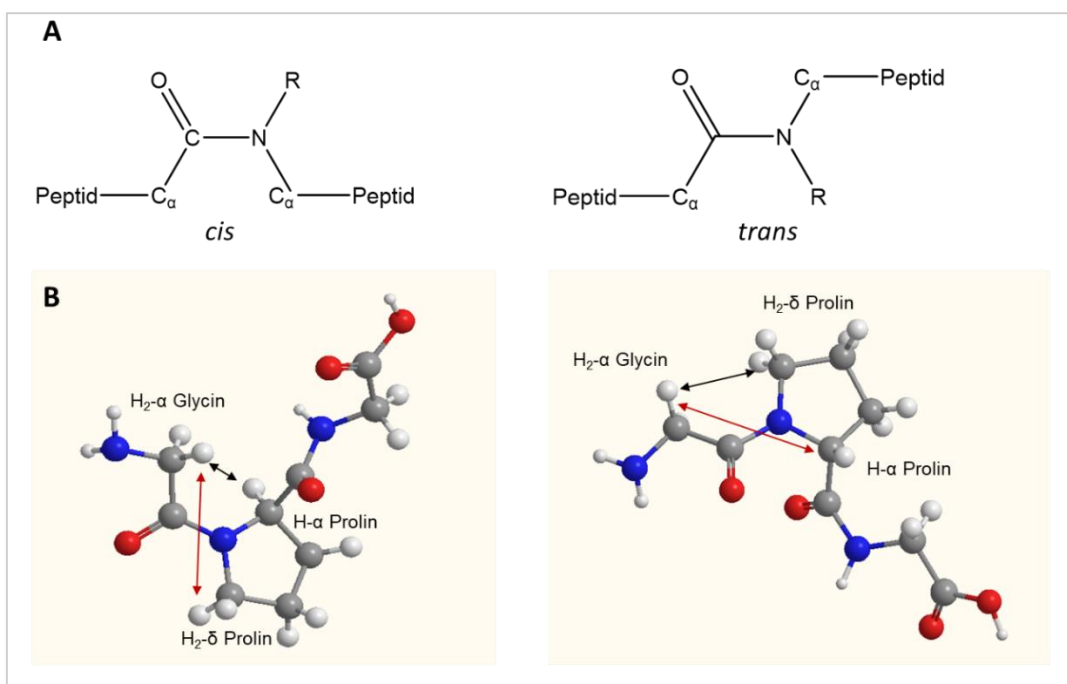


Abbildung 57 *cis-trans* Isomerie der X-Prolin-Bindung in Peptiden. A: Valenzstrichformel-Darstellung zu den vorherrschenden Geometrien, gezeichnet nach Deber et al.²³⁸ B: dreidimensionale Darstellung am Beispiel des Tripeptids Gly-Pro-Gly. Charakteristische NOE-Kontakte zwischen Glycin (N-terminal) und Prolin sind durch Doppelpfeile angezeigt; schwarze Pfeile geben mögliche Signale an, rote Pfeile illustrieren zu große Distanzen für (starke) dipolare Kopplungen – Erklärung im Text. Farbschema – rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grau: Kohlenstoff, weiß: Wasserstoff. Peptid mit ChemDraw simuliert; Aufsicht auf die *cis*- und *trans*-Bindungen abgeleitet von Grathwohl und Wüthrich.²³⁹

hierbei starke Kopplungen zwischen den beiden α -Wasserstoffen der N-terminalen Aminosäure und Prolin, so handelt es sich um eine *cis* Konfiguration. Bei Korrelationen zwischen dem α -Wasserstoff der N-terminalen Aminosäure und dem δ -Wasserstoff von Prolin, liegt eine *trans* Konfiguration vor.²⁴⁰ Die Zusammenhänge sind in Abbildung 57 dargestellt.

Im Spektrum von Nocapeptin A zeigten sich ausschließlich Kopplungen von Pro10 H₂- δ mit Gly9 H₂- α . Kopplungen von Pro10 H- α mit Gly9 H₂- α konnten nicht beobachtet werden. Somit ergab sich, auch auf der Grundlage der Auswertung des ¹H-¹H NOESY Spektrums, für die Gly9-Pro10 Peptidbindung eine *trans* Konfiguration.

7.2.6. Amidgruppe von Glycin 9

Die Amidgruppe von Gly9 hat mit δ_{H} 5.30 eine für Amidgruppen ungewöhnlich stark zu höherem Feld hin verschobene Resonanzlage. Typisch wären Verschiebungen um ~7-8.5 ppm.^{226, 227} Zudem war auffällig, dass sowohl im ¹H-¹H TOCSY- als auch im ¹H-¹³C HSQC-TOCSY Spektrum keine Korrelation zwischen den α -Wasserstoffen und dem Amid-Wasserstoff detektiert werden konnten. Lediglich im ¹H-¹H COSY Experiment konnte ein entsprechendes Signal nachgewiesen werden. Als Erklärung für die

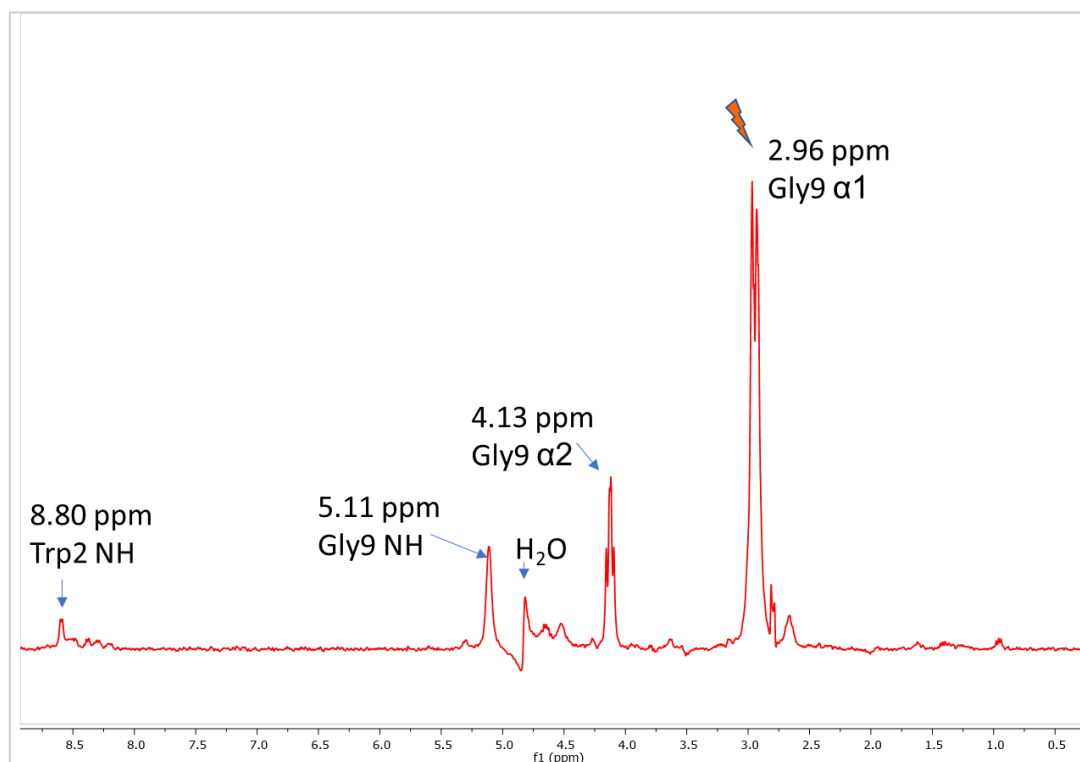


Abbildung 58 400 MHz selective Gradient 1D TOCSY Experiment. Anregungsfrequenz: 2.967 ppm.

ungewöhnliche chemische Verschiebung und die Anomalie in den zweidimensionalen Spektren bot sich zum einen die Nachbarschaft zu Trp7 mit seinem Arylsystem und den dadurch hervorgerufenen magnetischen Einflüssen an. Zum anderen nimmt Gly9 die „Scharnierposition“ zwischen dem Makrozyklus und dem linearen Peptidschwanz ein, was möglicherweise zu ungewöhnlichen Winkeln innerhalb des Molekülgerüsts führen könnte, die magnetische Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls beeinflussten. Um die Zuordnung noch weiter zu überprüfen und mit experimentellen Daten zu belegen, wurde deshalb Nocapeptin A nochmals am 400 MHz Spektrometer vermessen. Da somit die Magnetfeldstärke des Spektrometers im Vergleich zu den vorherigen Messungen variierte und auch die Probe für die Messung erneut gelöst wurde – was im Vergleich zu früheren Messungen zu veränderten Konzentrationen und schlussendlich insgesamt zu leicht veränderten chemischen Verschiebungen führte – mussten die entsprechenden Signale nochmals von Grund auf neu zugeordnet werden. Hierzu wurden mit den ^1H - ^1H DQF COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY und ^1H - ^1H NOESY Pulsen zahlreiche Experimente durchgeführt, um Gly9 zweifelsfrei identifizieren zu können. Um das Spinsystem von Gly9 final zu beweisen, wurden dann selective gradient 1D-TOCSY Experimente angewendet. Mit diesen Experimenten konnten selektiv einzelne Wasserstoffkerne angeregt werden, wobei das komplette Spinsystem dieses Kerns Signalmuster als Antwort auf den gesetzten Puls hervorruft. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 58 gezeigt. Die Anregung eines der α -Wasserstoffe der Methylengruppe von Gly9 rief als Signalecho ein Multiplett bei 5.11 ppm hervor, dass durch die weiteren Messungen zweifelsfrei als Gly9 NH identifiziert werden konnte. Somit konnte die ursprünglich, auf Grundlage des ^1H - ^1H COSY Spektrum gemachte, Bestimmung der chemischen Verschiebung von Gly9 NH mit δ_{H} 5.30 ppm (700 MHz-Set) mit weiteren Daten bestätigt werden, wobei sich die leichte Abweichung der chemischen Verschiebungen durch die veränderten Messbedingungen erklärte.

7.3. Weitere spektroskopische Untersuchungen

Um Nocapeptin A vollständig zu charakterisieren, wurden auch die dafür notwendigen IR- und UV-Spektren sowie das CD-Spektrum aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 59 zusammengefasst.

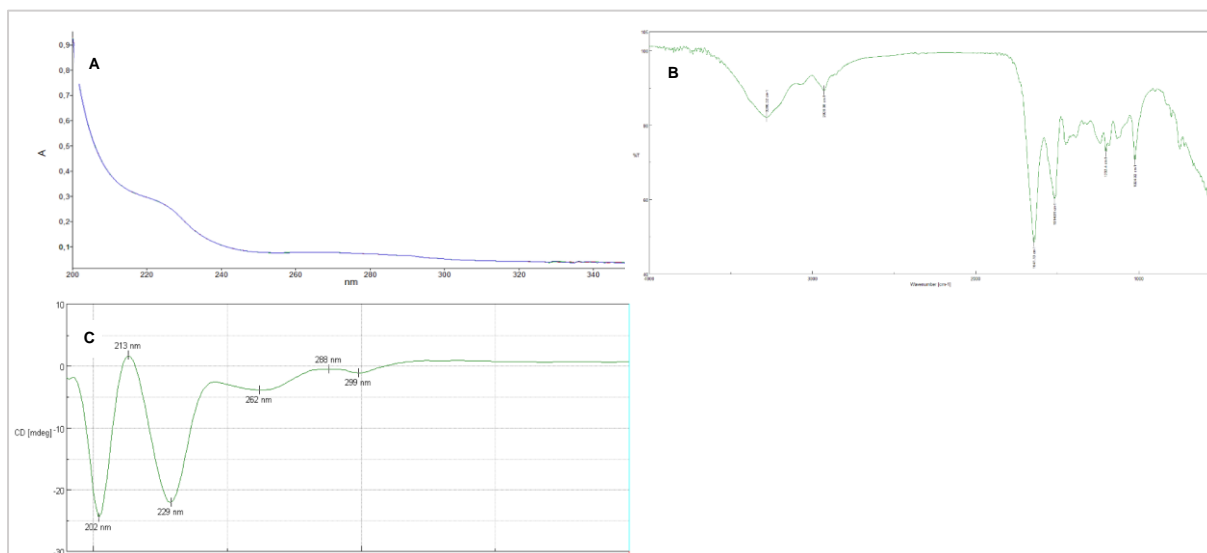


Abbildung 59 Spektroskopische Daten von Nocapeptin A – Zusammenfassung. A: UV-Spektrum; B: IR-Spektrum; C: CD-Spektrum.

Der spezifische Drehwert wurde als $[\alpha]_D^{24} -15.6$ ($c=0.64$, MeOH) bestimmt. Die Auswertung des IR-Spektrums ergab folgende Banden – mögliche Schwingungen sind anhand von Referenzwerten in der Literaturwerten identifiziert worden und jeweils angegeben²²⁷: FT-IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}): 3280 (OH st.), 2928 (Alkyl CH st.), 1641 (Amide CO st.), 1515 (AR C=C bend), 1202 (CO-O st.), 1024 (Ester CO st.). Das UV-Profil wurde in Methanol aufgenommen und ergab folgende Maxima: UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 220 sh (4.27), 272 (3.57) nm.

7.4. Bioaktivitätstestungen von Nocapeptin A

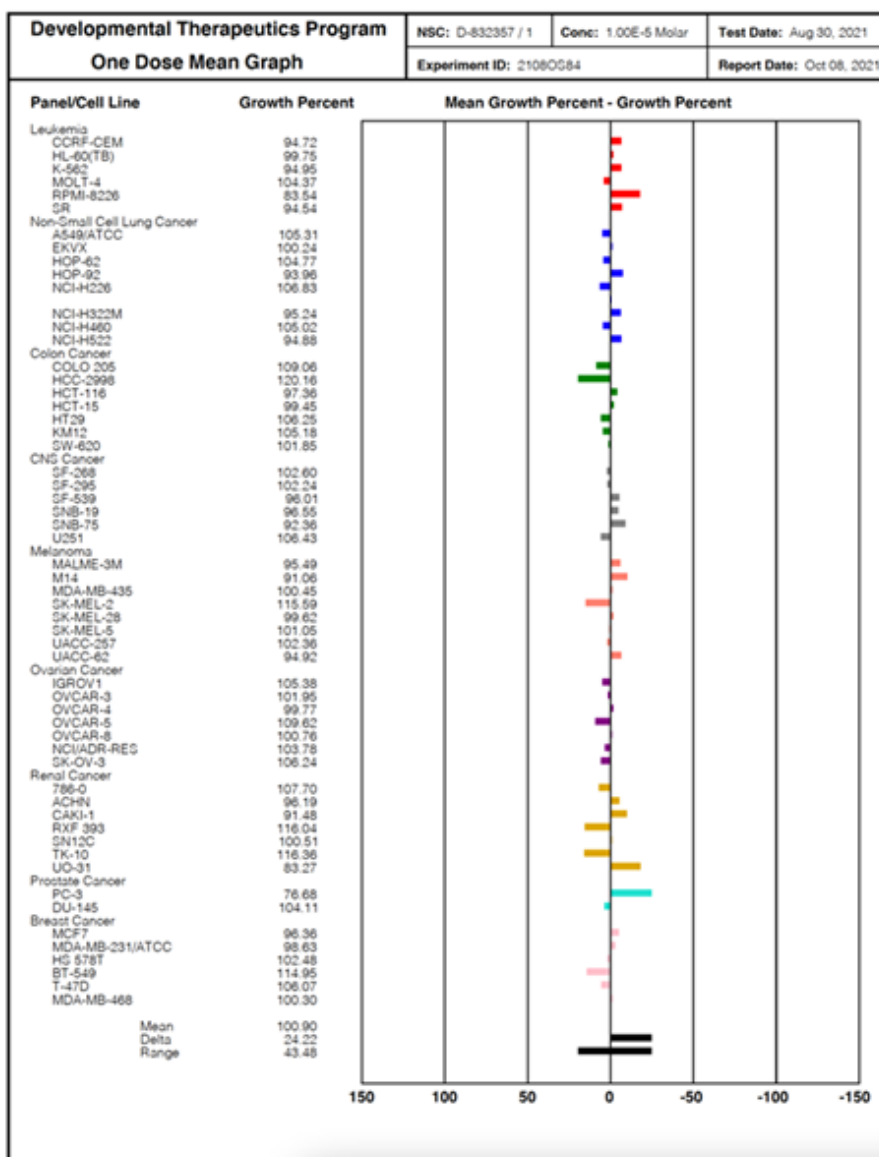
Lasso peptide gehören zu einer Naturstoffklasse, deren Vertreter zum Teil potente Bioaktivitäten zeigen (vgl. Kapitel 4.4.2. *Lasso peptide sind bioaktive Substanzen*). Allerdings gibt es keine Klassentypen-spezifische Bioaktivität, obschon oftmals antibiotische Aktivitäten für die einzelnen Vertreter beschrieben wurden.²⁰⁸ Deswegen wurde ein Bioaktivitätsscreening durchgeführt, um mögliche biologische Funktionen von Nocapeptin A benennen zu können.

7.4.1. Zytotoxizität

Die Testungen wurden vom National Cancer Institute, USA, durchgeführt.

Zur Bestimmung der Antitumor-Aktivität von Nocapeptin A wurden 10 mg der Reinsubstanz an das *National Cancer Institute* (NCI) gesendet und im Rahmen des Developmental Therapeutics Program als Einzeldosisgabe gegen 60 verschiedene humane Krebszelllinien getestet. Bei allen Testungen zeigte sich jedoch, dass Nocapeptin A unter den gegebenen Bedingungen keine biologischen Effekte erzielen konnte. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 19 Zytotoxizität Nocapeptin A. Übersicht der Ergebnisse im Rahmen des NCI 60 One Dose Cytotoxicity screening. Hierbei wurde Nocapeptin A gegenüber 60 verschiedenen Tumor-Zelllinien getestet. Aufgrund einer Information des NCI, dass die Identität der NCI-H23 Zelllinie nicht mehr gewährleistet war, wurde das Ergebnis auf Bitten des NCI aus der Übersicht entfernt, weswegen nur 59 Ergebnisse in der Tabelle gezeigt werden.



7.4.2. Antibakterielle Aktivität

Die Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Professor Brötz-Oesterhelt, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt.

Der antibakterielle Effekt von Nocapeptin A wurde gegenüber einem Testpanel, das neben klassischen Vertretern der „ESKAPE“-Linie¹⁶⁰ – (Krankenhaus)Keime, die oft Multiresistenzen aufweisen und zu denen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter*-Spezies gezählt werden – auch ein Mykobakterium, *Bacillus subtilis*, und zwei Bakterien der Gattung *Neisseria* sowie *E. coli* beinhaltete. Es zeigte sich eine moderate Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus* (MHK 16 µg/ml), gegenüber den anderen Testorganismen konnte selbst bei der höchsten Konzentration keine antibiotische Aktivität nachgewiesen werden (MHK >64 µg/ml). Tabelle 20 listet die Ergebnisse auf.

Tabelle 20 Antibakterielle Effekte von Nocapeptin A – Übersicht.

Bakterienstämme	MHK (µg/ml)	Assay-Medium	
<i>Bacillus subtilis</i> 168	>64	MH II broth	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	>64		
<i>Enterococcus faecium</i> BM 4147-1	>64		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>64		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>64		
<i>Escherichia coli</i> HN 818	>64		
<i>Escherichia coli</i> HN 818 (+ 15 µg/ml PMBN)	>64		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 12657	>64		
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	>64		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>64		
<i>Acinetobacter baumannii</i> 09987	>64		
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	16		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	>64		MH II broth
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> S 1441	>64		+ 2,5 % FBS
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	>64	7H9 broth	

7.5. Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Aktinobakterien gelten als einer der reichhaltigsten Quellen von Naturstoffen.^{241, 242} Insofern ist es kaum verwunderlich, dass auch aus der Gattung *Nocardia*, die zur Gruppe der seltenen Aktinobakterien zugeordnet wird, verschiedenste und strukturell vielfältige Naturstoffe isoliert werden konnten. Teilweise zeigten die Verbindungen in biologischen Testungen außergewöhnliche Aktivitäten, sodass der Gattung bzw. den von diesen Organismen gebildeten Substanzen ein hohes biomedizinisches Potential zugeschrieben wird. Die Fähigkeit, diese hoch aktiven und oftmals auch immunmodulierenden Moleküle zu bilden, wird, im Zusammenhang zwischen der metabolischen Kapazität und der Pathogenität klinischer Isolate, als relevanter Schutzmechanismus der Bakterien diskutiert, um in (menschlichen) Wirtsorganismen überleben zu können.²⁴³⁻²⁴⁵

Die bisher aus *Nocardia* spp. beschriebenen Naturstoffe umfassen nahezu alle biosynthetisch bekannten Klassen und zeigen eine hohe chemische Diversität. Es fällt allerdings auf, dass, in Relation zur Gesamtzahl der von *Nocardia* spp. gebildeten Naturstoffe, bisher relativ wenige ribosomal gebildete Peptide isoliert wurden, wobei diese aber durchaus chemische Besonderheiten aufwiesen.^{243, 246, 247}

Insofern verwundert es nicht, dass auch, das in der Arbeit von Herrn Dr. Saad erstmalig erwähnte und in dieser Arbeit strukturell vollständig charakterisierte Lassozeptid, Nocapeptin A neue Merkmale trägt und so die Lassozeptid-Familie in besonderer Weise ergänzt.²²⁴ Das 15 Aminosäuren umfassende Peptid bildet klassentypisch den ersten Makrolaktamring zwischen den Aminosäuren in Position 1 und 8 aus. Anhand des ¹H-¹H NOESY Spektrums konnte ebenfalls dargelegt werden, dass der lineare Teil durch diesen Ring hindurch gefädelt wurde, womit die Verbindung zweifelsfrei als Lassozeptid identifiziert werden konnte. Aufgrund der fehlenden Disulfidbrücken ist das Peptid somit strukturell der Klasse II der Lassozeptide zuzuordnen (vgl. Abbildung 46). Allerdings ist es das erste Lassozeptid überhaupt, das, neben dem Makrozyklus und klassentypischen Disulfidbrücken-Verknüpfungen, einen zusätzlichen Ring zwischen zwei benachbarten Aminosäuren ausbildet und es stellt somit einen komplett neuen Vertreter dieser Peptide dar.

Neue Strukturvariationen, vor allem im Sinne der Erstbeschreibung, müssen zu Anfang kritisch betrachtet werden und sollten aus diesem Grund, wann immer möglich, von mehreren Perspektiven aus beurteilt werden. Die Struktur ist, aus analytischer

Perspektive, spektroskopisch über verschiedenste Experimente abgesichert und belegt, sodass an der Existenz der oxidativen Quervernetzung zwischen Tyrosin und Tryptophan kein Zweifel besteht. Aus einer Vielzahl an chemisch-biologischen Studien ist bekannt, dass Lasso peptide verschiedenste posttranslationale Modifikationen aufweisen können, aber bis zum jetzigen Zeitpunkt war eine zusätzliche (oxidative) Quervernetzung zur Ausbildung weiterer zyklischer Systeme – von den bei manchen Klassen vorhandenen Disulfidbrücken abgesehen – gänzlich unbekannt.²⁴⁸ Insofern sind biosynthetische Vergleiche mit anderen Lasso peptiden nicht möglich, gleichwohl kann aber dieses Strukturmotiv mit weiteren ribosomal und posttranslational modifizierten Peptiden abgeglichen und auf seine biosynthetischen / enzymatischen Ursprünge hin untersucht werden.

Ribosomal gebildete Peptide weisen eine nahezu unvorstellbare Vielfalt an modifizierten chemischen Entitäten auf, wobei auch Quervernetzungen und Makrozyklisierungen häufig beschrieben werden.^{180, 183, 249} Enzymatisch zeichnen sich hierfür vor allem rSAM-Enzyme (radical S-adenosylmethionine Enzyme) aber auch CYP P450 Monooxygenasen verantwortlich.^{183, 233, 250-257} Ausgehend von der Gencluster Analyse von Nocapeptin A darf davon ausgegangen werden, dass die C-N-Bindung zwischen Tyrosin und Tryptophan von einem CYP P450 Enzym ausgebildet wird.²²⁴

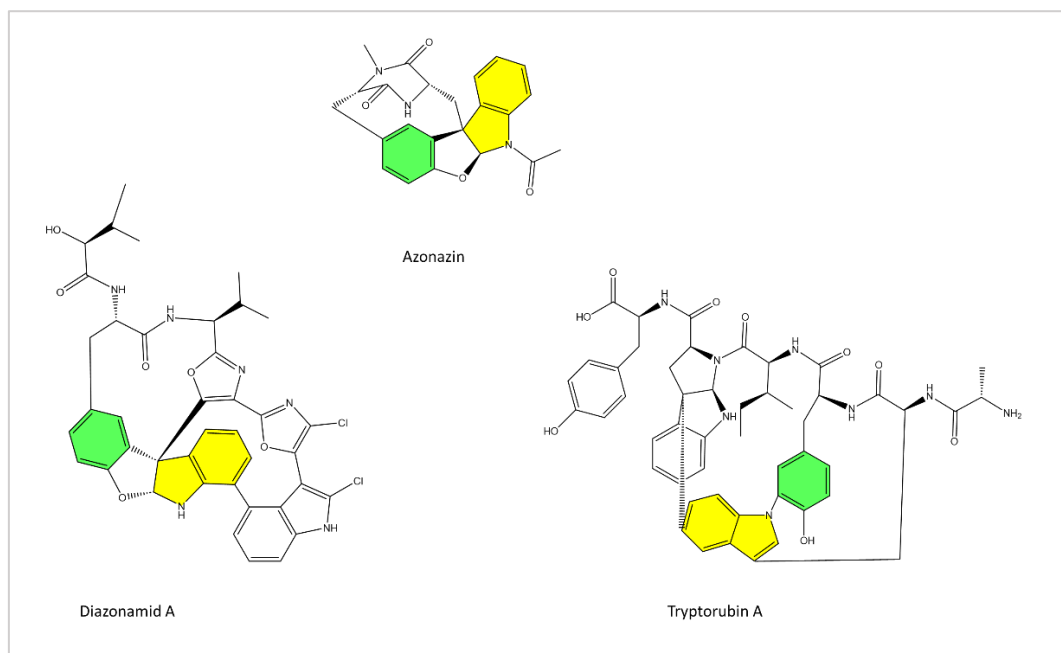


Abbildung 60 Peptide mit einer Quervernetzung zwischen der Indol (gelb) - und Phenol (grün) - Seitenkettenfunktion von Tryptophan bzw. Tyrosin.^{232, 258, 259} Darstellung von Diazonamid A und Azonazin nach Tang und Vincent.²⁶⁰

Eine derartige Verknüpfung ist allerdings innerhalb der gesamten Naturstofffamilie eine Rarität. Zyklische Peptide, die ihr Ringsystem von einer Tryptophan-Seitenkette ausgehend, zum Teil auch unter Einbeziehung der Indolaminfunktion, aufbauen, sind in der Literatur öfters beschrieben, aber, basierend auf einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2020, gibt es mit Azonazin, Diazonamid A und Tryptorubin A bisher nur drei bekannte peptidische Naturstoffe, die eine oxidative Quervernetzung (C-X-Verknüpfung; X: Heteroatom) zwischen einem Tryptophan- und Tyrosin-Baustein aufweisen (vgl. Abbildung 60).^{232, 258-264} Allerdings zeigt nur Tryptorubin A dabei eine Quervernetzung ausgehend von der Amin-Indolfunktion des Tryptophans. Auch eine jüngst erschienene Übersichtsarbeit von Kunakom et al., die detailliert auf die Beteiligung und Funktion von CYP P450 Enzymen innerhalb der RiPP-Biosynthese eingeht, gibt mit Tryptorubin A und Myxarylin zwar mehrere Beispiele für Moleküle mit von diesen Enzymen katalysierten C-N-Verknüpfungen an, die mit der kürzlich vorgestellten Peptidfamilie der Cihunamide sogar noch um einen weiteren Angehörigen ergänzt wurden. Allerdings ist Tryptorubin A auch hier der einzige Vertreter, der eine Indolamin-Verknüpfung ähnlich zu Nocapeptin A zeigt (vgl. Abbildung 61).^{254, 265, 266}

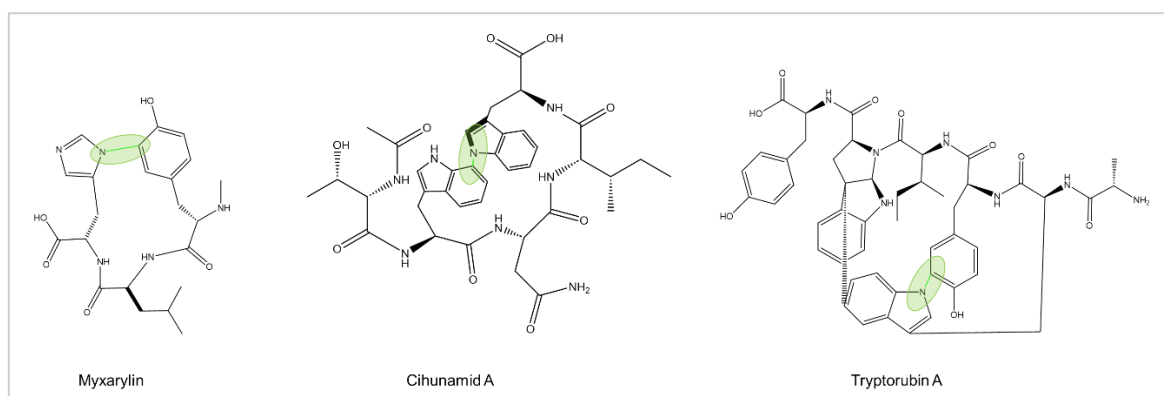


Abbildung 61 Ribosomale und posttranslational modifizierte Peptide – CYP-P450 katalysierte C-N-Verknüpfungen innerhalb der Seitenketten sind in Grün gezeigt.^{232, 265, 266}

Tryptorubin A ist ein Hexapeptid, das, aufgrund zweier zusätzlicher C-N- und einer weiteren C-C-Verknüpfungen, einen ausgeprägten polycyclischen Charakter aufweist.²³² Ursprünglich wurde es als NRPS-basiertes Peptid beschrieben, aber eine vor kurzem, von der Arbeitsgruppe um Eric Helfrich, publizierte Arbeit konnte zeigen, dass es sich auch hierbei um ein ribosomal gebildetes Peptid handelt, die Beteiligung eines CYP P450 Enzyms an der Biosynthese belegen und weitere Derivate mit einem ähnlichen Aufbau bestimmen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte, mit Tryptorubin A als Stammverbindung, die neue RiPP-Familie der Atropopeptide –

benannt nach der bei dieser Familie vorherrschenden stereochemischen Möglichkeit der Atropisomerie – begründet werden.²³³ Die bisher bekannten Mitglieder dieser Klasse sind in Abbildung 62 gezeigt.

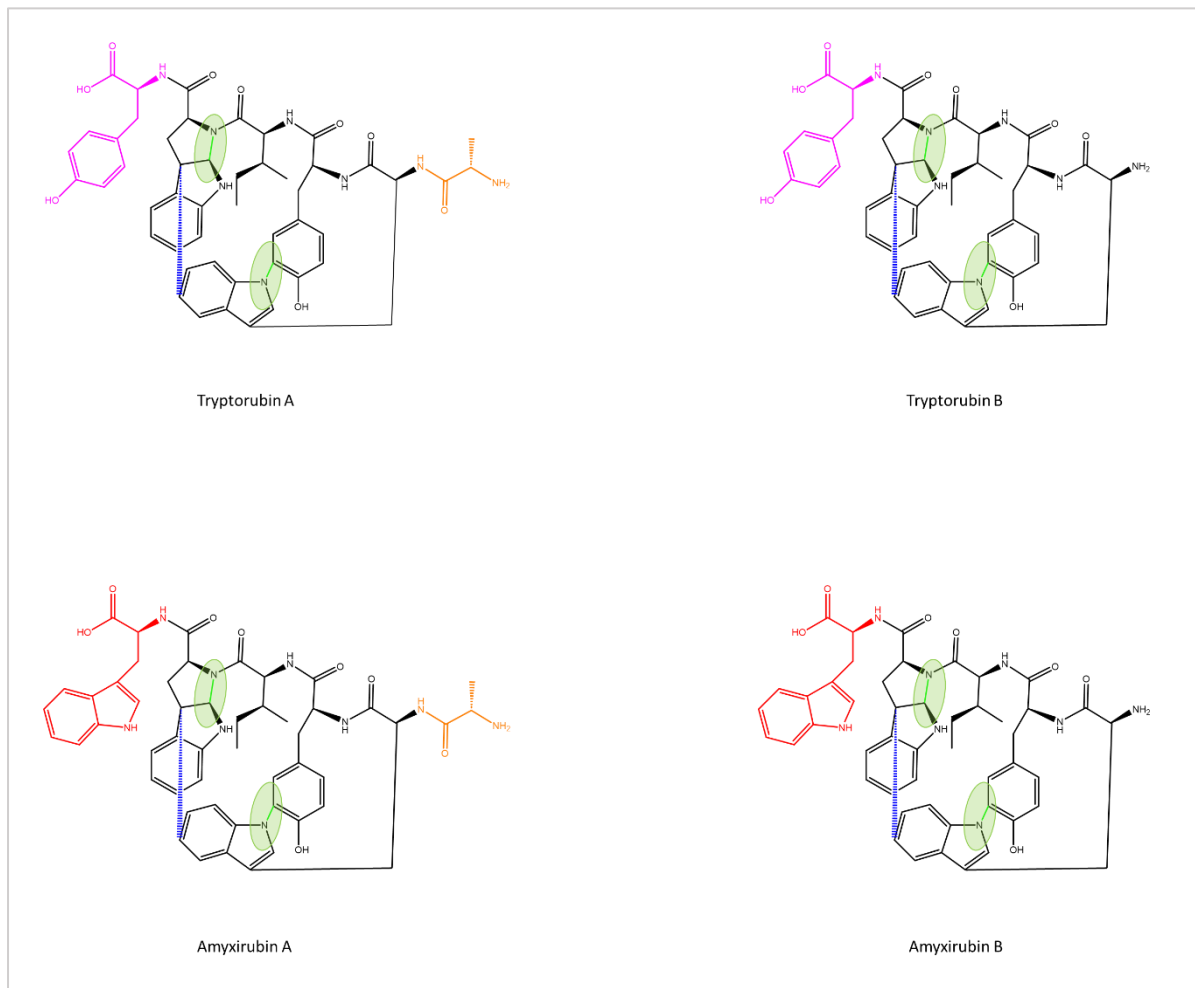


Abbildung 62 Atropopeptide – Übersicht der Verbindungen zur Darstellung der molekularen Verwandtschaft. CYP P450 katalysierte C-C Verknüpfungen (in Blau) und C-N-Verknüpfungen (in Grün) sind farblich markiert. Strukturelle Unterschiede innerhalb der Aminosäure-Sequenz der Peptide sind farblich hervorgehoben. Strukturen nach Nanudorn et al.²³³, Darstellung nach Wyche et al.²³²

Es handelt sich hierbei um vier Peptide, die sich lediglich in der Anzahl der verwendeten Aminosäuren unterscheiden. Die jeweiligen Hexapeptide weisen im Vergleich zu den Pentapeptiden N-terminal eine weitere Alanin-Gruppe auf. Die Amyxirubine unterscheiden sich außerdem von den Tryptorubinen bei der C-terminalen Aminosäure: bei den Amyxirubinen ist in dieser Position die heteroaromatische Aminosäure Tryptophan verbaut, bei den Tryptorubinen findet sich Tyrosin.

Auch unter biosynthetischen Gesichtspunkten konnte Nocapeptin A somit, auf Grundlage einer intensive Literaturrecherche, als biosynthetisch plausibles Peptid

charakterisiert werden. Zwar ist es das erste Lassozeptid, das eine derartige Modifikation aufweist, und auch in der gesamten RiPP-Familie ist dieses Teilmotiv ungewöhnlich, aber mit der Familie der Atropopeptide biosynthetisch abgesichert. Die, am Beispiel von Tryptorubin A durchgeführten, biochemischen Studien zur enzymatischen Darstellung des Grundgerüst belegen zudem das Potential von CYP P450 Monooxygenasen derartige oxidative Quervernetzungen katalytisch umzusetzen. Insofern darf diese katalytische Funktion auch bei der mit dem Nocapeptin A-Gencluster assoziierten Monooxygenase angenommen werden. Schlussendlich sind das allerdings nur theoretische Betrachtungen, die Nocapeptin A in seiner Gesamtheit als plausibel erscheinen lassen, aber einer wissenschaftlichen Prüfung bedürfen. Deshalb wäre es für die Zukunft wünschenswert, die komplette Biosynthese und insbesondere das mit dem Gencluster assoziierte CYP P450 Enzym experimentell eingehend zu untersuchen, um die theoretischen Überlegungen sowohl mit Daten untermauern als auch dessen Potential im Kontext der chemisch-biologischen Forschung und im Hinblick auf zukünftigen genome mining Ansätze bewerten zu können.

Lassopeptide zeigen grundsätzlich oftmals antibakterielle Wirkungen.²⁰⁸ Allerdings sind die antibakteriellen Effekte zum Teil nur auf wenige Testorganismen beschränkt und das Erregerspektrum, das die empfindlichen Erreger gegenüber dem jeweiligen Peptid beschreibt, variiert von Substanz zu Substanz, sodass bisher keine allgemeingültigen Aussagen bzw. Vorhersagen zum Wirkprofil und der Zusammensetzung der Testpanel gemacht werden konnten. Insbesondere die Arbeitsgruppe um James Link konnte aber durch eine Reihe neuerer Studien aufzeigen, dass Lassopeptide (von Proteobakterien) hauptsächlich gegenüber phylogenetischen Verwandten der Peptid-Produzenten antibiotische Wirkungen erzielen.^{213, 218, 267-269} Das führt zwangsläufig zu der Frage, warum nur nahverwandte Organismen empfindlich gegenüber den Peptiden sind und andere Spezies kaum Wechselwirkungen mit diesen Sekundärstoffen zeigen: aus diversen Untersuchungen ist bekannt, dass Lassopeptide von Proteobakterien oftmals über Transportsysteme, die verschiedene Membranproteine und Rezeptoren umfassen, in die Zellen aufgenommen werden und mit der RNA-Polymerase interagieren. Sind diese Systeme aber durch Mutationen verändert oder in ihrer Transport-Funktion gestört, können die Verbindungen, auch gegenüber ursprünglich empfindlichen Erregern, keine antibiotische Wirkung mehr erzeugen – die Bakterien zeigen eine Resistenz.^{212-214, 268-}

²⁷⁴ Basierend auf einer Studie von Do et al. scheint insofern die Vermutung naheliegend, dass die Transportsysteme, die zur Aufnahme der Substanzen benötigt werden, hochkonserviert sind, vermutlich eine (gewisse) Spezifität für die einzelnen Lasso-peptide aufweisen und offenbar nur bei anderen Bakterien-Spezies anzutreffen sind, die eine nahe genetische Verwandtschaft aufweisen.²⁷¹

Zu Lasso-peptiden von Aktinobakterien gibt es momentan noch relativ wenige publizierte Arbeiten, die die Aufnahme der Peptide in die Bakterienzellen und die molekularen Mechanismen der Wirkung im Detail untersuchten. Allerdings deutet sich an, dass Peptide dieser Bakteriengruppe vor allem mit der Zellwandbiosynthese interagieren und somit vermutlich ein anderes Target als die RNA-Polymerase adressieren.^{194, 211, 215} Zudem sind mit Chaxapeptin und Ulleungdin zwei Vertreter bekannt, die die Krebszellinvasion und -migration (beide Testungen wurden mit A459-Lungenkarzinomzellen durchgeführt) unterbinden.^{216, 217} Eine Zusammenstellung aller 15 Lasso-peptide, die auf Aktinobakterien zurückgehen und in Testungen antibakterielle Effekte zeigten, sowie deren Wirkspektrum findet sich bei Stariha und McCafferty.²¹⁵ Auf Grundlage dieser Daten, die den Stand bis zum Jahr 2021 zusammenfassen, fällt es allerdings schwer abzuleiten, ob es ebenfalls eine Tendenz der phylogenetische Beziehung zwischen Lasso-peptid-Produzenten und der Empfindlichkeit von Erregern gegenüber den Verbindungen gibt. Dieser Zusammenhang ist erst in den letzten Jahren mit mehreren Arbeiten im Kontext von proteobakteriell gebildeten Lasso-peptiden vermehrt beschrieben worden und innerhalb der Aktinobakterien-Familie finden sich, wie die Auflistung von Stariha und McCafferty zeigt, auch bei Lasso-peptiden vor allem Streptomyceten als Produzenten dieser Verbindungen. Streptomyceten sind allerdings in Testpanel zur Bestimmung antibakterieller Effekte selten inkludiert, da sich diese auf klinisch relevante Erreger fokussieren. Anhand der zusammengetragenen Daten zeigt sich allerdings, dass häufig Effekte gegenüber *Micrococcus luteus* beschrieben und hauptsächlich Wirkungen gegenüber grampositiven Bakterien festgestellt werden konnten, was zumindest eine gewisse phylogenetische Beziehung andeuten könnte. Mit Lassomycin – ein 16 Aminosäuren umfassendes Lasso-peptid der Klasse II, das aus *Lentzea kentuckyensis* sp. isoliert wurde – und Lariat A und B – Lasso-peptide, die sich aus 18 bzw. 20 Aminosäuren zusammensetzen und aus *Rhodococcus jostii* isoliert wurden – sind aber auch innerhalb der aktinobakteriellen Gruppe von Lasso-peptiden zwei Vertreter bekannt, die teilweise gegenüber medizinisch relevanten Vertretern der

Mykobakterien potente Effekte erzielen.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Diese Studien zeigen somit, dass auch Aktinobakterien als Produzenten potenter antibakterieller Lassoptide gegen klinisch relevante Erreger fungieren können.

Die Bioaktivitätstestungen von Nocapeptin A, einem aktinobakteriellen Lassozeptid aus *Nocardia terpenica*, zeigten eine moderate Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus*, ansonsten konnten aber innerhalb des verwendeten Testpanels keine antimikrobiellen Wirkungen bestimmt werden. Allerdings zeigen die zuvor, im Kontext der proteobakteriell gebildeten Lassoptide, erläuterten Ergebnisse, dass die Zusammensetzung des Testpanels vermutlich unglücklich gewählt war. Ausgehend von der Hypothese – die aufgrund der vielen Studien, die in jüngster Zeit publiziert wurden, als einigermaßen gesichert angesehen und somit auch auf Aktinobakterien übertragen werden darf –, dass Lassoptide hauptsächlich ihre biologischen Effekte gegenüber phylogenetisch verwandten Bakterien des Produzenten zeigen, hätten verschiedene *Nocardia*-Spezies bzw. weitere Aktinobakterien im Testpanel berücksichtigt werden müssen. Die Testungen orientierten sich aber an den Krankenhauskeimen der ESKAPE-Gruppe (siehe Tabelle 20), die vor allem gramnegative Vertreter umfasst, sodass die vorgestellten Ergebnisse vermutlich die biologische Relevanz von Nocapeptin A nur unzulänglich beschreiben.

Prinzipiell zeigen aber die jüngst publizierten Ergebnisse auf, dass mit Lassozeptiden ein bemerkenswerter Ansatz zur Identifizierung bioaktiver Verbindungen gegenüber bestimmten Krankheitserregern erfolgen kann: die Tatsache, dass diese Moleküle gegenüber phylogenetisch verwandten Erregern oftmals antibakteriell wirken, lässt den Umkehrschluss zu, dass man innerhalb einer Gruppe von Erregern nach Produzenten von Lassozeptiden suchen sollte, gegen die man neue antibiotisch wirksame Verbindungen benötigt. Kurz gesagt: möchte man neue Antibiotika gegen die ESKAPE-Gruppe finden, sollte man innerhalb dieser Gruppe nach Produzenten von Lassozeptiden suchen. Diese Verbindungen haben mit hoher Wahrscheinlichkeit eine antibakterielle Wirkung gegen Mitglieder dieser Gruppe. Auf Basis dieser Überlegung konnte Cloacaenodin, ein von Spezies des *Enterobacter cloacae complex* gebildetes Lassozeptid mit potenter Wirkung gegen klinisch relevante Vertreter der Enterobakterien, entdeckt und isoliert werden.²¹⁸ Auch in einem jüngst, von der Arbeitsgruppe um James Link, veröffentlichten Preprint, wurde ein phylogenetischer Ansatz erfolgreich bei der Beschreibung der Achromonodine, Lassoptide aus

Achromobacter – eine Bakterien-Gruppe, die bei Patienten mit Mukoviszidose Infektionen auslösen kann –, eingesetzt.²⁶⁹

Die erwähnten Studien zeigen somit die Möglichkeit auf, mit Lassozeptiden Substanzen finden und isolieren zu können, die gezielt gegen ausgewählte, medizinisch relevante bakterielle Erreger wirken können. Ein solcher Ansatz, der die Möglichkeit eröffnet im Vorhinein eine antibiotische Aktivität gegenüber bestimmten Erregergruppen vorhersagen zu können, ist innerhalb der Naturstoffforschung bisher aber nahezu einzigartig, weswegen die Forschungsbemühungen zu Lassozeptiden im Kontext der Infektiologie in den nächsten Jahren mit Sicherheit an Bedeutung gewinnen werden.

8. Abschließende Gesamtbetrachtung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl in marinen als auch terrestrischen Organismen immer noch Verbindungen gefunden werden können, die sich durch einzigartige Kohlenstoffgerüste und interessante Bioaktivitäten auszeichnen. Aus diesem Grund ist die Naturstoffforschung auch heute noch eine wichtige Ressource, um neuartige bioaktive Substanzen beschreiben zu können, und die jüngsten Entwicklungen im Kontext von Infektionskrankheiten – stellvertretend seien hier die weltweit auftretende Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen und die Corona-Pandemie genannt – zeigten eindrucksvoll auf, dass auch Naturstoffe in Zukunft einen wichtigen Ausgangspunkt für die Arzneimittelentwicklung bleiben und, nach Einschätzung mancher Experten, sogar wieder verstärkt in den Fokus rücken werden.^{145, 210, 278}

Innerhalb der marinen Naturstoffforschung sind Schwämme, Nesseltiere und Algen nach wie vor bedeutende Quellen für bioaktive Verbindungen.²⁷⁹ Sind aber die aus Schwämmen gewonnenen Naturstoffe vor allem auf das Biosynthesepotential symbiotischer Mikroorganismen zurückzuführen, zeigt sich bei den Tieren der Octocorallia, die für ihre Terpene bekannt sind, dass die Korallen selbst diese Sekundärstoffe bilden können. Die jüngsten Arbeiten der Gruppen um Bradley Moore und Eric Schmidt konnten bei diesen sessilen Tieren Biosynthesegenecluster, die für komplexe bioaktive Terpene kodieren, nachweisen, was somit zunehmend bioinformatisch getriebene Forschungsansätze im Kontext dieser Lebewesen möglich scheinen lässt, aber auch generell die Frage aufwirft, ob auch weitere (sessile marine) Tiere ein ähnliches Biosynthesepotential aufweisen.^{280, 281} Trotzdem lässt sich aber auch innerhalb des marinen Feldes der zunehmende Trend feststellen, dass sich die Forschung immer mehr in Richtung der marinen Mikroorganismen verlagert.^{161, 282} Dieser Trend hat mehrere Gründe: zum einen zeigen metagenomische Studien immer deutlicher auf, welche ungeheure Biosynthese-Kapazität, beispielsweise mit Schwämmen assoziierte, Mikroorganismen aufweisen, weshalb eine gewisse, durch genome mining Ansätze begünstigte, Fokussierung auf diese Organismen nahe liegt.^{32, 283} Zum anderen zeigt sich eine geographische Verlagerung der marinen Forschung: ursprünglich waren vor allem Japan, Australien und westliche Staaten in diesem Forschungsbereich führend, was sich über die Aufschlüsselung der Anzahl der Publikationen / isolierten Verbindungen zu den jeweiligen Ursprungsländern klar

belegen lässt. Zwar nehmen Länder wie die USA, Australien und Deutschland nach wie vor eine führende Rolle in diesem Feld ein, in den letzten Jahren hat sich aber insbesondere der asiatische Raum, allen voran China als die führende Nation, innerhalb des Fachgebiets etabliert.^{279, 284} Ganz generell hat sich mit der Convention on Biological Diversity und dem in Kraft treten des Nagoya Protokolls, einem internationalen Abkommen, das die Biodiversität eines jeweiligen Landes als Ressource anerkennt, schützt und den internationalen Zugang nur auf Grundlage entsprechender Abkommen mit dem Ursprungsland ermöglicht, die marine Naturstoffforschung stark verändert und begünstigt somit Länder mit weitreichenden Küstenlinien und hoher Biodiversität.^{279, 285, 286} Dennoch zeigen die über 20 Verbindungen, die sich momentan in klinischen Studien (Phase II und III) befinden, eindeutig das Potential mariner Naturstoffe im Kontext der Arzneistoffentwicklung auf, wobei die biologischen Effekte und Indikationen von der Behandlung von Alzheimer bis hin zu den verschiedensten Therapien bei malignen Erkrankungen reichen.^{58, 287,}
288

Innerhalb der terrestrisch orientierten Naturstoffforschung lassen sich, gemäß den Quellen für die jeweiligen Verbindungen, die (traditionelle) Arzneipflanzen-basierte und die auf von Mikroorganismen gebildeten Sekundärstoffen begründete Teildisziplinen unterscheiden: Schätzungen gehen davon aus, dass erst etwa maximal 15% der höheren Pflanzen eingehend chemisch charakterisiert bzw. medizinisch verwendet wurden.^{289, 290} Die Ansätze zur Erforschung dieses metabolischen Potentials sind – von Verbesserungen bei der spektroskopischen Analyse, den Trenntechniken und der Bioassay-Technologie abgesehen – aber zumeist immer noch klassisch ethnopharmakologisch basiert bzw. von Bioaktivitäten geleitet.²⁸⁹⁻²⁹¹ Das Feld der Arzneipflanzen basierten Naturstoffchemie hat sich in den letzten Jahren zunehmend in den asiatischen Raum, mit China und Indien als führende Nationen, und den amerikanischen Kontinent verlagert.^{292, 293} Zum einen hat die Phytomedizin in asiatischen Ländern, stellvertretend sei hier die Traditionelle Chinesische Medizin genannt, eine lange Tradition, zum anderen beheimateten Asien und Amerika Regionen und Ökosysteme, die eine hohe Biodiversität von pflanzlichen Lebewesen / ein hohes Aufkommen bereits traditionell verwendeter Arzneipflanzen aufweisen, was die Forschungsbemühungen in diesen Gebieten – in Kombination mit den durch das Nagoya Protokoll vorgegebenen rechtlichen Rahmenbedingungen zum Zugang zu diesen Pflanzen als Ausgangspunkt für naturstoffchemische Untersuchungen –

begünstigt.^{289, 292, 294-296} Die Phytochemie erfährt aber auch in jüngster Zeit jenseits der bioaktivitätsgeleiteten Forschung einen Schub: analog zu den chemisch biologischen Arbeiten im Zusammenhang mit Mikroorganismen, rücken nun auch zunehmend die Biosynthesewege von Pflanzen, die zu den entsprechenden Verbindungen führen, in den Fokus. Die sich stetig verbesserten Möglichkeiten im Bereich der Genomsequenzierung und der bioinformatischen Analyse sind die Grundlage dafür, die entsprechenden Stoffwechselwege auf genetischer Ebene zu entdecken und die Funktionen der beteiligten Gene und Enzyme entschlüsseln sowie die entsprechenden Biosyntheseprodukte durch heterologe Expression (bio)chemisch charakterisieren zu können.²⁹⁷ Die pflanzliche Genomik ist hierbei eine große Hilfe, obschon umfangreiche und spezifische bioinformatische Ansätze / Tools sowie standardisierte Protokolle zu deren Analyse, zur Vorhersage des Biosynthese-Potentials und der Architektur der entsprechenden Gencluster, bisher kaum in größerer Anzahl verfügbar waren. Das zudem, im Vergleich zu anderen Organismen wie Bakterien oder Pilzen, erst relativ wenige pflanzliche Genomsequenzen und Transkriptomdaten für solche Studien zur Verfügung stehen, war noch ein weiterer limitierender Faktor dieses Forschungszweigs.²⁹⁸⁻³⁰³ Jedoch zeigen die jüngsten Arbeiten von Roland Kersten stellvertretend, dass, hier im Kontext pflanzlich gebildeter ribosomaler und posttranslational modifizierter Peptide, genome mining / transcriptomic Ansätze erfolgreich eingesetzt werden können, somit auch genombasierte Studien bei Pflanzen zukünftig an Bedeutung gewinnen werden und sich somit innerhalb der Fachdisziplin zahlreiche weitere Möglichkeiten eröffnen.³⁰³⁻³⁰⁵

In Zeiten der postgenomischen Ära sind die neuen Ansätze zur Erforschung des Sekundärmetabolitenprofils bei Mikroorganismen vor allem bioinformatisch getrieben: die klassischen genome mining Ansätze, die vor allem die Biosyntheseeenzyme und Stoffwechselprodukte eines Organismus in den Fokus nahmen, werden zunehmend durch Ansätze ergänzt, die dabei helfen sollen, eine Vielzahl von Gencluster verschiedener Naturstoffproduzenten parallel nach ihrem jeweiligen Potential hin zu priorisieren und bereits in diesem frühen Stadium mögliche Bioaktivitäten der Produkte dieser Gene, momentan vor allem im Kontext der antimikrobiellen Wirkung, aus den vorhandenen Daten ableiten zu können.^{117, 306} Ergänzt werden diese allgemeinen Methoden durch neue Computer-Tools zur Strukturmodellierung und Algorithmen zur Analyse der Gencluster, die sich spezifischen Naturstofffamilien oder -klassen, wie etwa ribosomalen Peptiden oder Lassozeptiden im speziellen, widmen und so eine

detaillierte (bio)informatische Vorhersage zu den entsprechenden Produkten dieser Biosynthesegene ermöglichen. Stellvertretend seien hier RiPPMiner, LassoHTP und der RODEO (Rapid ORF Description and Evaluation Online) Algorithmus genannt.^{193, 307-309} Ergänzt werden diese Methoden durch vielversprechende chemoinformatische Ansätze zur Identifizierung neuer Naturstoff(derivate), die zumeist auf massenspektrometrischen Daten aufbauen. Insbesondere das Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) Setup, das Molekülfamilien anhand ihres (mehr oder minder) gleichartigen Fragmentierungsmusters erkennt und miteinander in Verbindung setzen kann, hat eine breite Anwendung innerhalb der Naturstoff orientierten Forschung erfahren.³¹⁰

Die angesprochenen Entwicklungen zeigen eindrucksvoll, dass in allen Teildisziplinen der Naturstoffforschung ständig Fortschritte gemacht werden, mit dem Ziel neue (bioaktive) Verbindungen zu entdecken. In Zusammenhang mit den bereits dargestellten Nöten zur Beschreibung neuer Antibiotikaklassen, aufgrund der fortschreitenden Resistenzentwicklungen bei bakteriellen Erregern, und der generellen Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten in nahezu allen biomedizinisch relevanten Feldern, bleibt die Naturstoffforschung auch in Zukunft ein wichtiges Forschungsfeld, um den Arzneimittelschatz für zukünftige Generationen erhalten und weiter ausbauen zu können.

Allgemeiner Teil

9. Material und Methoden

9.1. Materialien und Hilfsmittel

9.1.1. Verwendete Chemikalien und Hilfsmittel

Tabellen 21 und 22 fassen die verwendeten Chemikalien und Hilfsmittel zusammen.

Tabelle 21 Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemische Substanzen	Hersteller
Acetonitril-HPLC grade	Fisher Chemical / Sigma Aldrich
Chloroform	Chemikalien Ausgabe, Pharmazeutisches Institut
Methanol-HPLC grade	Merck
n-Butanol	Fisher Chemical
Methanol- d_3	Sigma Aldrich
Methanol- d_4	Deutero GmbH
Polygoprep 60-50 C18	Macherey-Nagel
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich

Tabelle 22 Übersicht der verwendeten Hilfsmittel.

Hilfsmittel	Hersteller
Eppendorf Röhrchen	System
Falcon Röhrchen	Eppendorf
Filterpapier (MN 615 1/4 Ø320mm)	MACHEREY-NAGEL
Eppendorf Pipetten	Eppendorf

9.1.2. Tierisches Material

Ircinia wistarii wurde von Anthony D. Wright im Juli 1998 mittels Flaschentauchen (SCUBA) aus einer Tiefe von 20 m gesammelt und in Ethanol bei -20°C bis zur Extraktion gelagert. Ein Museumsstück, mit der internen Probennummer HER 6, befindet sich im Archiv des Pharmazeutischen Instituts, Abteilung Pharmazeutische Biologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen.

9.1.3. Bakterien-Stämme für Produktion von Nocapeptin A

Nocardia terpenica IFM 0406 wurde von der Medical Mycology Research Center (MMRC) culture collection, Chiba University, Chiba, Japan erworben.

9.1.4. Nährmedien und deren Zusammensetzung zur Kultivierung von *Nocardia terpenica*

Tabellen 23 und 24 geben eine Übersicht zu den verwendeten Nährmedien und deren Zusammensetzung.

Tabelle 23 Modifiziertes R4-Medium.

Bestandteile	Konzentration [g/l]	Hersteller
Glucose	5.0	Sigma Aldrich
Hefe-Extrakt	1.0	DB
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5.0	Sigma Aldrich
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2.0	Roth
K ₂ SO ₄	1.0	Sigma Aldrich
Casaminoacid	0.5	MP
L-Prolin	0.7	Sigma Aldrich
L-Valin	1.18	Sigma Aldrich
TES (NTris(hydroxymethyl)methyl-2- aminoethanesulfonsäure)	2.8	Roth
Spurenelemente - Lösung	1.0	Pharmazeutische Biologie, Uni Tübingen

Tabelle 24 BHI-Medium.

BHI-Medium (brain heart infusion)		
Bestandteil	Konzentration [g/l]	Hersteller
Agar (für Agarplatten)	20.0	Sigma Aldrich
BHI-Medium-Mischung	37.0	Sigma Aldrich
Zusammensetzung BHI-Medium		
Bestandteile	Konzentration [g/l]	
Rinderherz Infus	5.0	
Kälberhirn Infus	12.5	
Na ₂ HPO ₄	2.5	
Glucose	2.0	
Pepton	10.0	
NaCl	5.0	

9.1.5. Verwendete Geräte / Spektrometer

Tabelle 25 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte und analytischen Instrumente.

Tabelle 25 Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Spektrometer.

Laborgerät	Hersteller
Waage (2200g, 10mg)	AND Company
Feinwaage (BP210D)	Satorius
Autoklav (Systec VX-150)	Systec
Sterilbank (safe 2020)	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	Memmert
Horizontalschüttler	Infors HT
Reinstwasseranlage (Elga Purelab Flex)	Elga
Rotationsverdampfer	Heidolph
Gefriertrockner (Alpha 3-4 LSC basic)	Martin Christ
Ultraschallbad	Bandelin
Zentrifuge (Heraeus Multifuge 4KR)	Thermo Fisher Scientific
Spektrometer	Hersteller
HPLC-System (Waters 1525 Pumpe, inline Degasser, Waters 996 photodiode array detector, Rheodyne 7725i injector, Millennium ³² -Software)	Waters
CD (Jasco J-720 Spektropolarimeter mit Quarzmikroküvette (2.0 mm Pfadlänge), Software Jasco Spectra Manager)	Jasco
IR (Jasco FTIR 4200 Spektrometer mit MIRacle ATR device (ZnSe Kristall), Software Jasco Spectra Manager)	Jasco
Polarimeter (Jasco P-2000 Polarimeter mit 3.5 mm x 10 mm zylindrischer Quarzzelle, Software Jasco Spectra Manager)	Jasco
UV/VIS Spektrometer (PerkinElmer Lambda 25 mit 1 x 1 cm Quarzküvetten, Software UV WinLab)	PerkinElmer
LC-HRMS (Ultimate 3000 HPLC Anlage (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt mit HRESI-TOF-MS Bruker maXis 4G mass spectrometer)	Bruker
NMR (700 MHz Bruker AVANCE III HDX NMR Spektrometer mit 700 (¹ H) und 176 (¹³ C) MHz Feldstärke; ausgestattet mit 5mm Prodigy TCI CryoProbe Head, Software: TopSpin)	Bruker

NMR
(400 MHz Bruker AVANCE III NMR Spektrometer mit 400
(¹H) und 100 MHz (¹³C) Feldstärke; ausgestattet mit 5 mm
broadband SmartProbe und AVANCE III HD Nanobay-
Konsole, Software: TopSpin)

Bruker

9.1.6. Software

Die für die analytischen Messungen und Auswertungen eingesetzten Software-Programme sind bei den jeweiligen Spektrometern genannt und im Methodenteil aufgeführt. Die in der Arbeit abgebildeten Strukturformeln wurden mit Hilfe von PerkinElmer ChemDraw Professionals Version 22.2.0.3300 gezeichnet. Mit Hilfe von ChemDraw wurden zudem die Summenformeln und exakten Massen bekannter Verbindungen bestimmt. Abbildungen und Biosyntheschemata wurden sowohl mit ChemDraw und PyMOL 2.5.3 als auch mit Microsoft® PowerPoint® für Microsoft 365 MSO (Version 2304 Build 16.0.16327.20200) 64 Bit erstellt.

9.2. Methoden

9.2.1. Extraktion und Fraktionierung der Terpene

Der Schwamm (800 g, Nassgewicht) wurde in kleinere Stücke geschnitten (etwa 2 x 2 cm) und mit einem Gemisch aus Methanol und Chloroform (1+1, v/v; 2 l pro Extraktionsschritt) dreimal extrahiert (jeweils nach 4, 8 und 20 Stunden), wobei nach jedem Extraktionsschritt das Lösemittelgemisch abfiltriert wurde. Die so erhaltenen Extraktionsfraktionen wurde vereinigt und mittels Rotationsverdampfer wurden die Lösemittel abgetrennt. So wurden 25.46 g Rohextrakt erhalten, die anschließend wieder in MeOH-HPLC grade aufgenommen und mittels Säulenchromatographie in verschiedene Fraktionen aufgetrennt wurde.

Für die Säulenchromatographie wurde eine Glassäule (Höhe: 40 cm, Durchmesser: 7.5 cm, Packungshöhe: 30 cm) mit Polygoprep 60-50 C₁₈ befüllt, dessen Oberfläche zuvor in MeOH-HPLC grade über 12 Stunden aktiviert wurde. Nach dem Befüllen wurde das Säulenmaterial mit dem doppelten Fraktionsvolumen auf den Ausgangsgradienten äquilibriert.

Tabelle 26 gibt eine Übersicht über die gewonnenen Fraktionen.

Material und Methoden

Tabelle 26 Fraktionierung mittels Säulenchromatographie – Übersicht der gewonnenen Fraktionen sowie die Zusammensetzung der jeweils verwendeten mobilen Phasen.

Fraktion	Gradient [1 l]	
	MeOH [Volumenprozent]	Wasser [Volumenprozent]
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0
11	DCM	

9.2.2. Kultivierung von *Nocardia terpenica*

Zur Vorbereitung der Vorkulturen wurden BHI-Agarplatten mit 20 µl Suspension aus der Kryokultur des Bakterienstammes beimpft, ein Verdünnungsausstrich durchgeführt und für drei Tage im Inkubator bei 37°C angezogen. Das Bakterienwachstum wurde dabei anhand der einsetzenden Koloniebildung täglich überprüft.

Für die Vorkultur wurden Sporen einer Kolonie von der inkubierten Agarplatte mit einer Pipettenspitze entnommen und dann in einen 250 ml Erlenmeyerkolben (mit 4 Glasschikanen und einer zusätzlichen Metallspirale) überführt, in dem aber zuvor 80 ml BHI Medium vorgelegt wurden. Die Kolben wurden dann in einem Horizontalschüttler für 4 Tage bei 37°C und einer Drehzahl von 150 rpm angezogen.

Für die Hauptkultur wurden dann 0.4 ml der Vorkultur in 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, in denen zuvor 120 ml des entsprechen modifizierten R4-Nährmediums vorgelegt wurden. Diese wurden wiederum bei 32°C und einer Drehzahl von 150 rpm für 6-7 Tage inkubiert.

Alle genannten Medien wurde zuvor autoklaviert und die jeweiligen Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt.

9.2.3. Extraktion und Fraktionierung von Nocapeptin A

Für die Gewinnung des Rohextraktes wurde die Kultivierungsbrühe der Erlenmeyerkolben zusammen in Zentrifugenflaschen überführt und für 30 Minuten bei 4°C und bei einer Drehzahl von 4400 rpm zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurden dann mit dem gleichen Volumen an n-Butanol versetzt und über Nacht bei 75 rpm durchmischt. Nach der Phasenseparation wurde die Butanol-Phase dekantiert, filtriert und in 500 ml Rundhalskolben überführt. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Lösemittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der so gewonnene Rohextrakt wurde im Anschluss daran in Methanol gelöst und mittels Säulenchromatographie in verschiedene Fraktionen aufgetrennt.

Für die Säulenchromatographie wurde eine Glassäule (Höhe: 40 cm, Durchmesser: 7.5 cm, Packungshöhe: 30 cm) mit Polygoprep 60-50 C18 befüllt, dessen Oberfläche zuvor in MeOH-HPLC grade über 12 Stunden aktiviert wurde. Nach dem Befüllen wurde das Säulenmaterial mit dem doppelten Fraktionsvolumen auf den Ausgangsgradienten äquilibriert.

Tabelle 27 gibt eine Übersicht der gewonnenen Fraktionen.

Tabelle 27 Übersicht der mittels Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen sowie Angaben zur Zusammensetzung der jeweils verwendeten mobilen Phasen.

Fraktion	Gradient [800 ml]	
	MeOH [Volumenprozent]	Wasser [Volumenprozent]
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0

9.2.4. Analytische Methoden

9.2.4.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

9.2.4.1.1. HPLC-Methoden zur Isolation und Aufreinigung der Terpene

Das chemische Profil der einzelnen Fraktionen wurde mittels HPLC anhand eines Chromatogramms bestimmt und die entsprechenden Substanzen anschließend an der HPLC aus dem Rohextrakt isoliert und ggf. nochmals aufgereinigt. Die nachfolgenden Tabellen veranschaulichen die jeweils gewählten Parameter.

Tabelle 28 HPLC-Gradient zum Screening der Fraktionen.

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% TFA [%-Anteil an der Mischung]
0	0	100
60	100	0
70	0	100
Säule	Phenomenex Luna Omega Polar C18 (5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm)	
Fluss [ml/min]	1.2 ml/min	
Detektor	UV/VIS	
Wellenlänge [nm]	215, 230, 280	

Bei den in Abbildung 7 gezeigten Chromatogrammen war die Detektorlaufzeit auf 75 min. eingestellt.

Tabelle 29 Gradient zur Aufreinigung der Substanzen aus Fraktion 5 (50%-MeOH).

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% TFA [%-Anteil an der Mischung]
0	20	80
5	40	60
15	50	50
25	60	40
30	100	0
31	100	0
32	20	80
Säule	Phenomenex Kinetex EVO C18 (5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm)	
Fluss [ml/min]	1.2 ml/min	
Detektor	UV/VIS	
Wellenlänge [nm]	215, 230, 280	

Bei dem in Abbildung 18 gezeigten Chromatogramm war die Detektorlaufzeit auf 35 min. eingestellt.

Material und Methoden

Tabelle 30 Gradient zur Aufreinigung der Substanzen aus Fraktion 9 (90%-MeOH).

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% TFA [%-Anteil an der Mischung]
0	20	80
3	55	45
30	90	10
35	100	0
40	20	80
Säule		
Säule	Phenomenex Luna Omega Polar C18 (5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm)	
Fluss [ml/min]	1.2 ml/min	
Detektor	UV/VIS	
Wellenlänge [nm]	215, 230, 280	

Tabelle 31 Gradient zur Aufreinigung der Substanzen aus Fraktion 10 (100%-MeOH).

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% TFA [%-Anteil an der Mischung]
0	10	90
3	40	60
26	75	25
28	100	0
32	10	90
33	10	90
Säule		
Säule	Phenomenex Kinetex EVO C18 (5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm)	
Fluss [ml/min]	1.2	
Detektor	UV/VIS	
Wellenlänge [nm]	215, 254, 280	

9.2.4.1.2. HPLC-Methoden zur Isolation und Aufreinigung von Nocapeptin A

Die Charakterisierung, Isolierung und Aufreinigung der Reinsubstanzen aus dem Rohextrakt erfolgten mittels HPLC-DAD. Tabelle 32 gibt die gewählten Parameter wieder.

Tabelle 32 HPLC-Gradient zur Aufreinigung von Nocapeptin A.

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% TFA [%-Anteil an der Mischung]
0	10	90
5	20	80
8	25	75
20	30	70
21	100	0
25	100	0
26	10	90
28	10	90

Säule	Phenomenex Kinetex PFP (5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm)
Fluss [ml/min]	1.1 ml/min
Detektor	UV/VIS
Wellenlänge [nm]	215, 254, 280

9.2.4.2. Massenspektroskopie

Die hochauflösenden LC-MS(-MS)-Experimente wurden von Frau Dr. Wistuba und dem Team der Abteilung Massenspektrometrie, Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt.

Für die LC-ESI-HRMS-Messungen wurde ein Ultimate 3000 HPLC-Setup, dass mit einem maXis-4G Massendetektor gekoppelt war, verwendet.

Tabelle 33 Verwendete HPLC-Methode bei der HRMS-Spektroskopie.

Zeit [min]	Acetonitril [%-Anteil an der Mischung]	Wasser mit 0.1% FA [%-Anteil an der Mischung]
0	10	90
30	100	0
40	100	0

Säule	Phenomenex Luna Omega Polar C18 (3 µm, 100Å, 150 x 3 mm)
Injektionsvolumen	5 µl
Fluss [ml/min]	0.3 ml/min
Detektor	UV/VIS
Weitere Parameter	Massenbereich: 50-1800 Da Kapillarspannung 4500 V Zerstäubergas Druck (Stickstoff): 2 (1.6) bar Temperatur der Ionenquelle: 200°C Trocknungs-Gas Fluss: 9 l/min; 200°C Kalibrierung: Natriumformiat; vor jeder Messung infundiert

Der zu scannende Massenbereich wurde auf 50-1800 Da festgelegt. Die zehn mit der höchsten Intensität detektierten Signale im MS¹ wurden für MS²-Experimente ausgewählt und über kollisionsinduzierte Dissoziation (CID, collision-induced dissociation) in der Gasphase fragmentiert.

9.2.4.3. NMR-Spektroskopie

9.2.4.3.1. Strukturaufklärung der marinen Terpene mittels NMR

Die aufgereinigten Substanzen wurden an einem Avance III HD Spektrometer (400 / 100 MHz für ¹H / ¹³C) der Firma Bruker vermessen. Für die Messungen der ¹H, ¹³C, DEPT 135, ¹H-¹³C edited HSQC, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC-TOCSY, ¹H-¹³C HMBC und ¹H-¹H NOESY Experimente wurden die Standardpulse verwendet.

Vor den jeweiligen Messungen wurden die Proben über Nacht gefriergetrocknet, um Wasser- und Lösemittelrückstände zu minimieren. Die Proben wurden anschließend in MeOH- d_4 gelöst und in 5 mm NMR-Röhrchen bei 298 K vermessen.

Für die Prozessierung, Analyse und Datenaufbereitung wurden die Software-Pakete TopSpin 3.6.2 (Bruker) und MestReNova 12.0.4 (Mestrelab Research) verwendet. Zur Kalibrierung der Spektren wurden die Lösemittelsignale als interne Referenz verwendet (δ_H 3.31 und δ_C 49.15 ppm). Verunreinigungen wurden anhand von Literaturwerten identifiziert und zugewiesen.³¹¹

9.2.4.3.2. Strukturaufklärung von Nocapeptin A mittels NMR

Die aufgereinigte Substanz wurde an einem 700 MHz Spektrometer der Firma Bruker von Herrn Dr. Kramer und dem Team der NMR-Abteilung, Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen, vermessen. Für die Messungen der 1H , ^{13}C , 1H - ^{13}C edited HSQC, 1H - 1H COSY, 1H - 1H TOCSY (80 ms), 1H - ^{13}C HSQC-TOCSY, 1H - ^{13}C HMBC, 1H - 1H NOESY (300 ms und 100 ms), 1H - ^{15}N HSQC und 1H - ^{15}N HMBC Experimente wurden die Bruker Standardpulse verwendet. Für die Messungen mit Unterdrückung der Wassersignale wurden ebenfalls die Standardpulse mit water suppression verwendet. Die ^{15}N -Stickstoffspektren wurden auf die Spektrometerfrequenz referenziert und die chemische Verschiebung in ppm angegeben. Für die 1H - ^{13}C LR-HSQMBC Messungen wurde das Pulsprogramm gemäß der Literatur manuell aufgesetzt, wobei die Entkopplungspulse modifiziert wurden (adiabatic pulse decoupling anstelle des beschriebenen composite-pulse decoupling).²³⁴ Es wurden dabei drei verschiedene 1H - ^{13}C LR-HSQMBC Messungen vorgenommen, wobei die Experimente mit Kopplungskonstanten von 1, 2 und 4 Hz jeweils wiederholt wurden, um eine große Bandbreite der verschiedenen Kopplungsbereiche abdecken und so Fernkopplungen detektieren zu können. Die Spektren wurden anhand der Literaturempfehlung prozessiert.³¹² Für die Messungen am 400 MHz Spektrometer wurden ebenfalls Bruker Standardpulse verwendet, für die manuellen Messungen des gradient selective 1D TOCSY sind die entsprechenden Anregungsfrequenzen bei den jeweiligen Spektren angegeben.

Vor den jeweiligen Messungen wurden die Proben über Nacht gefriergetrocknet, um Lösemittelrückstände zu minimieren. Die Proben wurden anschließend in einer

Methanol-Wasser-Mischung (CH₃OH-d₃ / H₂O, 96:4) gelöst und in 5 mm NMR-Röhrchen vermessen.

Für die Prozessierung, Analyse und Datenaufbereitung wurden die Softwares TopSpin 3.6.2 und MestReNova 12.0.4 verwendet. Zur Kalibrierung der Spektren wurden die Lösemittelsignale als interne Referenz verwendet.

9.2.4.4. Optische Drehung

Die optische Drehung wurde mittels Jasco P-2000 Polarimeter bestimmt. Dabei wurde eine Quartz-Zelle verwendet und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 589.3$ nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Temperatur wurde mit einem externen Thermometer bestimmt.

Die spezifische Drehung wurde dabei wie folgt bestimmt:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{c * l} * 10^2$$

$[\alpha]_D^T$: Spezifischer Drehwert [(°*ml)/(dm*g)]

T: Temperatur [°C]

D: Natrium-D-Linie

c: Konzentration [g/100ml]

l: Dicke der Küvette [dm]

α : gemessener Winkel [°]

9.2.4.5. Infrarot (IR) Spektroskopie

Die IR-Messung wurde an einem Jasco FTIR 4200 Spektrometer mit einem MIRacle ATR device (ZnSe Kristall) durchgeführt und mit der Software Spectra Manager prozessiert. Zur Identifizierung funktioneller Gruppen, anhand charakteristischer Banden, wurde 1 mg Substanz in 100 μ l Methanol-HPLC grade gelöst und mit Hilfe einer GC-Spritze (10 μ l) auf die Messfläche aufgetragen. Das Methanol wurde unter Zuhilfenahme eines Föhns abgedampft, um einen homogenen Probenfilm zu generieren.

9.2.4.6. Ultraviolett / Visible (UV/Vis) Spektroskopie

Für die Messung wurde die Substanz in hochreinem Methanol gelöst und in 1 cm Quartz-Küvetten in einem Wellenlängenbereich von rund 350-200 nm vermessen. Der molare Absorptionskoeffizient ϵ wurde gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt.

9.2.4.7. Circular dichroismus (CD) Spektroskopie

Für die Messung wurde die Substanz in hochreinem Methanol (1 mg/ml) gelöst und in die Küvetten überführt. Die Stickstoffbegasung der optischen Instrumente wurde 15 Minuten vor der Messung gestartet. Die Messung wurde im Bereich von 190 bis 400 nm durchgeführt. Die Messgeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei 20°C Raumtemperatur. Die Sensitivität lag bei 100 mdeg. Der Mittelwert aus drei Messungen wurde verwendet. Die Rohdaten wurden mit der „smoothing“-Funktion der Messsoftware zum finalen Spektrum prozessiert.

9.2.4.8. Kristallisation von Ircinianin

Für die Kristallisationsexperimente wurden etwa 20 mg Reinsubstanz in einer Acetonitril-Wasser Mischung (65:35; v/v; 20 ml) gelöst und in einen 50 ml Rundhalskolben überführt. Das Lösemittelgemisch wurde bei Raumtemperatur und gegebenem Atmosphärendruck bis zur vollständigen Trocknung verdunsten gelassen. Die so entstandenen orthorhombischen Kristalle wurden von Herrn Dr. Schollmeyer, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, vermessen. Die Auswertung der Daten wurde dabei von Herrn Dr. Schollmeyer und Herrn Professor Koch, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Universität Regensburg, durchgeführt.

9.2.5. Computergestützte chemische Untersuchungen

Die computergestützten Modellierungen wurden vom Arbeitskreis von Herrn Professor Böckler, Labor für Molekulares Design & Pharmazeutische Biophysik, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt. Das Methodenprotokoll wurde in englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Für die Bestimmung der Stereochemie von Ircinianin Lacton C wurden sowohl das *S*- als auch das *R*-Enantiomer auf Grundlage der Kristallstruktur von (-)-Ircinianin vorhergesagt. Mittels der Designplattform MOE (Molecular Operating Environment) 2018.0101 wurden die Konformere mit Hilfe des Conformational Search Tools generiert.³¹³ Unter Anwendung eines stochastischen Algorithmus wurden die potentielle Oberflächenenergie anhand der Perturbation der drehbaren Bindungen gesampelt und anschließend wurden die Energien durch Anwendung des Merck Molecular Force Fields (MMFF94) minimiert.³¹⁴⁻³¹⁸ Neu entdeckte Konformationen wurden nur innerhalb eines Energielimits von 20 kcal/mol oberhalb des globalen Minimums berücksichtigt, sofern die neue Konformation nicht bereits anderen Konformationen zu ähnlich war (RMSD limit: 0.25). Die Suche wurde dabei für beide Enantiomere beendet, sobald das Rejection limit von 200 erreicht wurde. D.h. bei 200 aufeinanderfolgenden Versuchen, konnte kein neues Konformer erhalten werden, wobei generell das maximale Wiederholungslimit auf 50.000 gesetzt wurde. In Kombination mit der moderaten Flexibilität der Struktur wurde somit eine tiefgreifende Konformitätsanalyse angewandt. So konnten für beide Enantiomere 30 verschiedene Konformationen detektiert werden, die nachfolgend mittels B3-LYP/SV(P) unter Verwendung Grimme's dispersion Correction D3 in TURBOMOLE 7.4.1 in ihrer Geometrie optimiert wurden.³¹⁹⁻³²³ Dabei wurde die Dielektrizitätskonstante auf ein Epsilon von 32.7 für Methanol bei 25 °C gesetzt. Die Extended-Hückel-Theory (eht) wurde zur initialen Bestimmung der Mos herangezogen. Scfconv wurde auf 8 gesetzt. Ein Konformer zeigte Abweichungen, weswegen dieses nicht weiter berücksichtigt wurde. Tetramethylsilan (TMS) wurde auf die gleiche Weise in seiner Geometrie optimiert. Die entsprechenden NMR Abschirmungskonstanten wurden mit mpshift in TURBOMOLE vorhergesagt.³²⁴ Die erhaltenen isotropischen Werte für Wasserstoff und Kohlenstoff in TMS wurden verwendet, um die entsprechenden chemischen Verschiebungen aller Konformere der entsprechenden Enantiomere vorherzusagen.

9.2.6. Biologische Testungen

9.2.6.1. Antibakterielle Aktivität

Die Versuche wurden vom Arbeitskreis von Frau Professor Brötz-Oesterhelt, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt. Das Methodenprotokoll wurde in englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Die antibakterielle Aktivität wurde in einem Kationen-angepassten Mueller-Hinton Medium, wie bereits zuvor ausführlich beschrieben, in Übereinstimmung mit den Standards und Guidelines des Clinical and Laboratory Standards Institutes ermittelt.^{325, 326} Von der Testsubstanz wurde eine zweifache Reihenverdünnung angefertigt, in Mikrotiterplatten vorgelegt und 5×10^5 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml eines Testkeims zugegeben. Nach Übernachts-Kultivierung bei 37°C, wurde die minimale Hemm-Konzentration (MHK) als die niedrigste Konzentration bestimmt, bei der visuell ein Ausbleiben des bakteriellen Wachstums nachgewiesen werden konnte. Die Auswahl der Testkeime orientierte sich dabei an relevanten Erregern der ESKAPE-Gruppe. Als Testorganismen wurden sowohl bei der Testung von Ircinianin als auch von Nocapeptin A Stämme aus dem folgenden Reservoir verwendet: *Bacillus subtilis* 168, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecium* BM 4147-1, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* HN 818, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 12657, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* 09987, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 19424, *Neisseria gonorrhoeae* S 1441 und *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Die zur Testung herangezogenen Keime sind in den Tabellen im Ergebnis-Teil aufgeschlüsselt.

9.2.6.2. Antivirale Aktivität

Die Versuche wurden vom Arbeitskreis von Herrn Professor Schindler, Institut für Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt. Das Methodenprotokoll wurde in englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Die antivirale Aktivität der Testsubstanz wurde gegen das humane Cytomegalovirus (HCMV) und das severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS CoV2)

getestet, wobei sich die Testungen an bereits veröffentlichte Protokolle anlehnten.^{327,}
328

Für die Testung gegen HCMV wurden humane Vorhaut-Fibroblasten (< 25 Passagen) in DMEM Zellkulturmedium kultiviert, das mit 5% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin / Streptomycin angereichert war. Es wurden 1×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxidgehalt und einer relativen Feuchte von 95% inkubiert, das Medium gewechselt und die Testsubstanz in den Konzentrationen von 1 und 10 μM zugegeben. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit HCMV TB40EdeIUL16EGFP mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0.3 und 1 infiziert. 120 Stunden nach der Infektion, wurden die Zellen mit einer 80%igen Aceton-Wassermischung bei Raumtemperatur für 5 min. fixiert und permeabilisiert. Die intrazelluläre Färbung auf unmittelbar früh auftretende HCMV Proteine wurde mittels IE1/2 HCMV Antikörpern (1:1000 in PBS) bei 37°C und einer Inkubationszeit von 90 Minuten durchgeführt, gefolgt von einer weiteren Inkubation von ALEXAFluor514 (1:2000 in PBS) bei 37°C für 45 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (1:20000 in PBS) bei Raumtemperatur für weitere 8 Minuten. Nach jedem Schritt wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die entsprechenden Bilder wurden mit einem Cytation3 multiplate reader aufgenommen.

Für die Aktivitätstestung gegen SARS-CoV2 wurden Caco2 Zellen in DMEM Medium, das mit 10%igem fötalem Kälberserum, 1% Penicillin / Streptomycin und 1% nicht essenziellen Aminosäuren angereichert wurde, mit einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C sowie einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% und einer relativen Feuchte von 95%, wurde das Medium ausgetauscht und im Anschluss die Testsubstanz in einer Konzentration von 1 und 10 μM zugegeben. Direkt danach wurden die Zellen mit einer SARS-CoV2 mNeonGreen Lösung (1:2000) infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand dazu verwendet, um Caco2 Zellen einer weiteren Platte zu infizieren, da eine Infektiosität des Überstandes eine aktive Virusreplikation nachweist. Die infizierten Zellen des ersten Ansatzes wurden mit einer 2%igem Paraformaldehyd-PBS-Lösung fixiert und mit Hoechst 33342 bei 37°C für 10 Minuten gefärbt. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. 48 Stunden nach der Infektion wurden auch die Zellen des zweiten Ansatzes fixiert und gefärbt, wobei identisch verfahren

wurde. Die Bilder der Zellen wurden mittels einem Cytation3 multiplate reader aufgenommen.

9.2.6.3. Antiprotozoische Aktivität

Die Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil, Schweiz, durchgeführt. Die Methodenprotokolle wurden in englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Testung gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* STIB900: Der Urtyp des Erregers wurde im Jahr 1982 von einer infizierten Person in Tansania isoliert.³²⁹ Die axenische Reinkultur wurde durch Klonierung und nach mehreren Mauspassagen erreicht. Zur Kultivierung wurden 50 µl des Minimum Essential Medium, welches mit 25 mM HEPES, zusätzlich 1 g/l Glucose, 1% MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (100x), 0.2 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat und 15% Hitze-inaktiviertem Pferdeserum ergänzt wurde, verwendet. Diese Lösung wurde in jede Kavität einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Für die Aktivitätstestung wurden Verdünnungen der Probesubstanz in Konzentrationen von 100 – 0.002 µg/ml in den jeweiligen Kavitäten vorbereitet. Im Anschluss wurde der Erreger (4×10^3 Zellen in 50 µl), der im Blutkreislauf vorkommenden Form von *Trypanosoma brucei rhodesiense* STIB900, in die jeweiligen Kavitäten zugegeben und die Platte bei 37°C unter 5% Kohlenstoffdioxid-haltiger Atmosphäre für 70 Stunden inkubiert. Anschließend wurde in jede Kavität 10 µl einer Resazurin haltigen Lösung (Resazurin, 12.5 mg in 100 ml in zweifach destilliertem Wasser) zugegeben und die Inkubation für weitere 2-4 Stunden fortgeführt.³³⁰ Zur Auswertung wurden die Platten mit Hilfe eines Spectramax Gemini XS Mikroplatten-Fluorometer (Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 536 nm und Emissionswellenlänge von 588 nm vermessen. Für die Datenanalyse wurde die SoftmaxPro Software (Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) verwendet, die die IC₅₀-Werte mit Hilfe einer linearen Regression und 4-Parameter basierten logistischen Regression anhand der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmte.³³¹ Melarsoprol (Arsobal Sanofi-Aventis, von der WHO zur Verfügung gestellt) wurde dabei als Kontrollsubstanz (IC₅₀ 0.013 ± 0.006 µM) verwendet.

Die Testungen gegen *Trypanosoma cruzi* wurden wie folgt durchgeführt: Skelettmyoblasten (L-6 Zellen) von Ratten wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt, wobei eine Zellzahl von 2000 Zellen, suspendiert in 100 µl RPMI 1640 Medium, das zusätzlich 10% FBS und 2 mM L-Glutamin enthielt, pro Kavität ausgesät wurde. Nach 24 Stunden wurde das vorhandene Medium durch 100 µl RPMI-Medium mit jeweils 5000 trypomastigoten Zellen von *T. cruzi* Tulahuen Stamm C2C4, der das β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aufweist, ersetzt.³³² Nach 48 Stunden wurde das Medium erneut aus den Kavitäten entfernt und durch 100 µl neues Medium (mit oder ohne Probensubstanz in Verdünnungen von 100 bis 0.002 µg/ml) ersetzt. Nach weiteren 96 Stunden der Inkubation, wurden die Platten mittels inverser Mikroskopie untersucht, um das Wachstum und die Sterilität der Kontrollen zu bewerten. Im Anschluss daran wurden 50 µl des Substrats CPRG/Nonidet in allen Kavitäten zugegeben. Die sich entwickelnde Farbreaktion konnte so innerhalb der nächsten 2-6 Stunden nachvollzogen und photometrisch bei 540 nm bestimmt werden. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software SoftmaxPro analysiert und die IC₅₀-Werte mittels linearer Regression und 4-Parameter basierten logistischen Regression anhand der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt.³³¹ Benznidazol (von DNDi zur Verfügung gestellt, synthetisch hergestellt von Epichem) wurde als Kontrollsubstanz verwendet (IC₅₀ 2.31 ± 1.15 µM).

Die Aktivitätstestung gegenüber *L. donovani* wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt: Amastigoten des Stammes *L. donovani* MHOM/ET/67/L82 wurden im SM Medium unter axenischen Bedingungen bei 37°C, 5%iger Kohlenstoffdioxid-haltiger Atmosphäre und einem pH von 5.4 angezogen, wobei das Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum angereichert wurde.³³³ 100 µl des Kulturmediums mit 10⁵ Amastigoten aus der axenischen Kultur wurden dann in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit der Verdünnungsreihe der Probensubstanz (von 100 bis 0.002 µg/ml) ergänzt. Nach weiteren 70 Stunden der Inkubation, wurden die Platten mittels inverser Mikroskopie untersucht, um das Wachstum und die Sterilität der Kontrollen bewerten zu können. 10 µl Resazurin-Lösung (12.5 mg Resazurin in 100 ml destilliertem Wasser gelöst) wurden dann in jede Kavität zugegeben und die Platte für weitere 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Platten mit Hilfe eines Gemini XS Mikroplatten Fluorometers bei einer Anregungswellenlänge von 536 nm und einer Emissionswellenlänge von 588 nm vermessen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software SoftmaxPro analysiert und

die IC₅₀-Werte mittels linearer Regression und 4-Parameter basierten logistischen Regression anhand der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt.³³¹ Als Kontrollsubstanz wurde Miltefosin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) verwendet (IC₅₀ 0.65 ± 0.27 µM).

Die Bestimmung der biologischen Aktivität der Probesubstanz gegenüber *P. falciparum* wurde wie folgt durchgeführt: mit Hilfe des „³H-hypoxanthine-incorporation assay“ wurde die *in vitro* Aktivität der Substanz gegenüber dem für Arzneimittel empfindlichen Stamm *P. falciparum* NF54 während des Erythrozyten-Stadiums getestet.³³⁴⁻³³⁶ Aus dem in DMSO gelösten Reinstoff (10 mg/ml) wurde mit dem Medium eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen von 100-0.002 µg/ml erstellt und den Parasiten-Kulturen zugesetzt. Die Parasiten wurden in RPMI 1640 Medium ohne Hypoxanthin kultiviert, das zusätzlich HEPES (5.94 g/l), Natriumhydrogencarbonat (2.1 g/l), Neomycin (100 U/ml), Albumax^R (5 g/l) und gewaschene menschliche rote Blutkörperchen (A⁺) bei einem Hämatokrit von 2.5% (Parasitämie 0.3%) enthielt. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37°C und einer feuchten Atmosphäre (4% Kohlenstoffdioxid, 3% Sauerstoff, 93% Stickstoff) inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 50 µl ³H-Hypoxanthin (=0.5 µCi) in jede Kavität zugegeben und die Platten für weitere 24 Stunden unter denselben Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten dann mittels dem BetaplateTM cell harvester (Wallac, Zürich, Schweiz) abgeerntet und die roten Blutkörperchen auf einen Glasfaserfilter gegeben und mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Filter mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie verpackt und mit dem BetaplateTM Flüssigszintillationszähler (Wallac, Zürich, Schweiz) gezählt. Die IC₅₀-Werte wurden von den sigmoidalen Inhibitionskurven mittels linearer Regression (Microsoft Excel) bestimmt.³³¹ Als Referenzsubstanz wurde Chloroquin-diphosphat (Sigma C6628) verwendet (IC₅₀ 0.006 ± 0.002 µM).

9.2.6.4. Zytotoxizität

Die Arbeiten wurden vom National Cancer Institute, USA, und von den Arbeitsgruppen von Herrn Professor Kaiser, Swiss Tropical and Public Health Institute, Allschwil, Schweiz, und Frau Professor Brötz-Oesterhelt, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen, durchgeführt. Die Methodenprotokolle zur Testung gegenüber HeLa- und L-6-Zellen wurden in

englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Für die Einzeldosen-Übersicht des NCI-60 (one dose NCI-60 panel) des National Cancer Instituts, USA, wurde die Substanz im Rahmen des Developmental Therapeutics Program zugelassen. Die *in vitro* Aktivität der Substanzen gegenüber 60 verschiedenen Krebszelllinien wurde dabei mittels eines hochdosierten Einzeldosis-Screenings auf Grundlage eines standardisierten Protokolls durchgeführt.^{337, 338} Aufgrund einer nicht näher spezifizierten Problematik mit der Zelllinien-Identität der NCI-H23 Linie wurden wir vom NCI dahingehend informiert, dass die Ergebnisse unter diesen Bedingungen nicht aussagekräftig sind und somit für etwaige wissenschaftliche Veröffentlichungen nicht berücksichtigt werden dürfen.

Die *in vitro* Aktivität gegenüber HeLa-Zellen wurde in RPMI Zellkulturmedium, das mit 10% fötalem Rinderserum angereichert wurde, untersucht, wobei ein 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid (Resazurin)-Assay verwendet wurde. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Literatur.³²⁵ Von der Testsubstanz wurden Duplikate einer zweifachen Reihenverdünnungen in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte hergestellt und diese mit trypsinierten HeLa-Zellen (1×10^4 Zellen) bestückt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid und einer relativen Feuchte von 95% inkubiert und danach mit 200 µm Resazurin versetzt und die Zellen erneut über Nacht inkubiert. Anhand der Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin wurde die Viabilität der Zellen bestimmt, wobei die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm, im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle, bestimmt wurde. Die Messung wurde mittels eines TECAN Infinite M200 Readers durchgeführt.

Die *in vitro* Aktivität der Probesubstanz gegenüber L-6-Zellen wurde in Mikrotiterplatten untersucht, wobei 100 µl Medium und 4000 L-6-Zellen, ursprünglich aus einer von Rattenskelett-Myoblasten abgeleiteten Zelllinie, in die Kavitäten der Platten gegeben und mit der Probesubstanz, ausgehend von einer Verdünnungsreihe von 100-0.002 µg/ml, versetzt wurden.^{339, 340} Als Medium wurde dabei RPMI 1640, dem 1% L-Glutamin (200 mM) und 10% fötalem Kälberserum zugesetzt wurden, verwendet. Nach einer 70-stündigen Inkubationszeit wurden die Platten mittels inverser Mikroskopie im Hinblick auf das Wachstum der Kontrollen und den sterilen Bedingungen untersucht.

Zu jeder Kavität wurden daraufhin 10 µl einer Resazurin-Lösung hinzugegeben und die Inkubation für weitere 2 Stunden fortgesetzt. Bei einer Anregungswellenlänge von 536 nm und einer Exzitationswellenlänge von 588 nm wurden die Platten dann mittels eines Spectramax Gemini XS Mikroplatten Fluorometer vermessen und die IC₅₀-Werte anhand der sigmoidalen Dosis-Inhibitionskurven mittels linearer Regression und 4-Parameter basierten logistischen Regression ermittelt.³³¹ Hierzu wurde die SoftmaxPro Software verwendet. Als Kontrollsubstanz wurde Podophyllotoxin (Sigma P4405) verwendet (IC₅₀ 0.011 ± 0.005 µM).

9.2.6.5. Antifouling-Aktivität im marinen Ökosystem

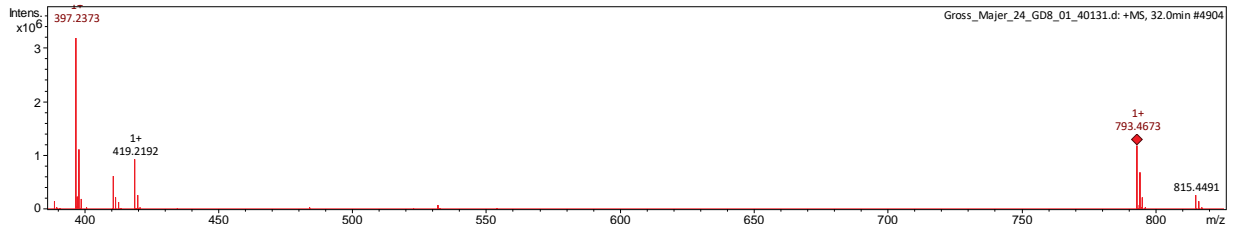
Die Arbeiten wurden von Herrn Dr. Patrick Cahill und Dr. Johan Svenson am Cawthron Institute, Nelson, Neuseeland durchgeführt. Das Methodenprotokoll wurde in englischer Sprache zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit ins Deutsche übertragen.

Die bewuchsverhindernden Eigenschaften der Probesubstanz wurden gegenüber Larven der pazifischen Seescheide (*Ciona savignyi*) und der Miesmuschel (*Mytilus galloprovincialis*) getestet, wobei die Hemmung der Besiedlung und Metamorphose der Organismen betrachtet wurde. Die Methoden folgten dabei bereits publizierten Protokollen.³⁴¹ Ausgewachsene Tiere dieser Spezies wurden küstennahen Population in der Nelson-Region, Neuseeland in freier Wildbahn entnommen, in einem rezirkulierendem Meerwasser-Kreislaufsystem (18 ± 1 °C; 33 ± 1 PSU) bis zum Ablachen gehalten und mit *Isochorysis galbana* aus Großkulturen gefüttert. Das Laichen und die Aufzucht der Larven wurde gemäß in der Literatur publizierter Methoden durchgeführt.^{342, 343} Kompetente Larven wurden in künstlich hergestelltem Meerwasser auf eine finale Konzentration von 3 ± 1 Larven pro ml eingestellt und die Aliquote der Larven-Suspension in die Kavitäten von Gewebekulturplatten (Corning Co-Star, 12 Kavitäten pro Platte) überführt. In den Kavitäten wurden zuvor Verdünnungen (0.1-100 µg/ml) der Probesubstanz vorgelegt. Es wurden immer Kontrollen angefertigt und die Versuche in dreifacher Ausführung wiederholt. Die Inkubation erfolgte über fünf Tage bei 18 ± 1 °C, im Anschluss wurde die Anzahl der Larven, die die Besiedlung und Metamorphose erfolgreich durchführen konnten, bestimmt. Sigmoidaler Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden mit der R Statistical

Software untersucht, um feststellen zu können, ob, in Relation zu den vorhanden Kontrollen, eine Inhibition der Besiedlung stattgefunden hat.³⁴⁴

10. Anhang

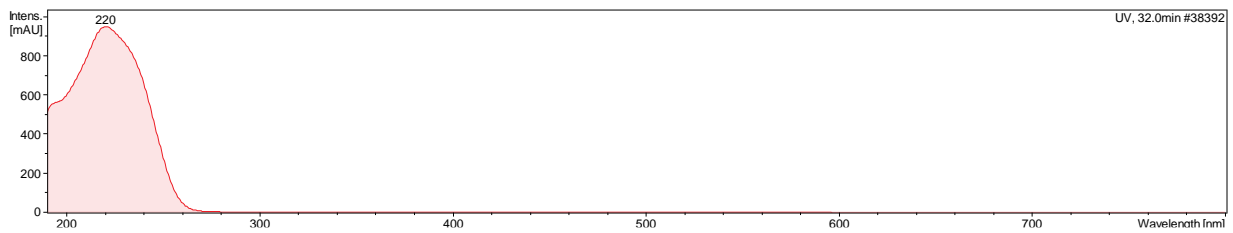
A



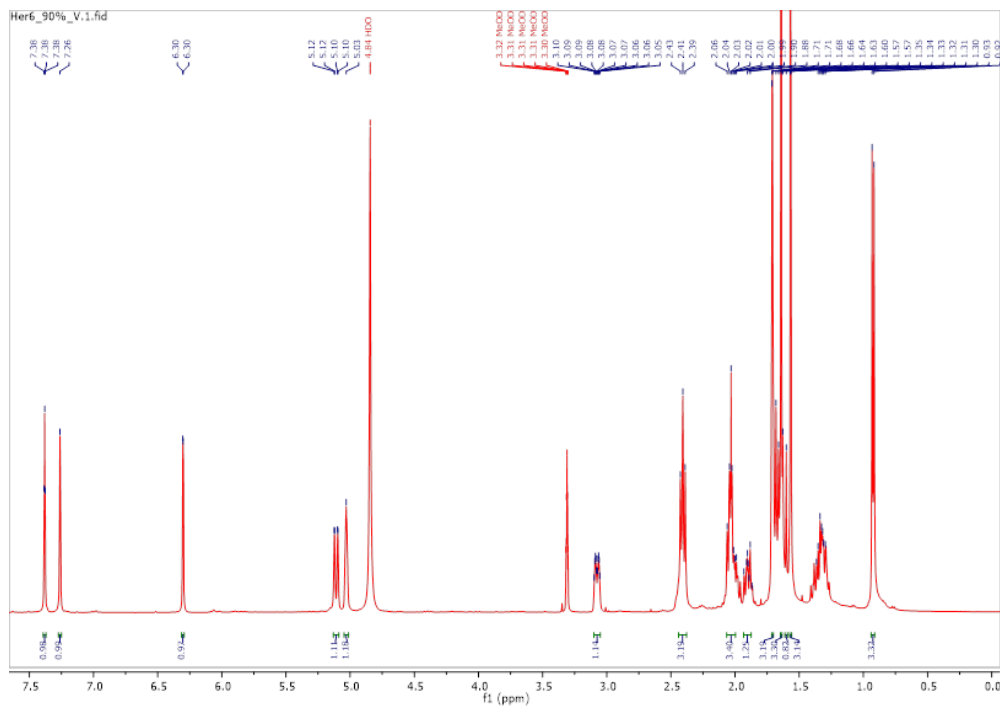
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I
397.2373	1	C ₂₆ H ₂₆ N ₄	397.2387	3.5	3.1	15.0	ok	even		29.7	43.4
397.2373	2	C ₂₅ H ₃₃ O ₄	397.2373	0.2	0.0	10.0	ok	even		42.6	61.2
397.2373	3	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₂	397.2347	-6.6	-7.5	11.0	ok	even		56.6	84.5
397.2373	4	C ₂₀ H ₃₃ N ₂ O ₆	397.2333	-10.0	-10.6	6.0	ok	even		69.5	103.4
397.2373	5	C ₁₄ H ₃₃ N ₆ O ₇	397.2405	8.2	6.8	2.0	ok	even		98.7	153.5
397.2373	6	C ₁₁ H ₂₅ N ₁₆ O	397.2392	4.8	1.6	8.0	ok	even		99.6	159.5
397.2373	7	C ₁₀ H ₂₉ N ₁₂ O ₅	397.2378	1.4	-1.1	3.0	ok	even		112.3	180.1

C

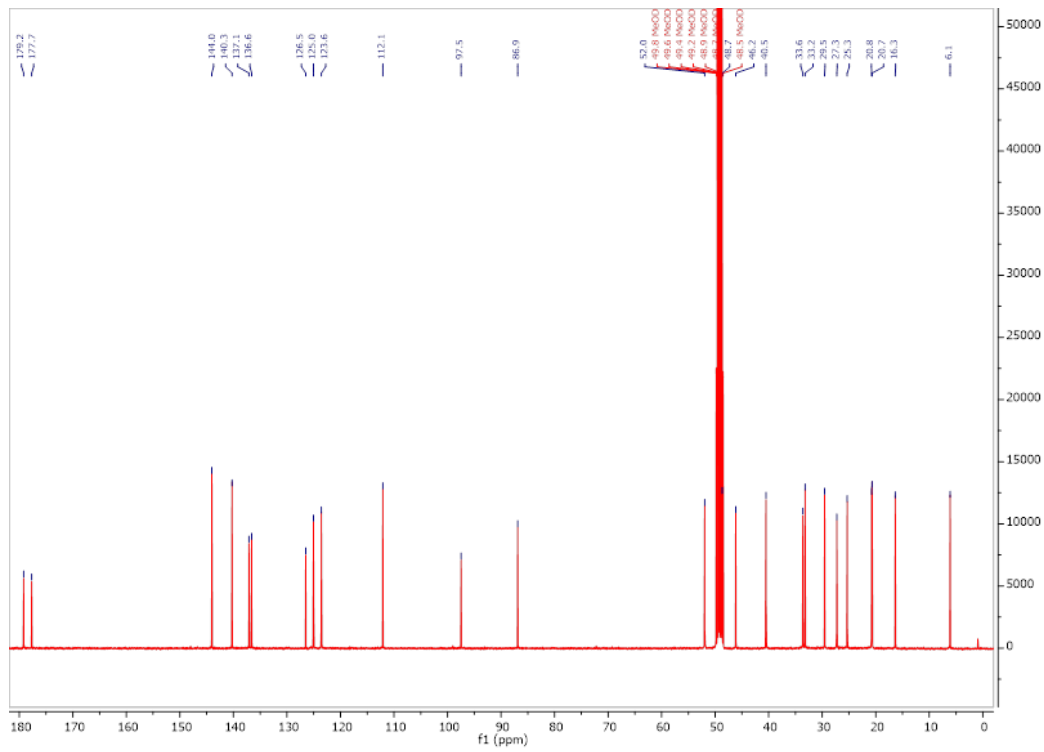


Anhang 1 Ircinianin (90%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv-Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.

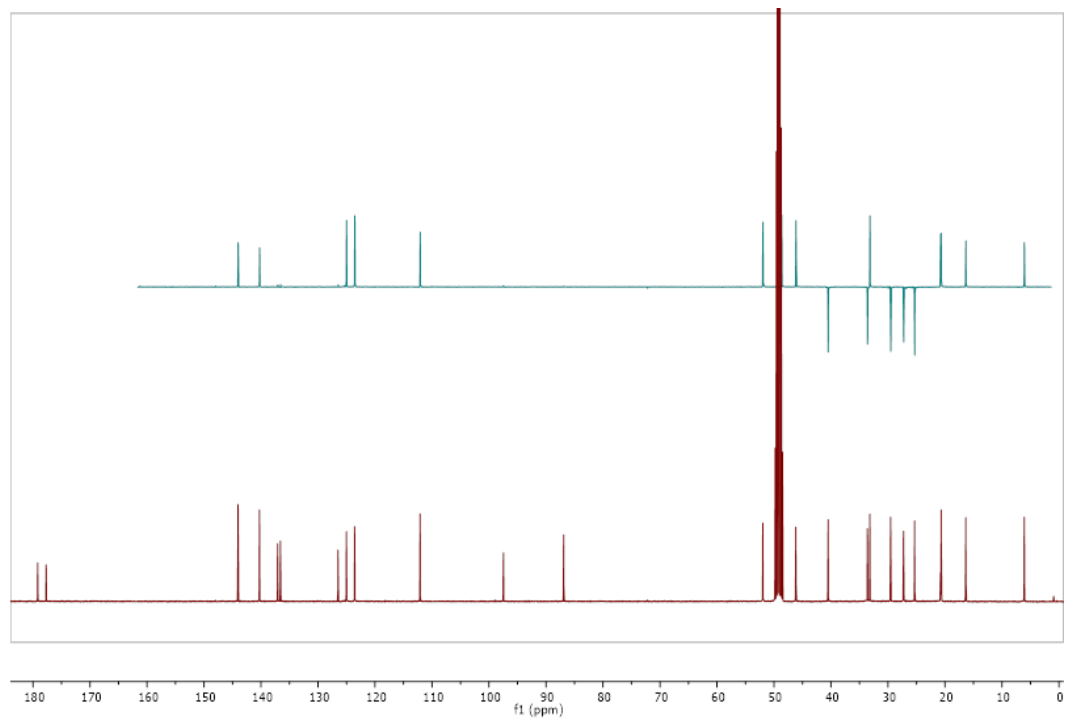


Anhang 2 ¹H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d₄.

Anhang

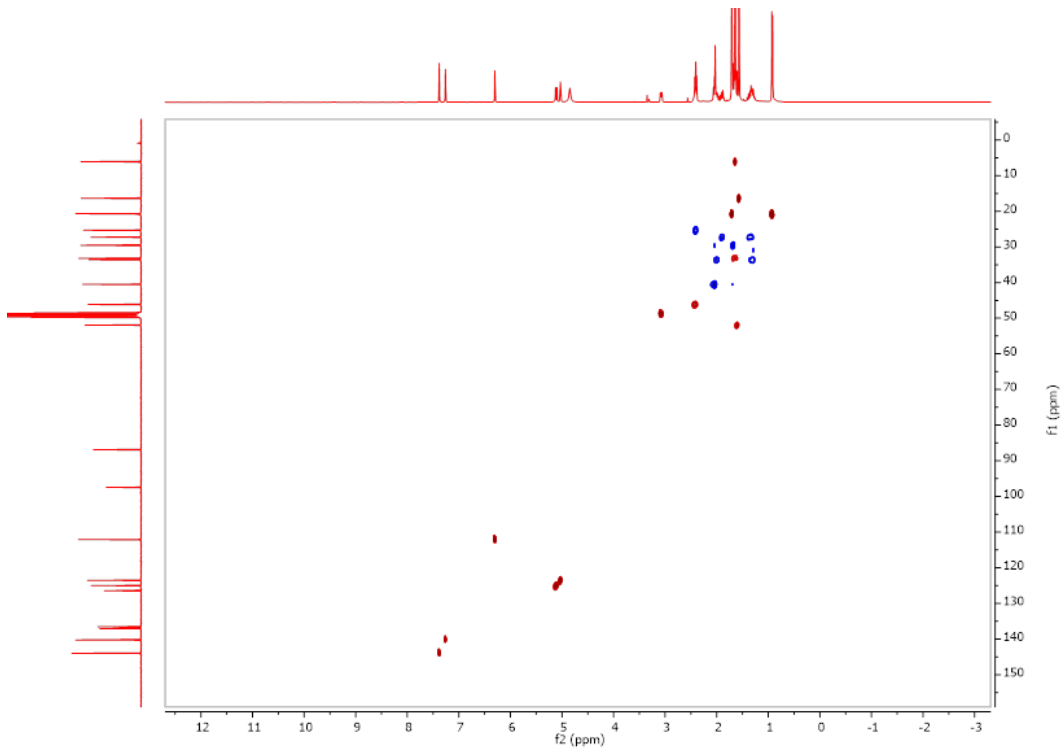


Anhang 3 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz) Ircinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

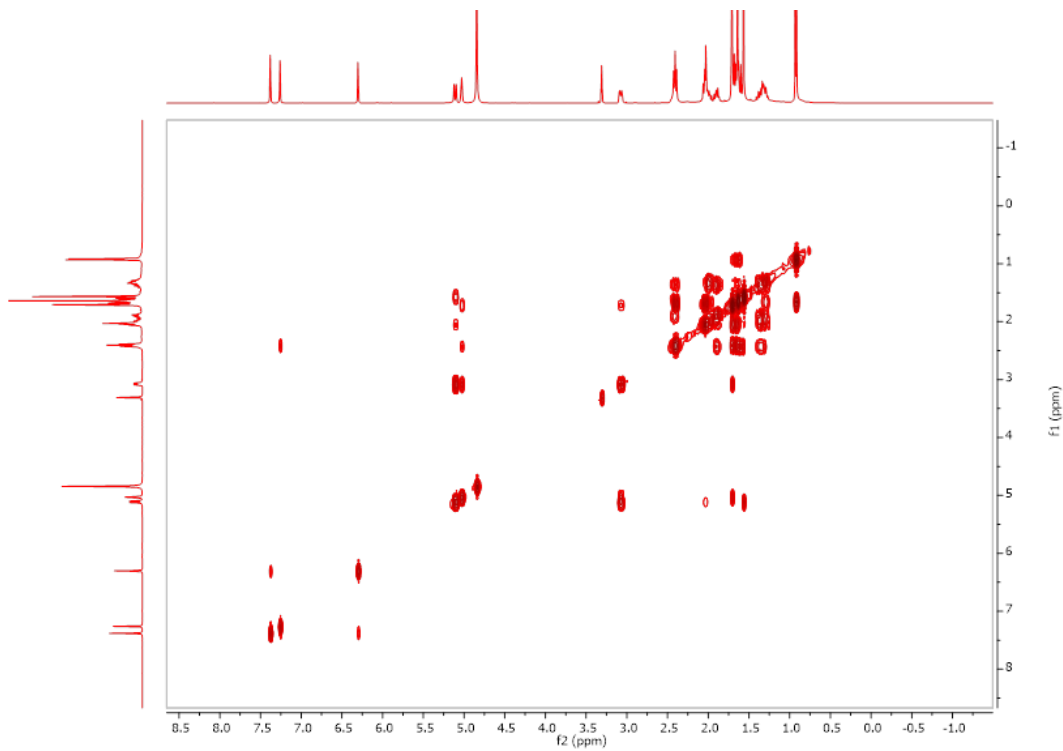


Anhang 4 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz, unten) und DEPT 135 NMR Spektrum (100 MHz, oben) von Ircinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang

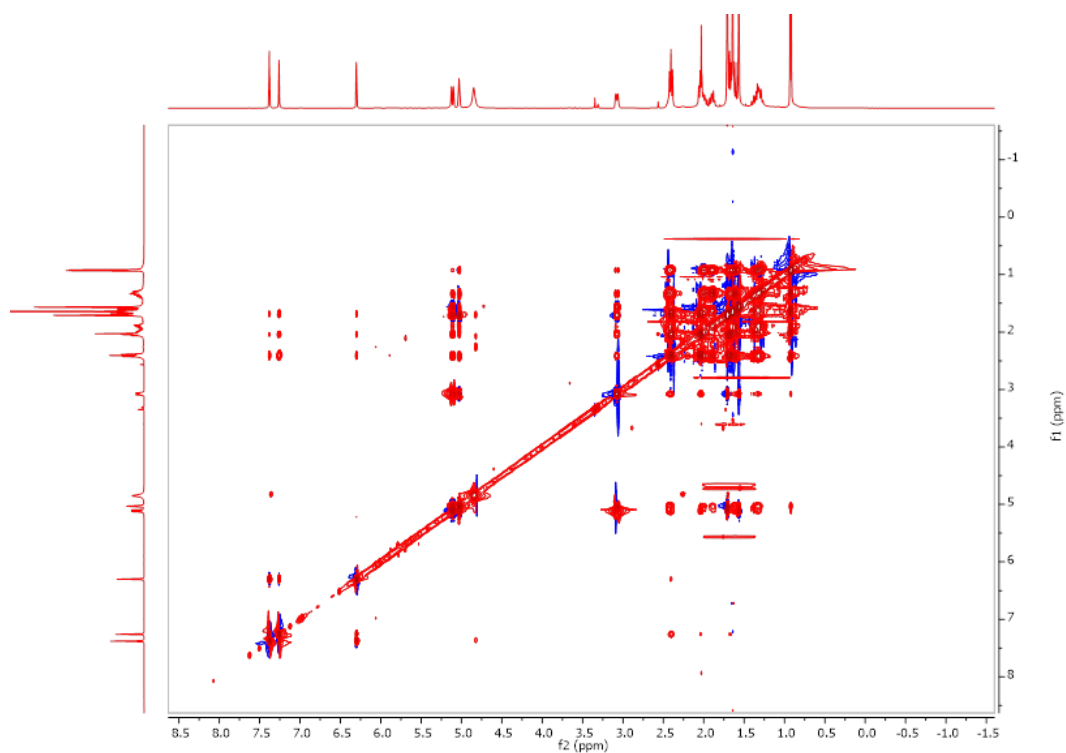


Anhang 5 ^1H - ^{13}C multiplicity edited HSQC NMR Spektrum (400 MHz) Irclinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

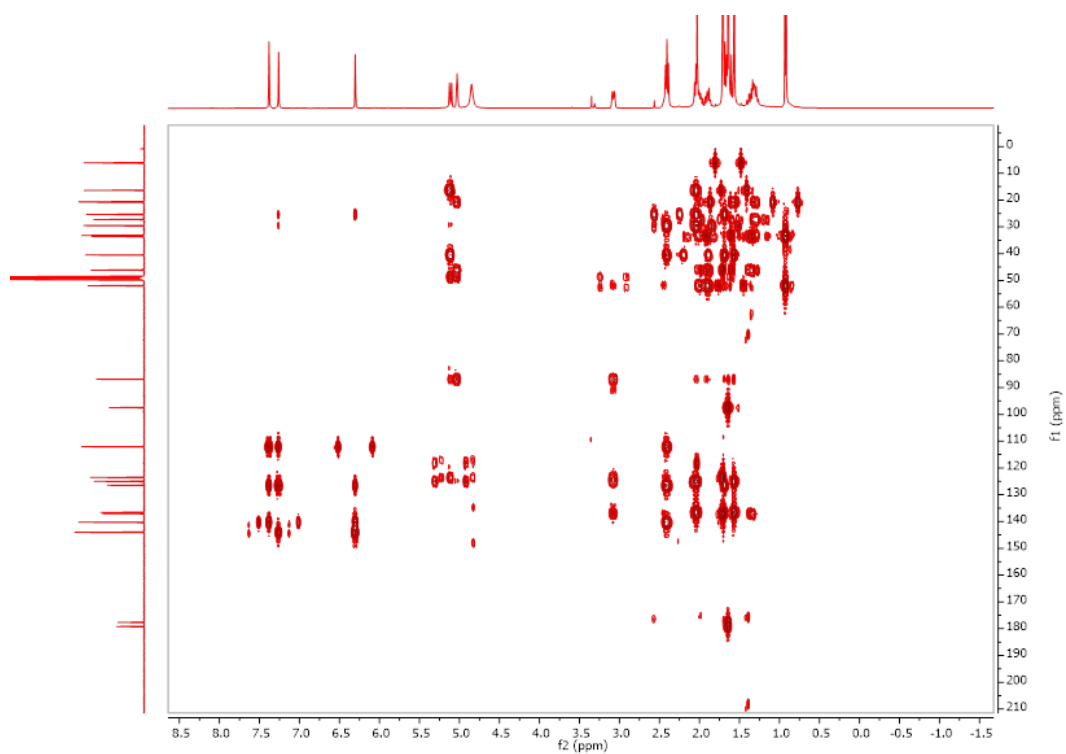


Anhang 6 ^1H - ^1H COSY NMR Spektrum (400 MHz) Irclinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang

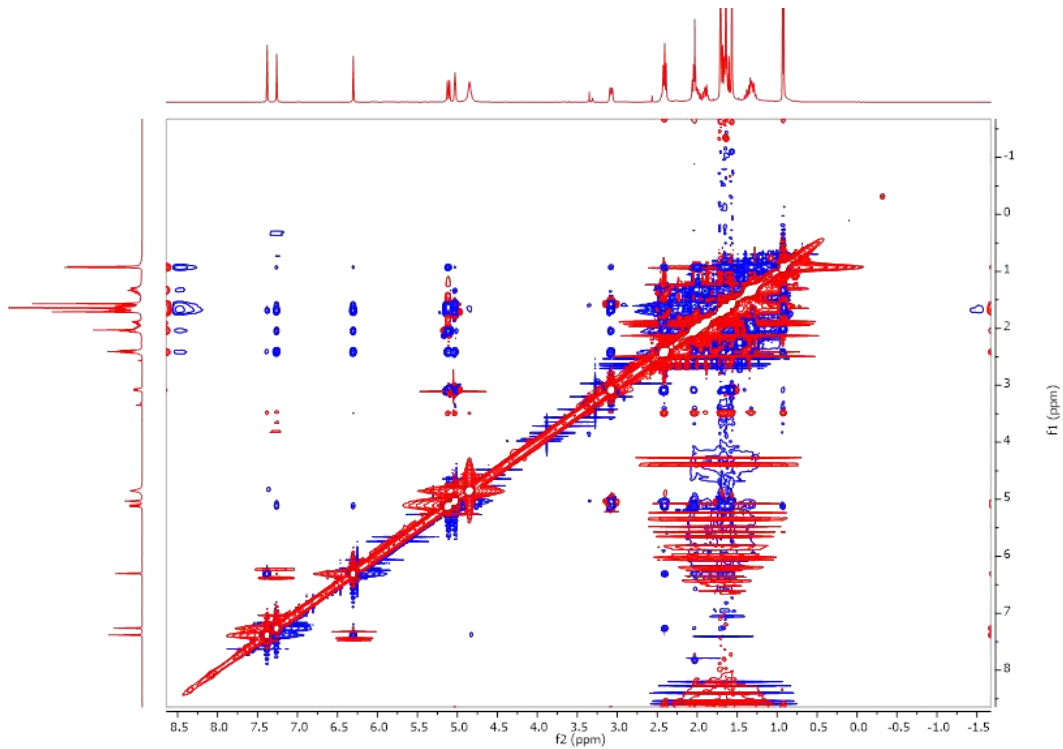


Anhang 7 ¹H-¹H TOCSY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d₄.



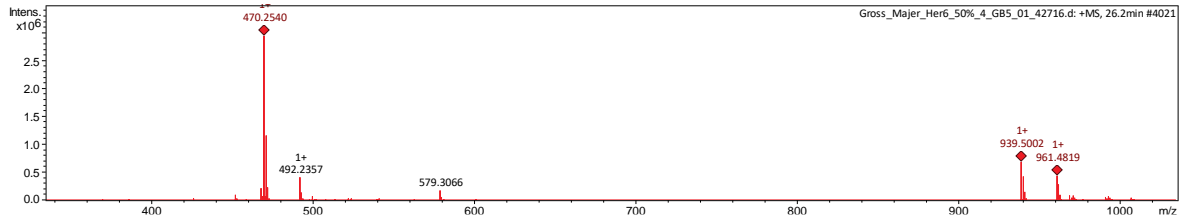
Anhang 8 ¹H-¹³C HMBC NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d₄.

Anhang



Anhang 9 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (400 MHz) Irchinianin (90%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

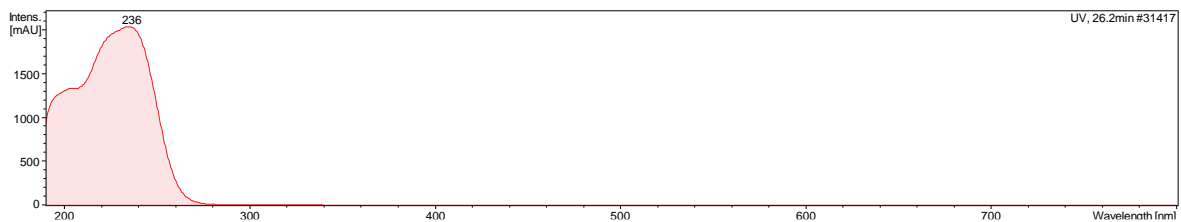
A



B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
470.2540	1	C ₂₈ H ₃₂ N ₅ O ₂	470.2551	2.3	2.3	16.0	ok	even	35.6	56.5
470.2540	2	C ₂₇ H ₃₆ NO ₆	470.2537	-0.5	-0.3	11.0	ok	even	46.7	72.9
470.2540	3	C ₂₄ H ₂₈ N ₁₁	470.2524	-3.4	-4.2	17.0	ok	even	55.4	77.6
470.2540	4	C ₂₃ H ₃₂ N ₇ O ₄	470.2510	-6.2	-6.7	12.0	ok	even	68.0	95.0
470.2540	5	C ₁₆ H ₃₆ N ₇ O ₉	470.2569	6.3	5.4	3.0	ok	even	110.2	161.1
470.2540	6	C ₁₃ H ₂₈ N ₁₇ O ₃	470.2556	3.4	1.3	9.0	ok	even	111.3	166.9
470.2540	7	C ₁₂ H ₃₂ N ₁₃ O ₇	470.2542	0.6	-1.2	4.0	ok	even	123.9	186.6
470.2540	8	C ₉ H ₂₄ N ₂₃ O	470.2529	-2.3	-5.8	10.0	ok	even	125.1	192.9

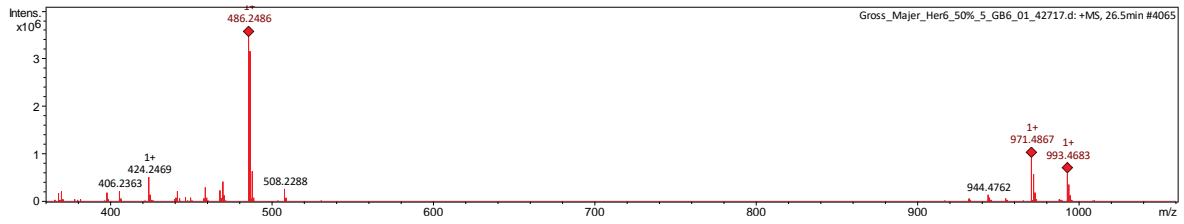
C



Anhang 10 Irchinianin Lactam A (50%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv-Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.

Anhang

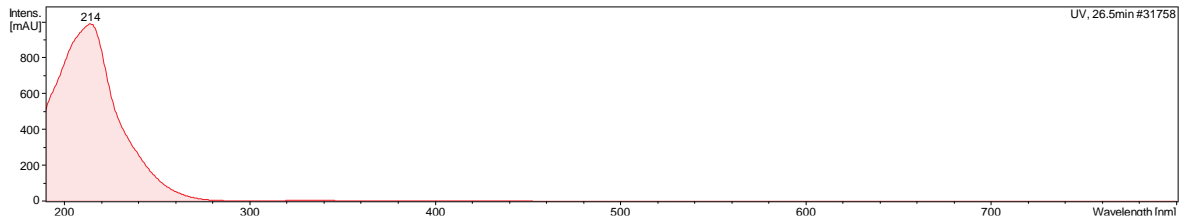
A



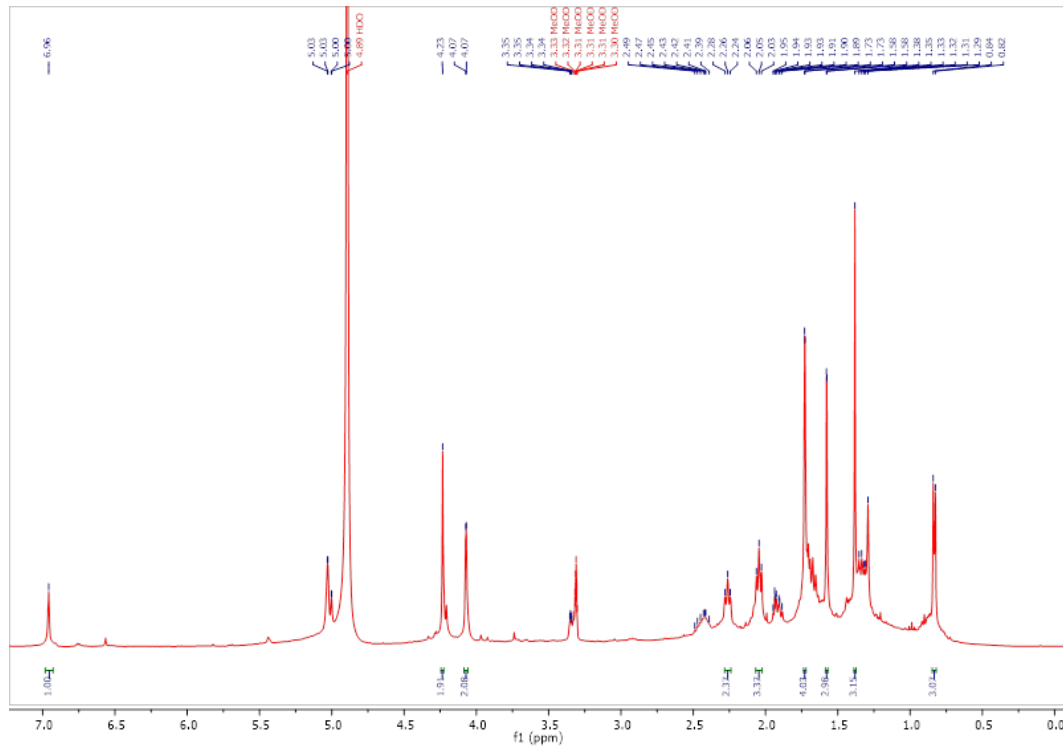
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
486.2486	1	C ₂₈ H ₃₂ N ₅ O ₃	486.2500	2.9	4.1	16.0	ok	even	300.2	318.9
486.2486	2	C ₂₇ H ₃₀ N ₇ O	486.2486	0.1	1.6	11.0	ok	even	311.6	335.7
486.2486	3	C ₂₃ H ₃₂ N ₇ O ₅	486.2459	-5.4	-4.7	12.0	ok	even	323.7	358.5
486.2486	4	C ₂₂ H ₃₀ N ₃ O ₉	486.2446	-8.2	-7.2	7.0	ok	even	335.0	376.2
486.2486	5	C ₂₄ H ₂₈ N ₁₁ O	486.2473	-2.7	-2.2	17.0	ok	even	360.7	341.7
486.2486	6	C ₁₄ H ₂₄ N ₂₁	486.2518	6.6	5.4	14.0	ok	even	404.1	411.7
486.2486	7	C ₁₆ H ₃₀ N ₇ O ₁₀	486.2518	6.7	7.1	3.0	ok	even	416.0	425.7
486.2486	8	C ₁₃ H ₂₆ N ₁₇ O ₄	486.2505	3.9	3.1	9.0	ok	even	416.9	431.1
486.2486	9	C ₁₂ H ₃₂ N ₁₃ O ₈	486.2491	1.1	0.7	4.0	ok	even	429.7	451.0
486.2486	10	C ₉ H ₂₄ N ₂₃ O ₂	486.2478	-1.6	-3.6	10.0	ok	even	430.7	457.0

C

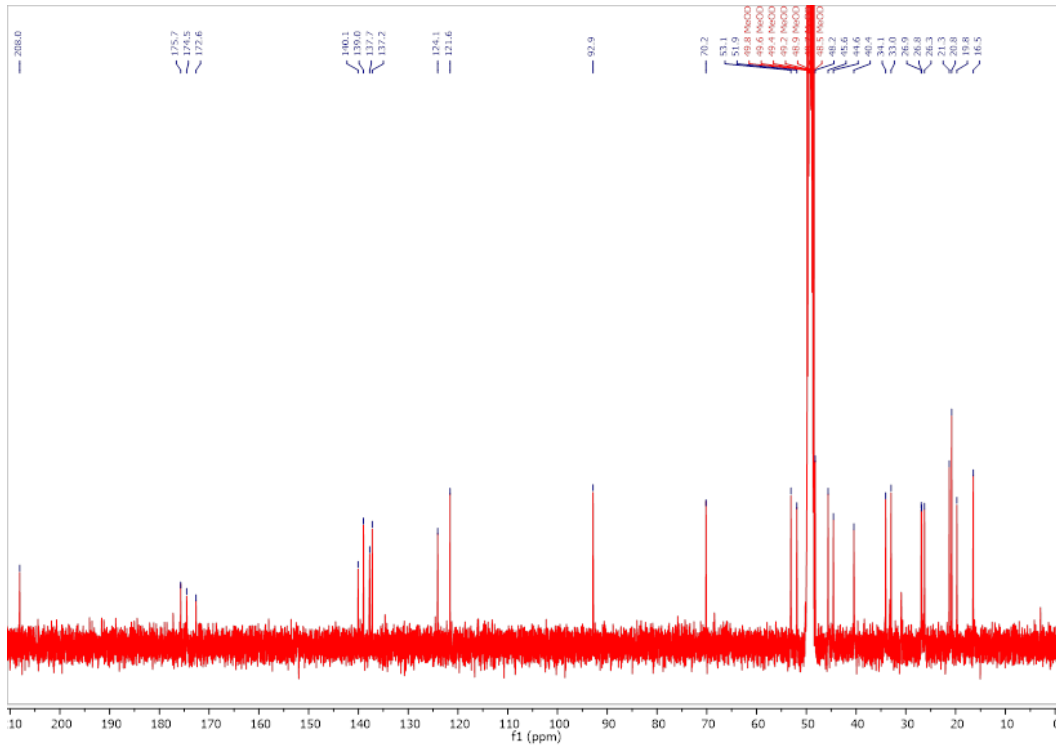


Anhang 13 Oxoircinianin Lactam A (50%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv-Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.



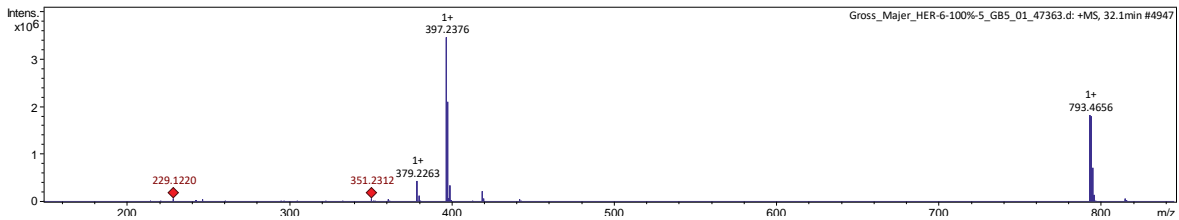
Anhang 14 ¹H NMR Spektrum (400 MHz) Oxoircinianin Lactam A (50%-Fraktion) in MeOH-d₄.

Anhang



Anhang 15 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz) Oxoircinianin Lactam A (50%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

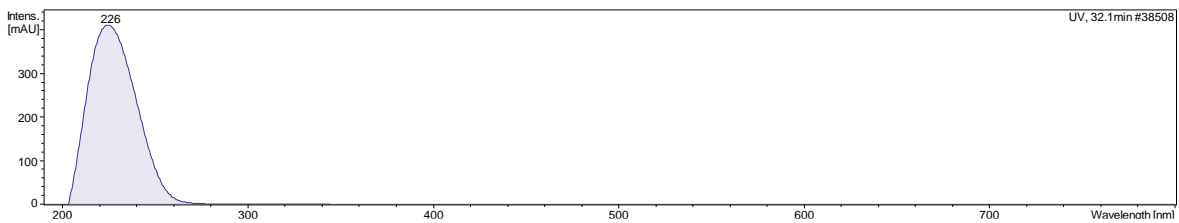
A



B

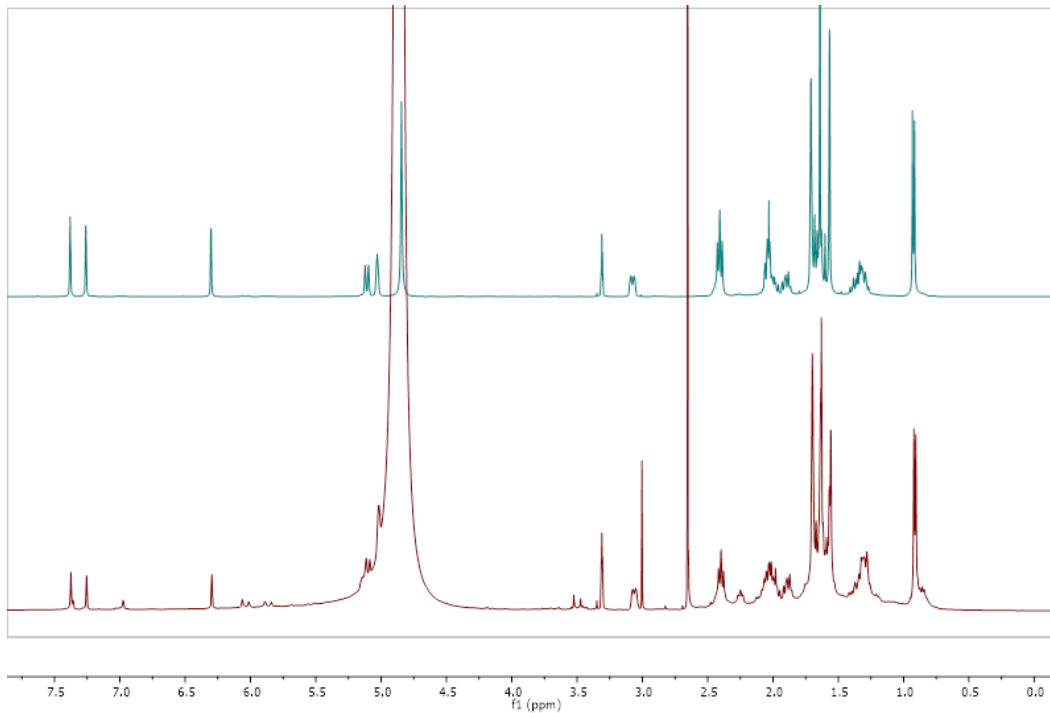
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
397.2376	1	$\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4$	397.2387	2.6	3.2	15.0	ok	even	180.9	209.1
397.2376	2	$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_4$	397.2373	-0.7	0.1	10.0	ok	even	194.0	227.3
397.2376	3	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2$	397.2347	-7.5	-7.4	11.0	ok	even	207.9	250.4
397.2376	4	$\text{C}_{14}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_7$	397.2405	7.3	6.9	2.0	ok	even	250.1	319.6
397.2376	5	$\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{N}_{16}\text{O}$	397.2392	3.9	1.6	8.0	ok	even	250.8	325.4
397.2376	6	$\text{C}_{10}\text{H}_{29}\text{N}_{12}\text{O}_5$	397.2378	0.5	-1.1	3.0	ok	even	263.7	346.2

C



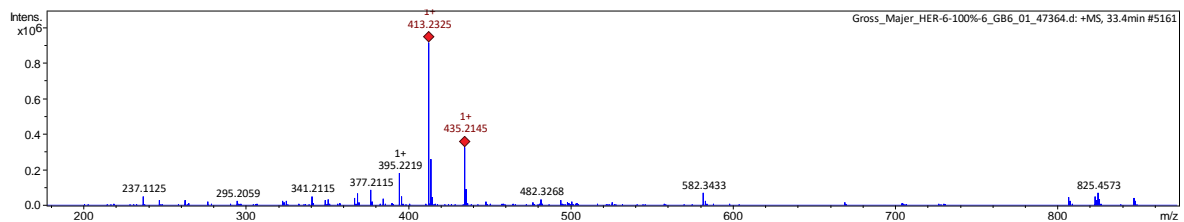
Anhang 16 Ircinianin (100%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.

Anhang



Anhang 17 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin (90%-Fraktion, oben) und Ircinianin (100%-Fraktion, unten) in MeOH-d_4 .

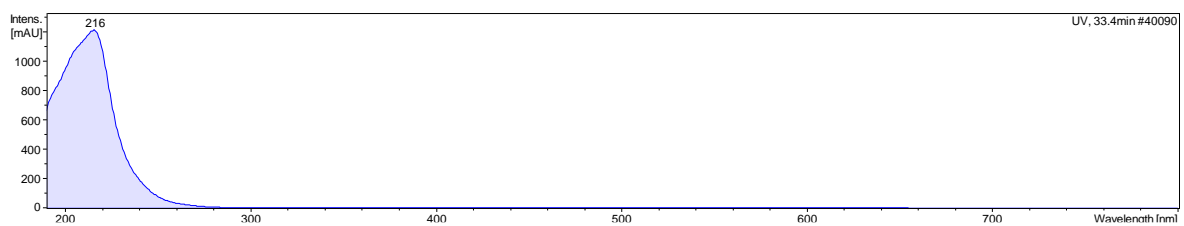
A



B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
413.2325	1	$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_5$	413.2323	-0.7	-0.9	10.0	ok	even	5.5	8.9
413.2325	2	$\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}$	413.2336	2.6	2.0	15.0	ok	even	9.3	11.9
413.2325	3	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3$	413.2296	-7.2	-8.1	11.0	ok	even	19.7	32.5

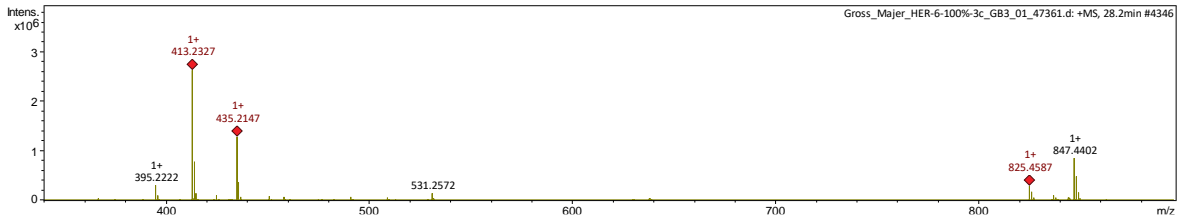
C



Anhang 18 Oxoircinianin (100%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformel; C: UV-Profil.

Anhang

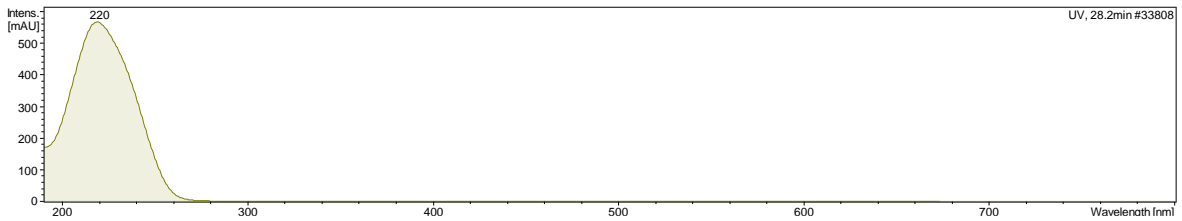
A



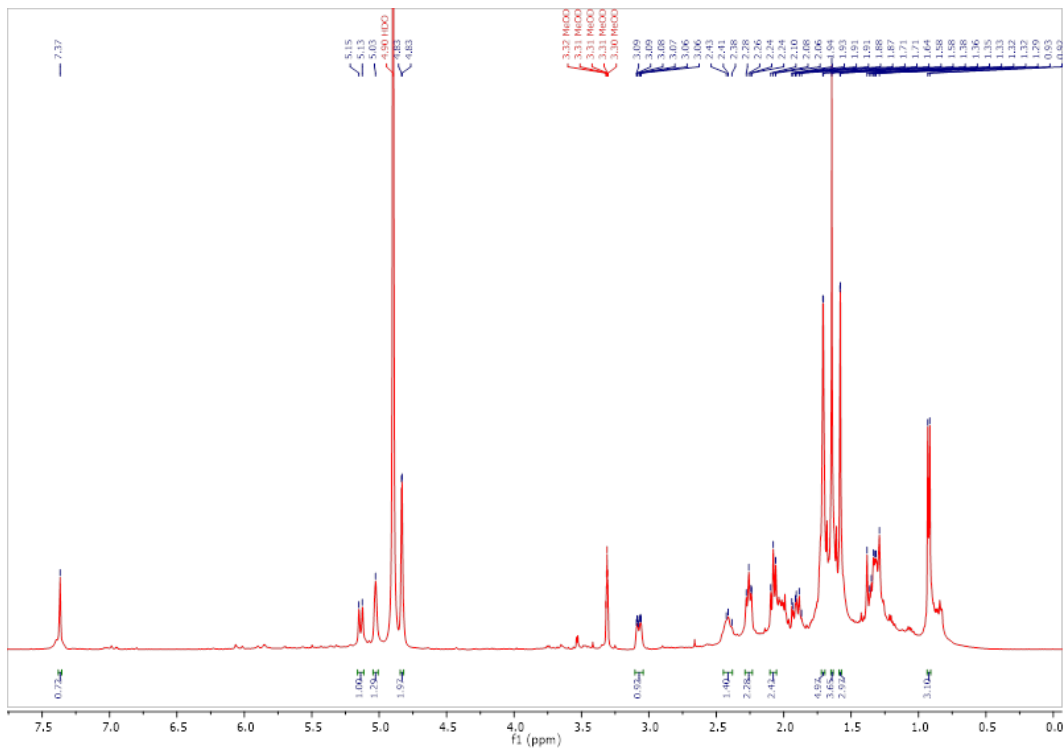
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
413.2327	1	C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O	413.2336	2.1	1.5	15.0	ok	even	4.6	6.3
413.2327	2	C ₂₅ H ₃₃ O ₅	413.2323	-1.1	-1.4	10.0	ok	even	11.6	17.7
413.2327	3	C ₂₁ H ₂₉ N ₆ O ₃	413.2296	-7.6	-8.6	11.0	ok	even	25.7	41.2
413.2327	4	C ₁₄ H ₃₃ N ₆ O ₈	413.2354	6.6	5.1	2.0	ok	even	67.6	109.7
413.2327	5	C ₁₁ H ₂₅ N ₁₆ O ₂	413.2341	3.3	0.2	8.0	ok	even	68.6	115.8
413.2327	6	C ₁₀ H ₂₉ N ₁₂ O ₆	413.2328	0.1	-2.4	3.0	ok	even	81.2	136.3
413.2327	7	C ₇ H ₂₁ N ₂₂	413.2314	-3.2	-8.3	9.0	ok	even	82.4	143.0

C

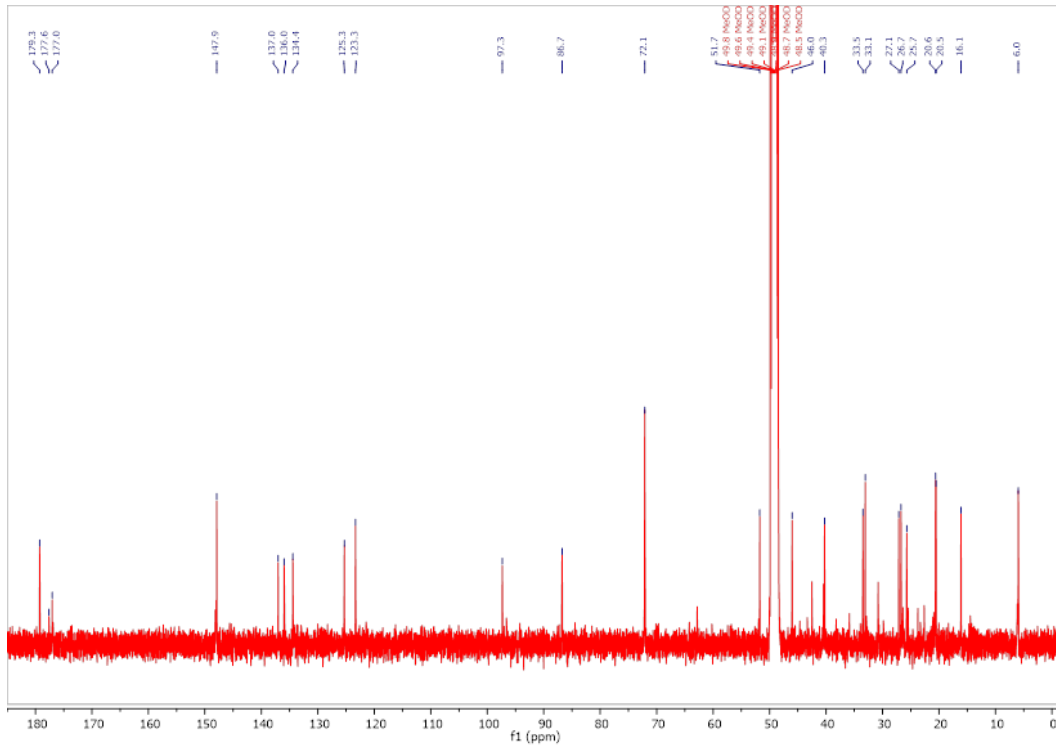


Anhang 19 Ircinianin Lacton A (100%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profi.

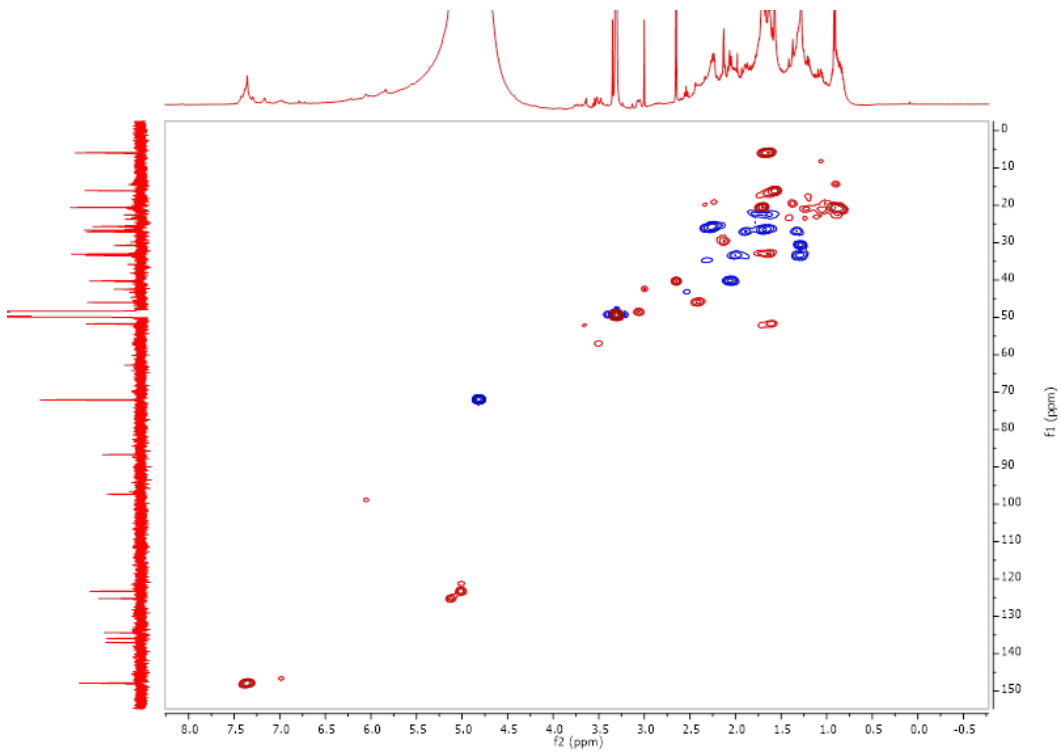


Anhang 20 ¹H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton A (100%-Fraktion) in MeOH-d₄.

Anhang



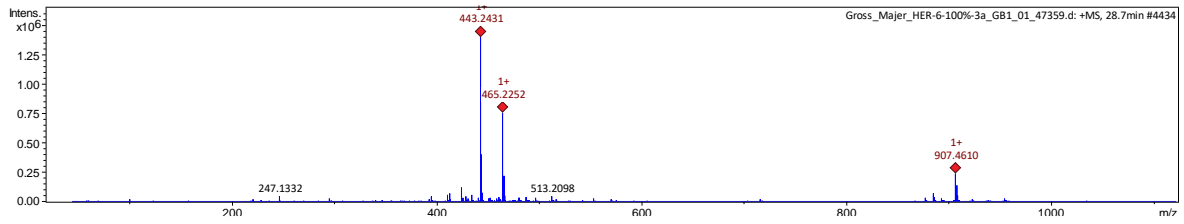
Anhang 21 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz) Ircinianin Lacton A (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .



Anhang 22 ^1H - ^{13}C multiplicity edited HSQC NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton A (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang

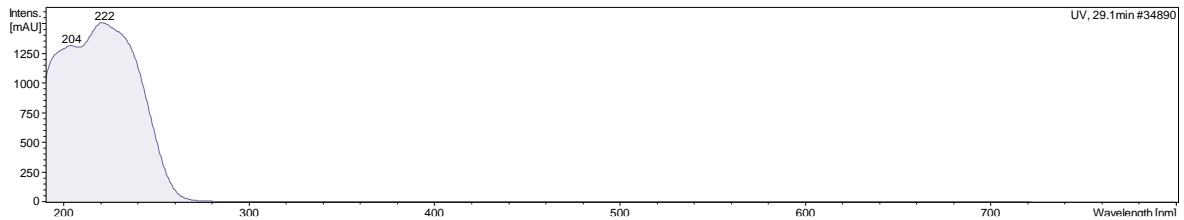
A



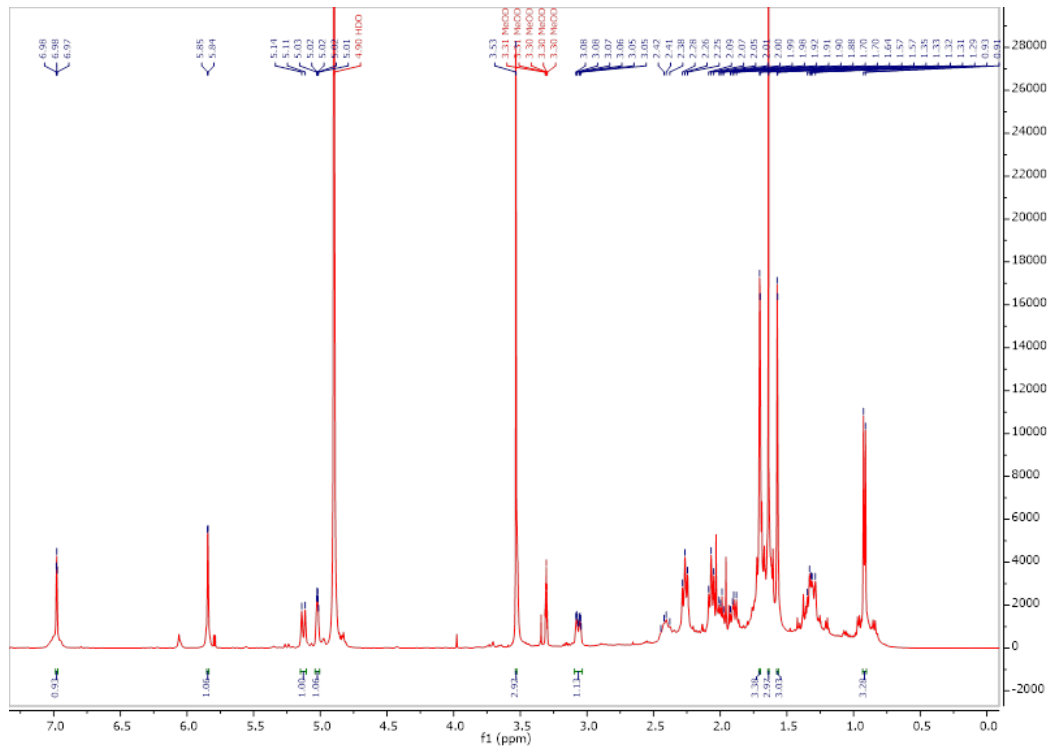
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I
443.2431	1	C ₂₆ H ₃₅ O ₆	443.2428	-0.6	-2.1	10.0	ok	even		3.2	7.1
443.2431	2	C ₂₃ H ₂₇ N ₁₀	443.2415	-3.7	-5.2	16.0	ok	even		10.1	16.3
443.2431	3	C ₂₇ H ₃₁ N ₄ O ₂	443.2442	2.4	1.5	15.0	ok	even		13.3	17.0
443.2431	4	C ₂₂ H ₃₁ N ₆ O ₄	443.2401	-6.7	-7.9	11.0	ok	even		16.5	27.6

C

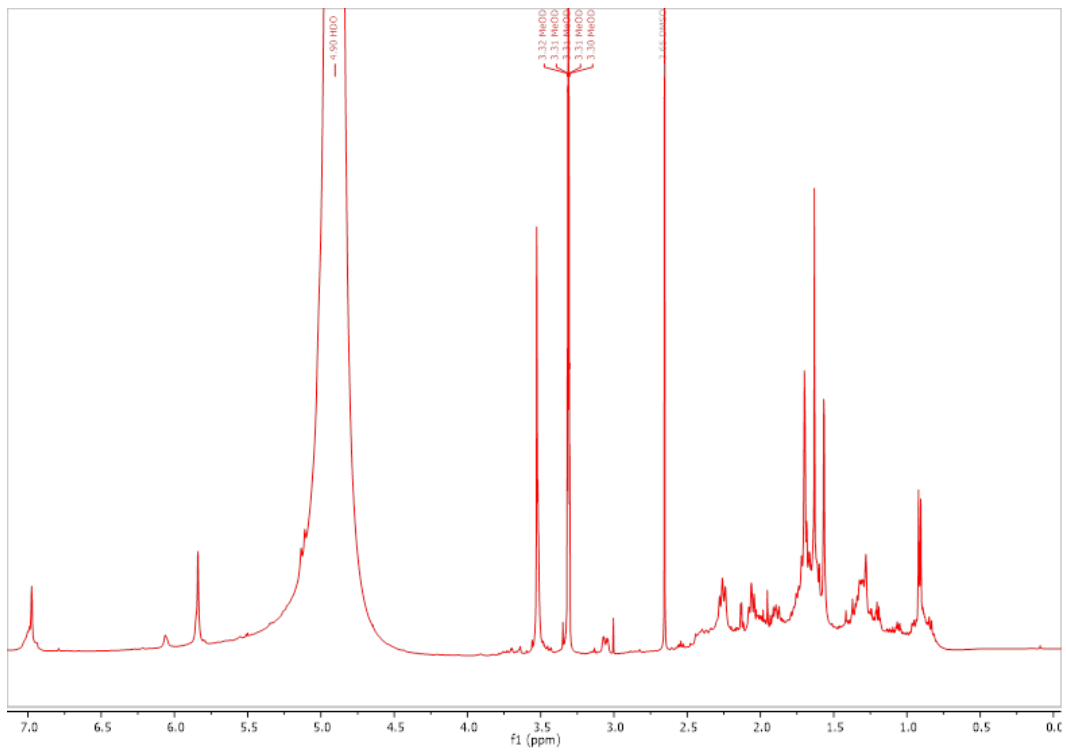


Anhang 23 Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv-Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.

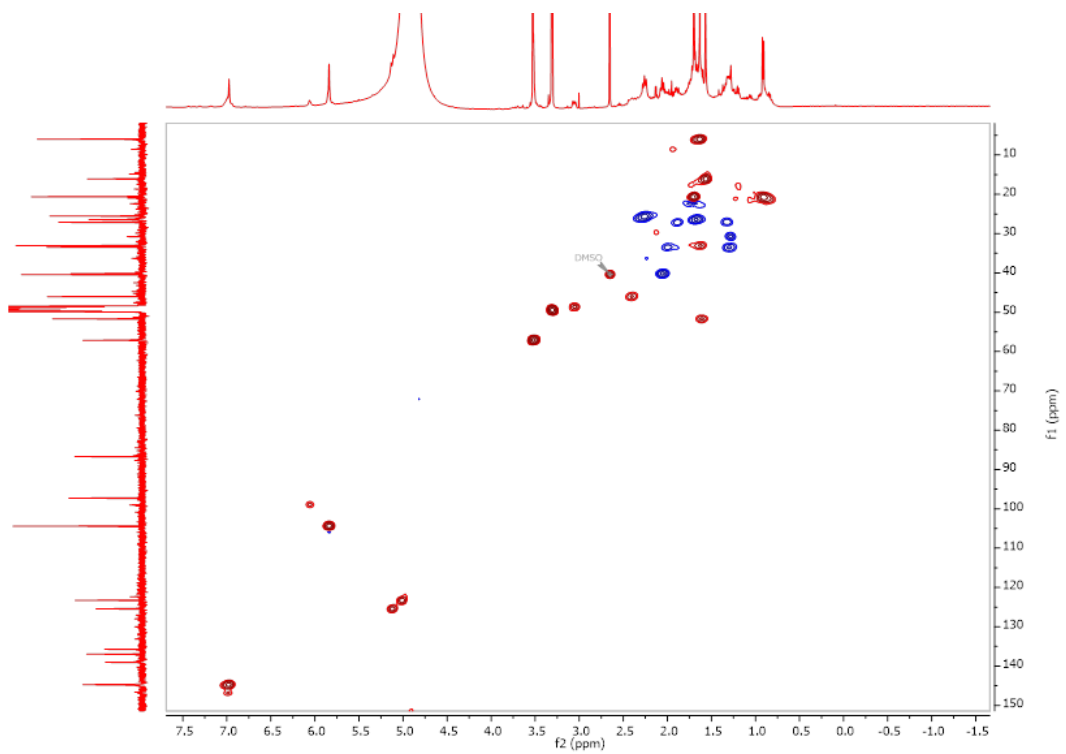


Anhang 24 ¹H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d₄.

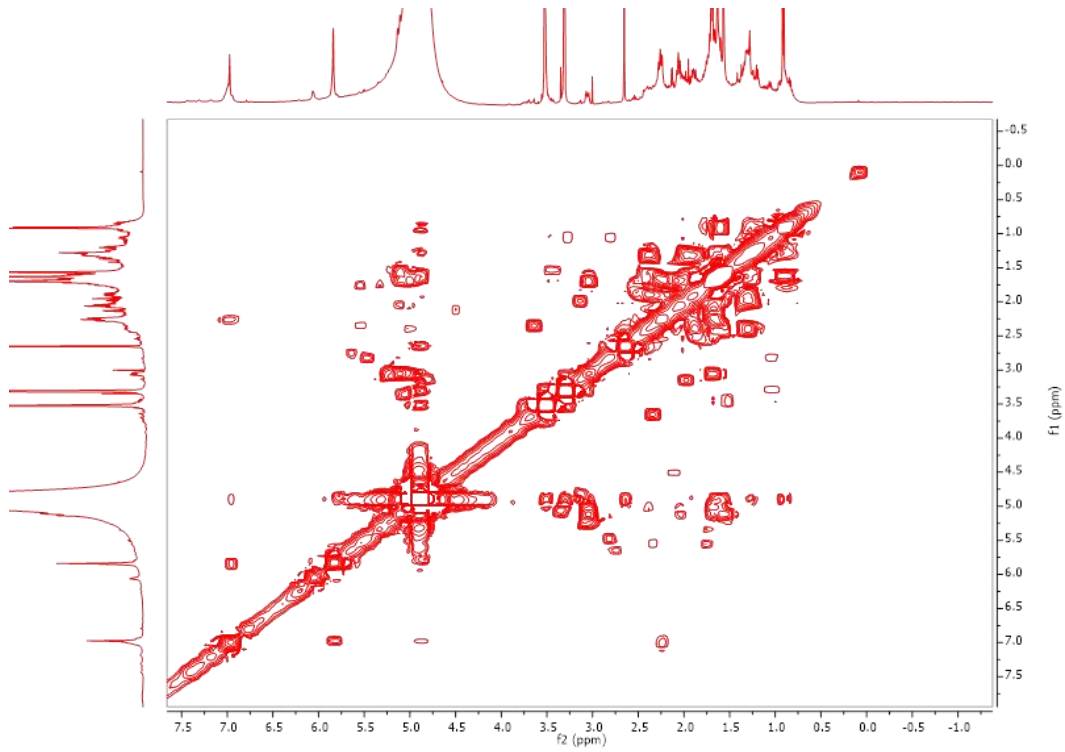
Anhang



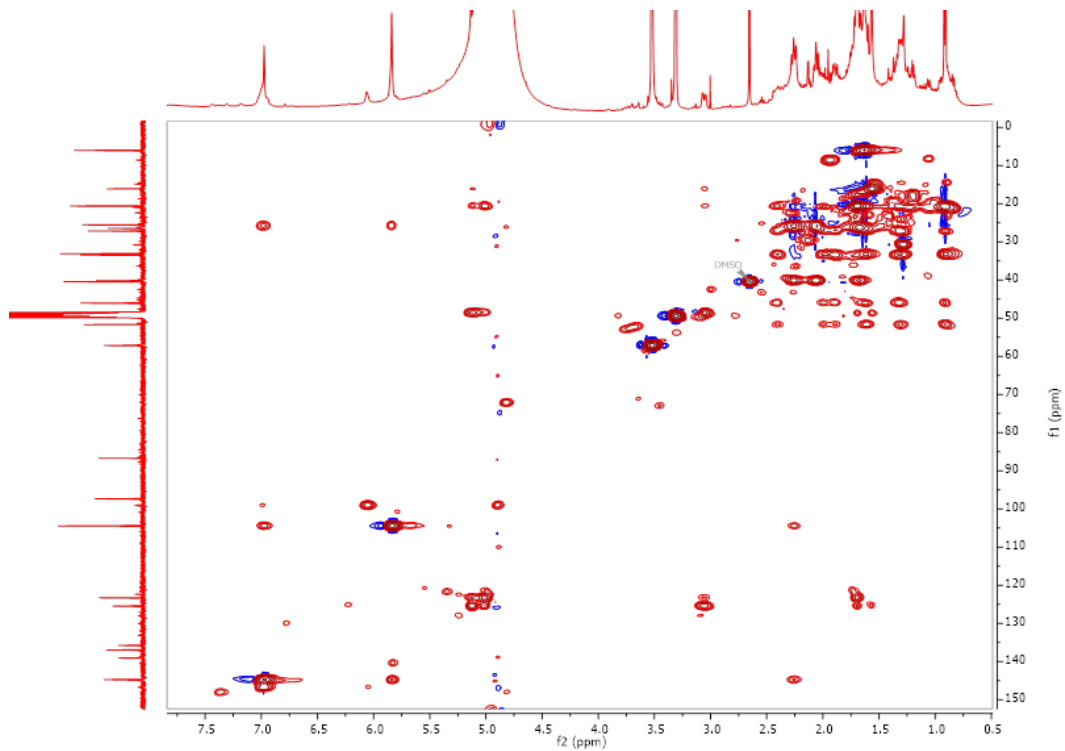
Anhang 27 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 vor den weiteren 2D NMR Experimenten.



Anhang 28 ^1H - ^{13}C multiplicity edited HSQC NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

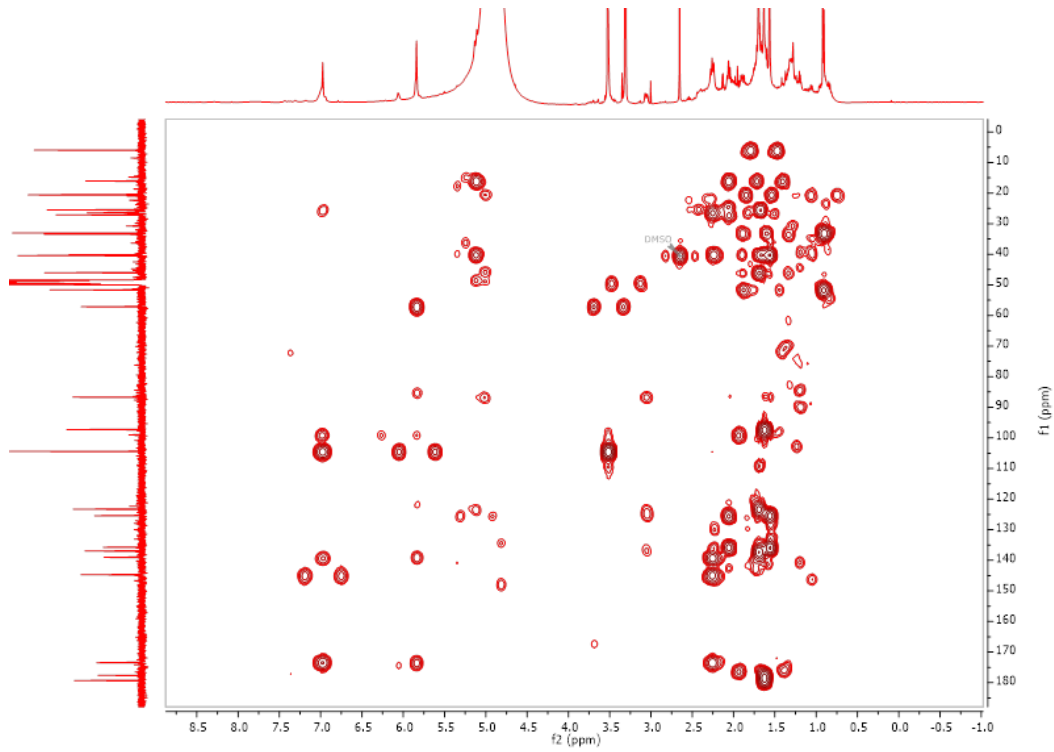


Anhang 29 ^1H - ^1H COSY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

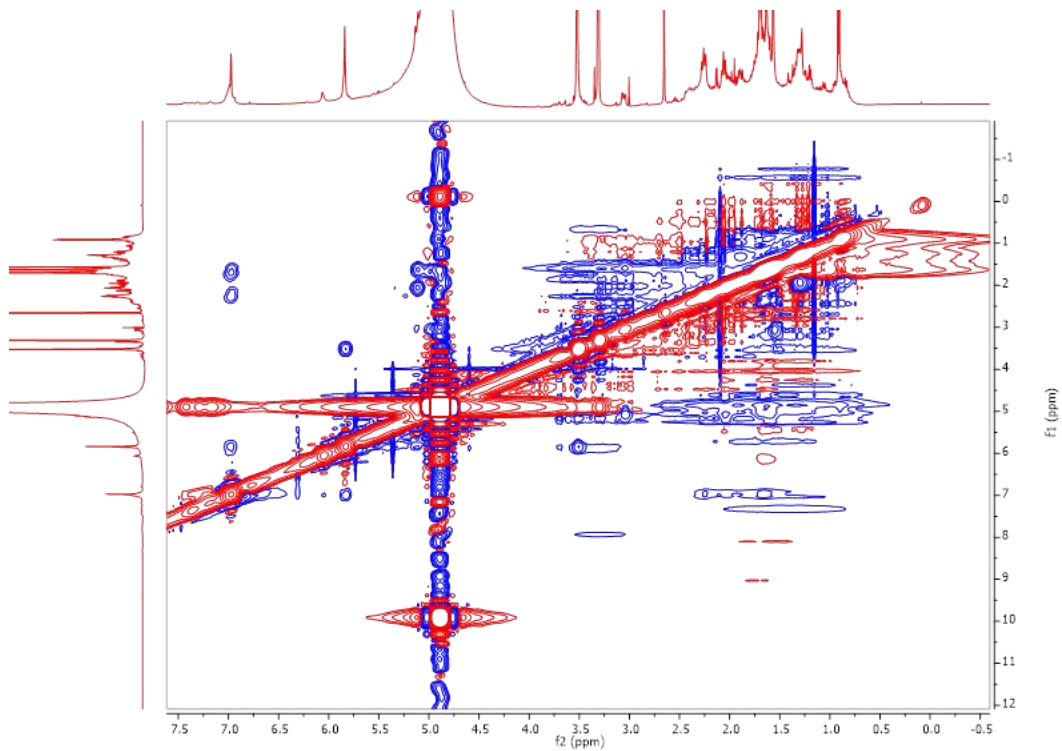


Anhang 30 ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang



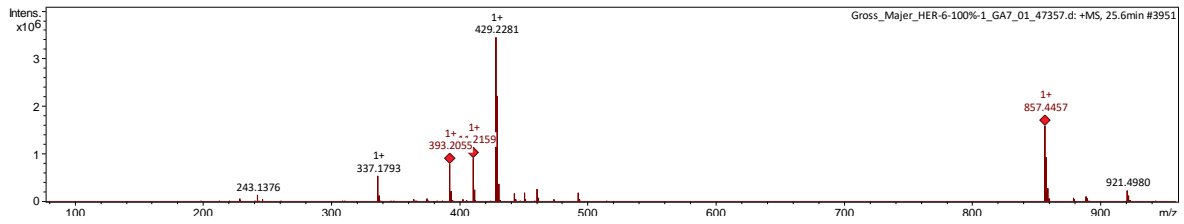
Anhang 31 ^1H - ^{13}C HMBC NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .



Anhang 32 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton B (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang

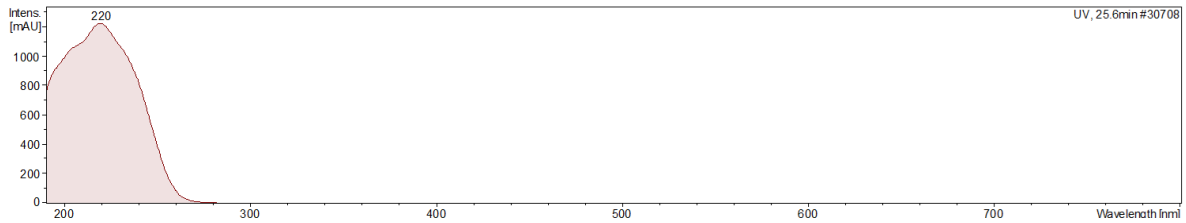
A



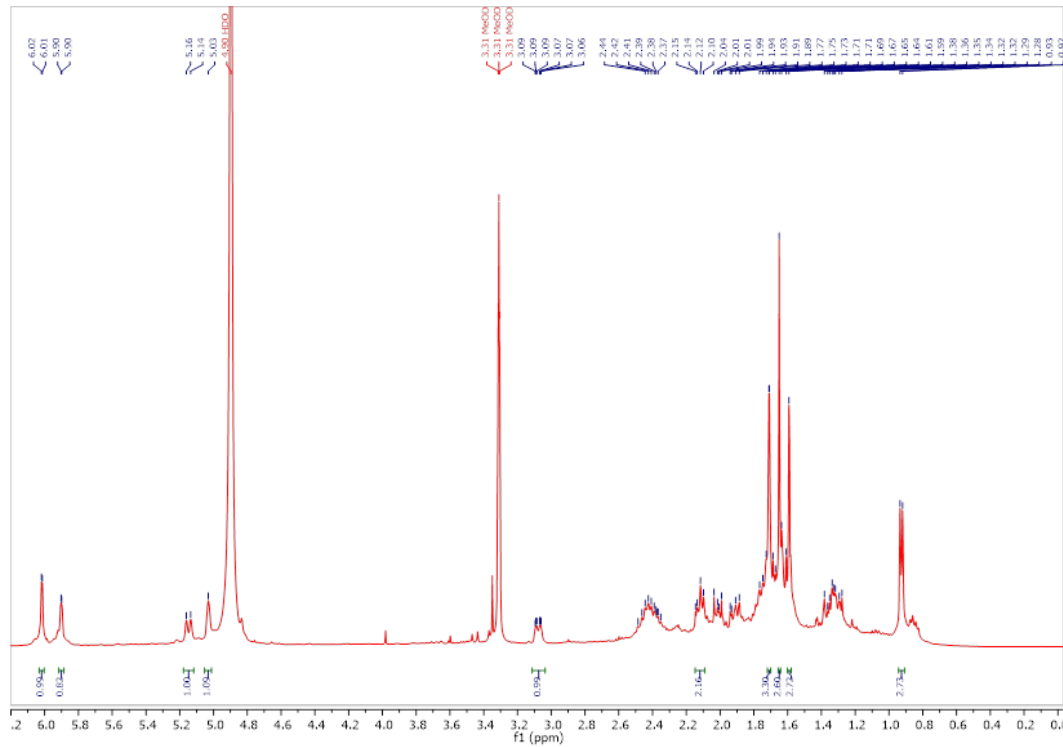
B

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I
429.2281	1	C ₂₅ H ₃₃ O ₆	429.2272	-2.3	-0.1	10.0	ok	even	185.1	242.6
429.2281	2	C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O ₂	429.2285	0.8	2.4	15.0	ok	even	200.5	225.2
429.2281	3	C ₂₂ H ₂₅ N ₁₀	429.2258	-5.4	-4.7	16.0	ok	even	214.4	247.7
429.2281	4	C ₂₁ H ₂₉ N ₆ O ₄	429.2245	-8.5	-7.5	11.0	ok	even	227.5	266.3
429.2281	5	C ₁₅ H ₂₉ N ₁₀ O ₅	429.2317	8.3	8.5	7.0	ok	even	256.8	314.9
429.2281	6	C ₁₄ H ₃₃ N ₆ O ₉	429.2304	5.1	5.8	2.0	ok	even	269.7	335.1
429.2281	7	C ₁₁ H ₂₅ N ₁₆ O ₃	429.2290	2.0	1.1	8.0	ok	even	270.5	340.7
429.2281	8	C ₁₀ H ₂₉ N ₁₂ O ₇	429.2277	-1.1	-1.5	3.0	ok	even	283.3	361.5
429.2281	9	C ₇ H ₂₁ N ₂₂ O	429.2263	-4.3	-6.9	9.0	ok	even	284.1	367.6

C

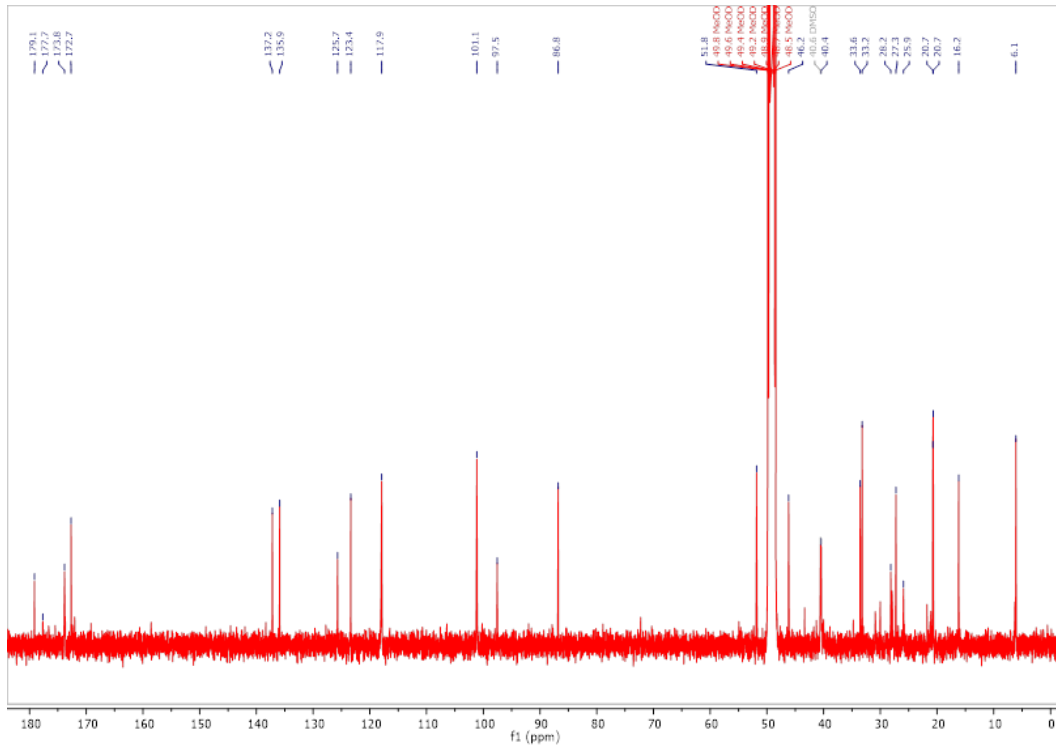


Anhang 33 Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) MS-Analyse im Positiv Modus – A: HRMS-Ergebnisse; B: Summenformelanalyse; C: UV-Profil.

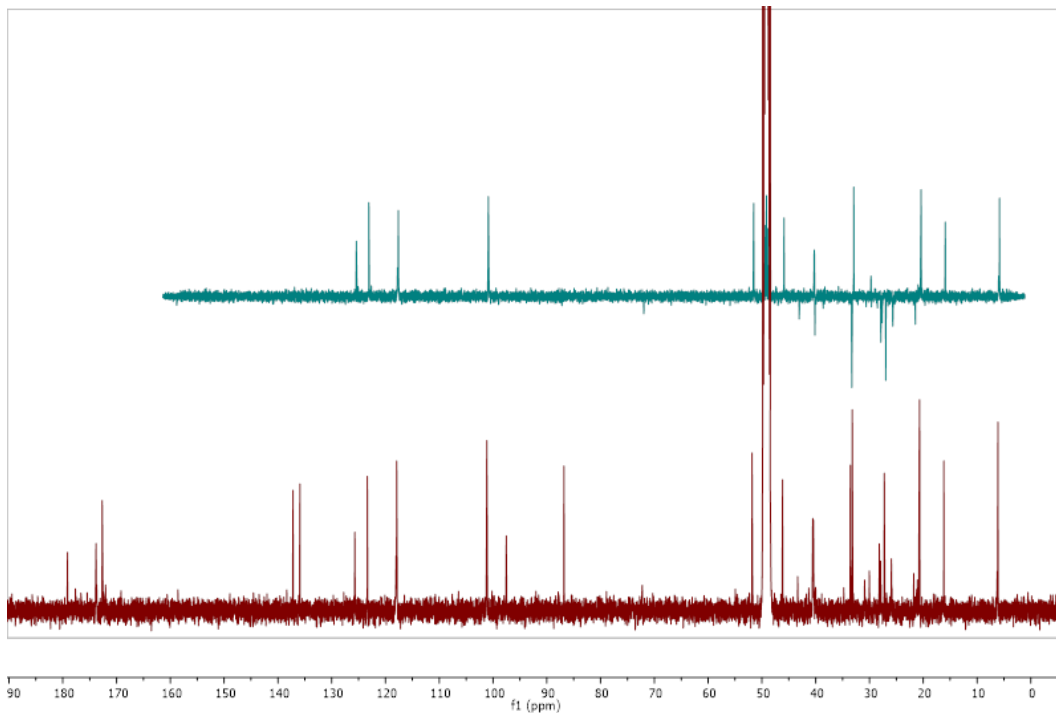


Anhang 34 ¹H NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH-d₄.

Anhang

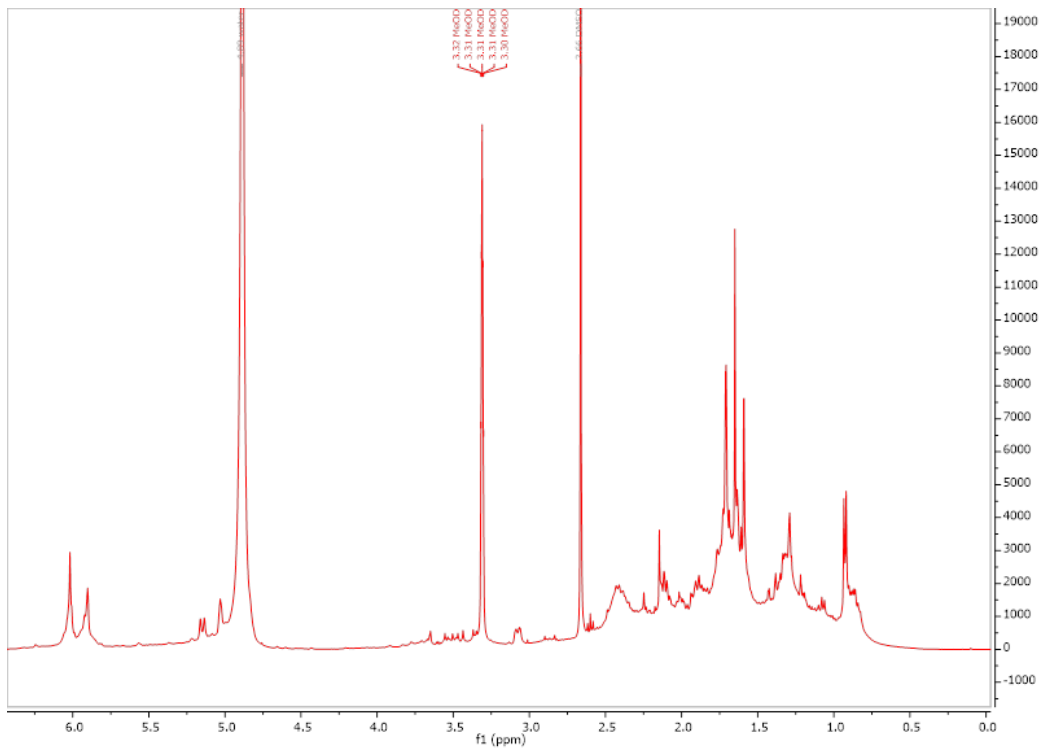


Anhang 35 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz) Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

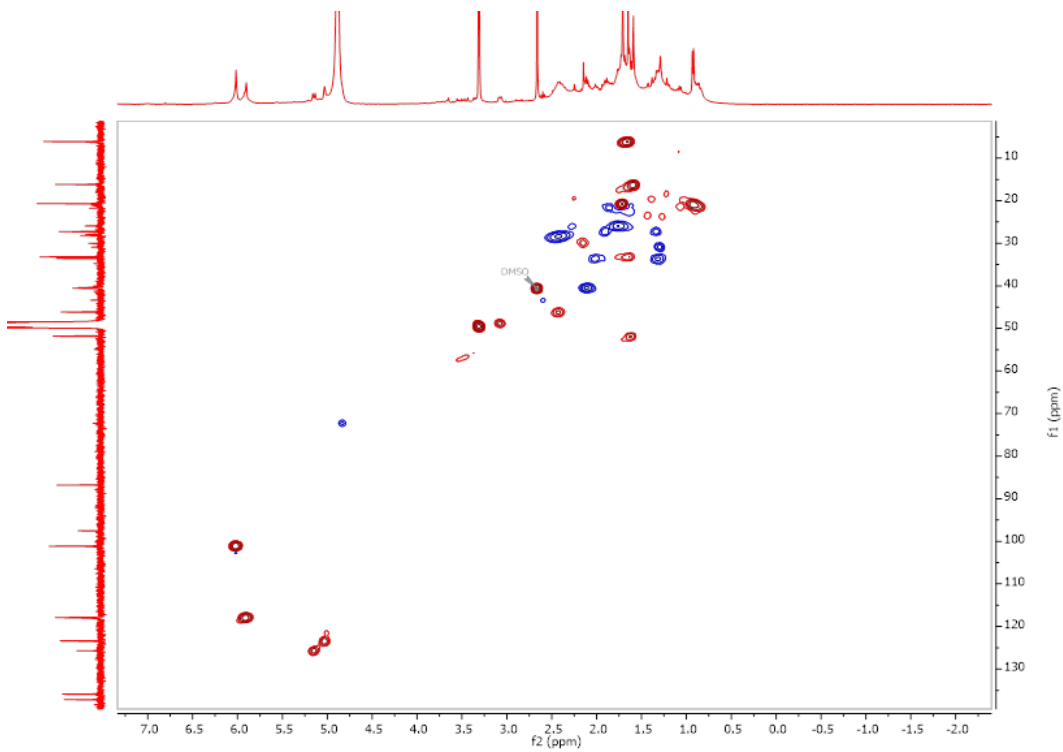


Anhang 36 ^{13}C NMR Spektrum (100 MHz, unten) und DEPT 135 NMR Spektrum (100 MHz, oben) von Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .

Anhang

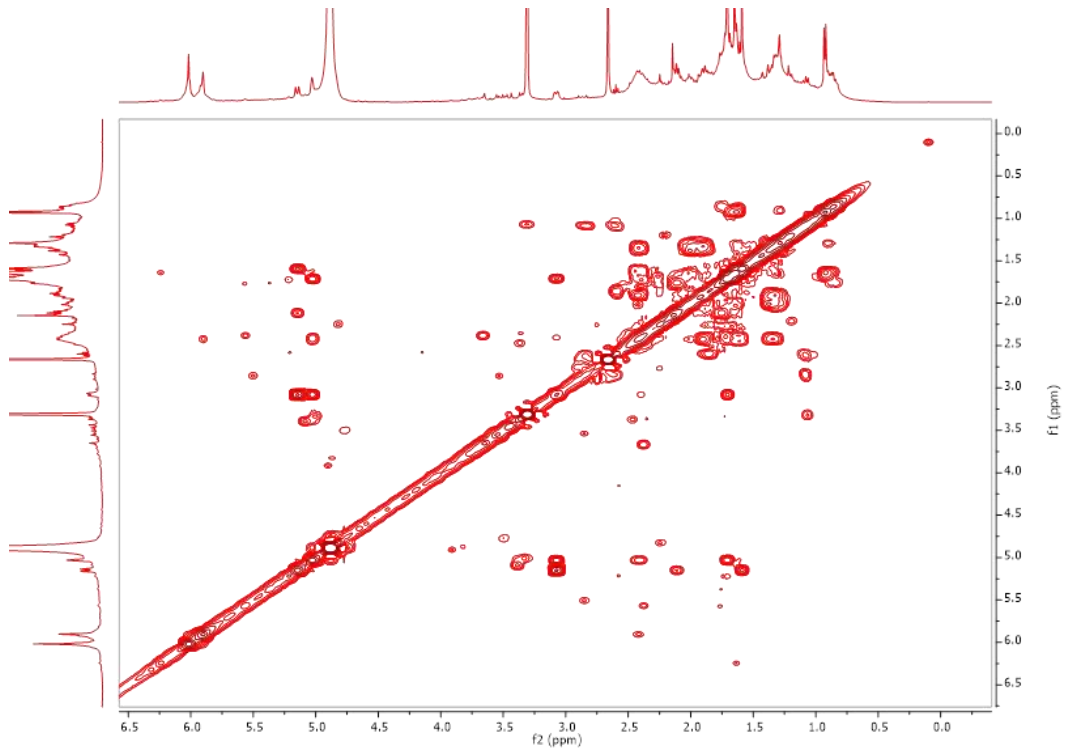


Anhang 37 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) von Irchinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH- d_4 vor den weiteren 2D NMR Experimenten.

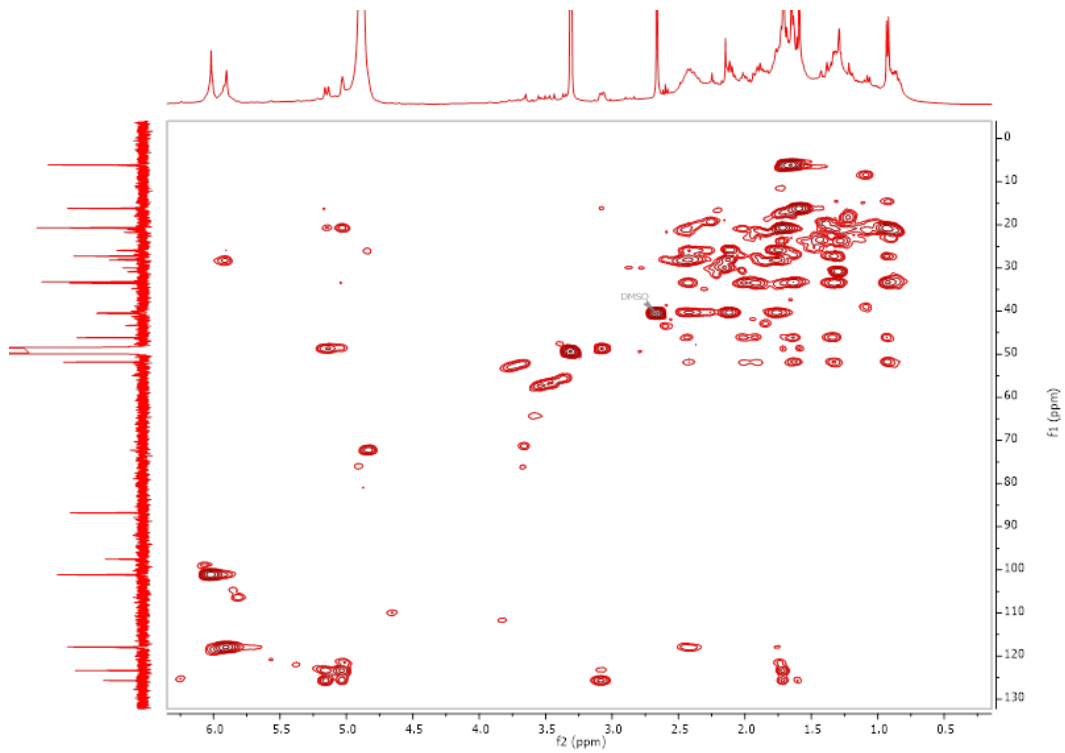


Anhang 38 ^1H - ^{13}C multiplicity edited HSQC NMR Spektrum (400 MHz) Irchinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH- d_4 .

Anhang

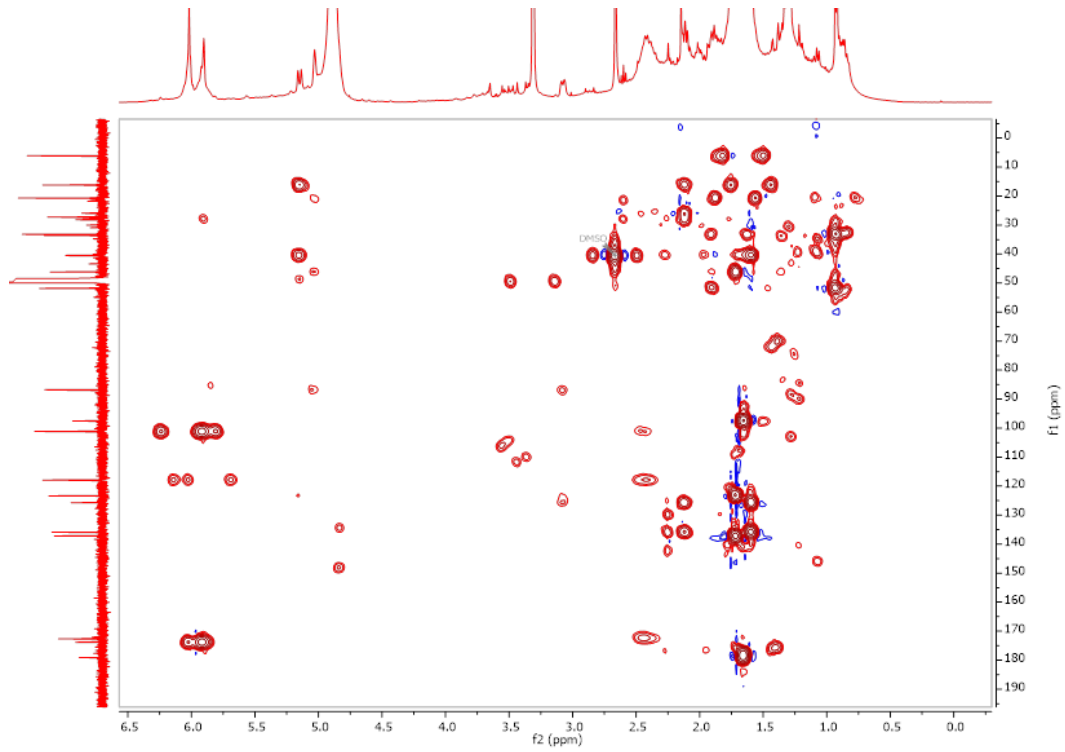


Anhang 39 ^1H - ^1H COSY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH- d_4 .

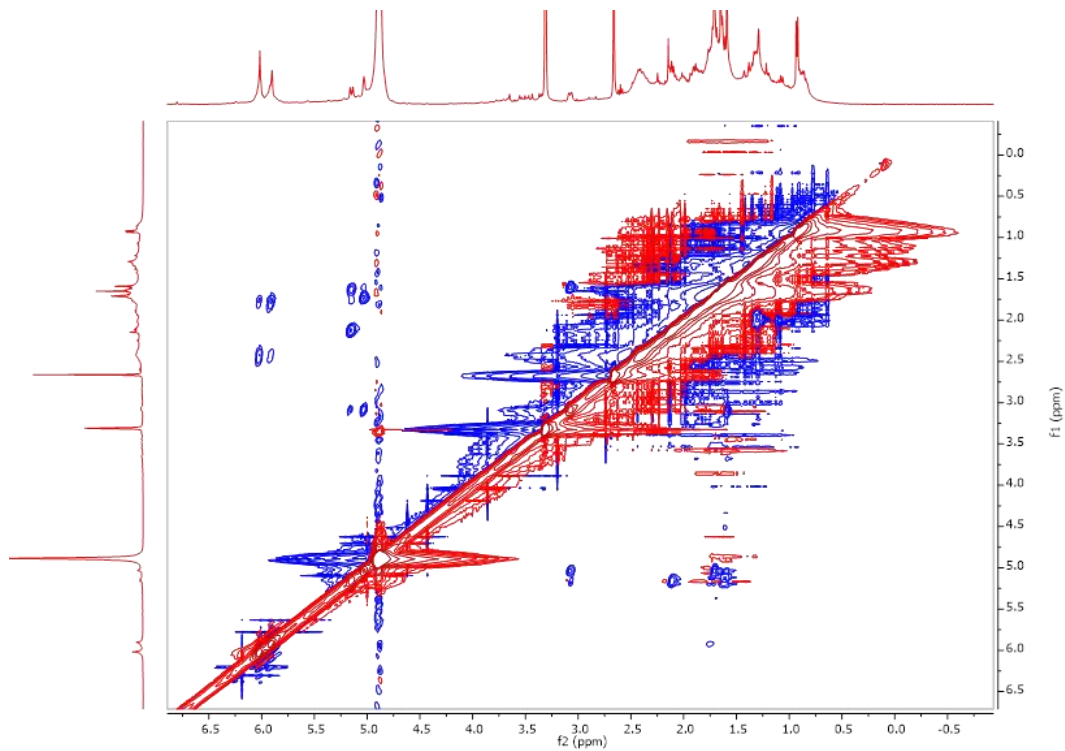


Anhang 40 ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR Spektrum (400 MHz) Ircinianin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH- d_4 .

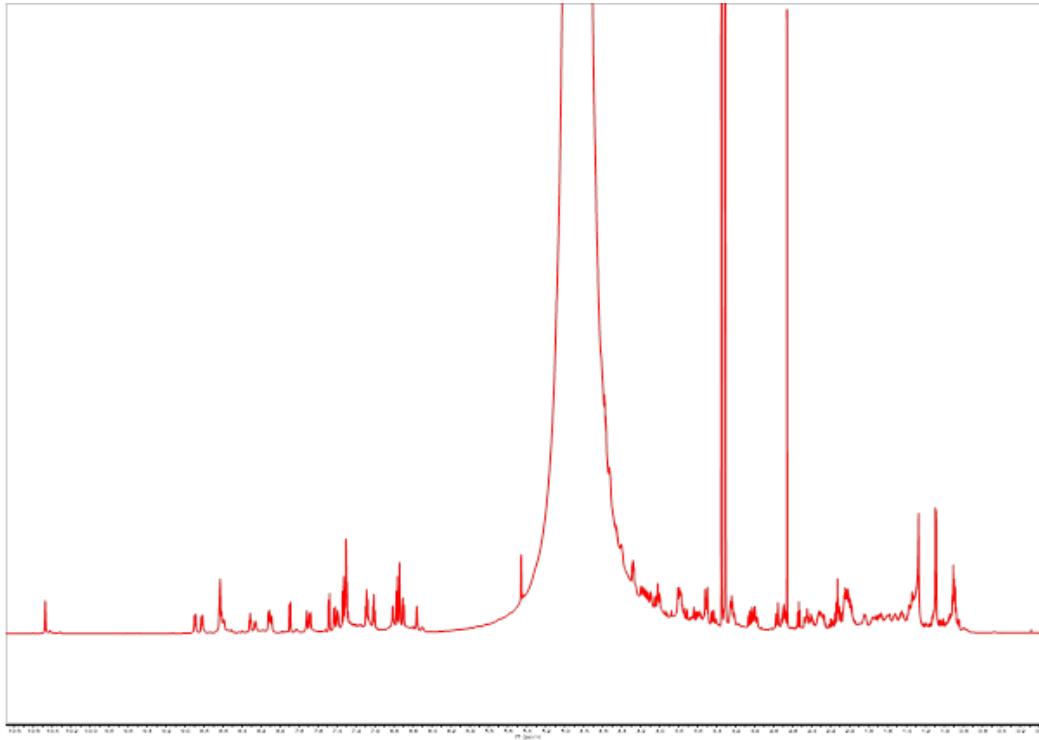
Anhang



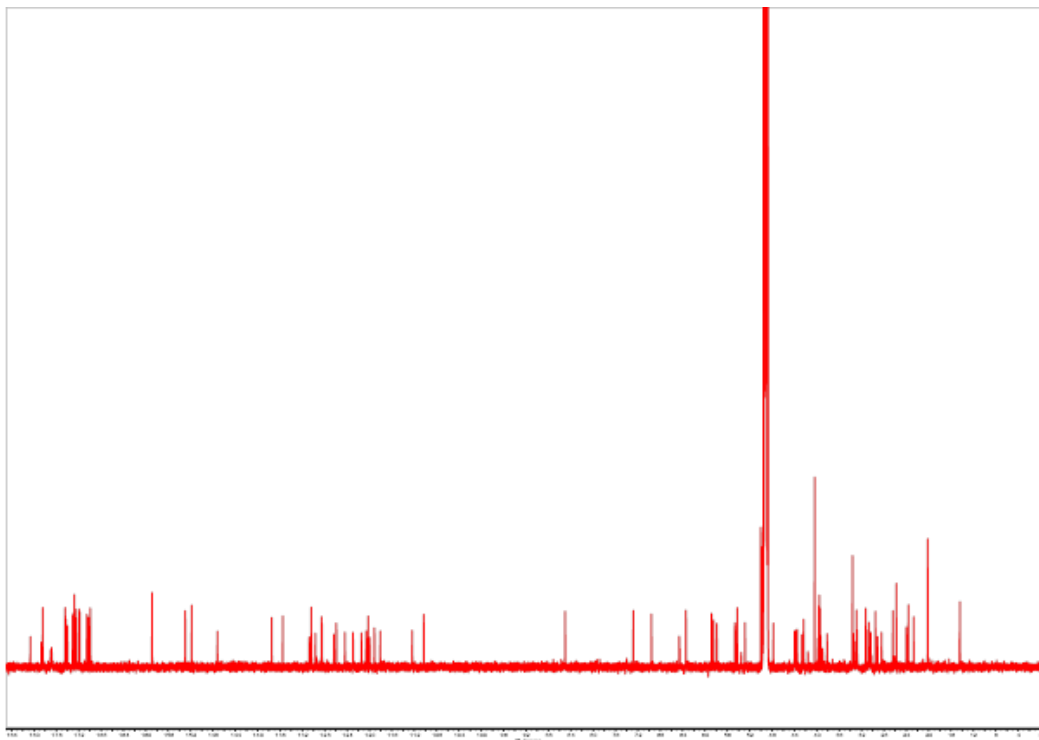
Anhang 41 ^1H - ^{13}C HMBC NMR Spektrum (400 MHz) Irceanin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .



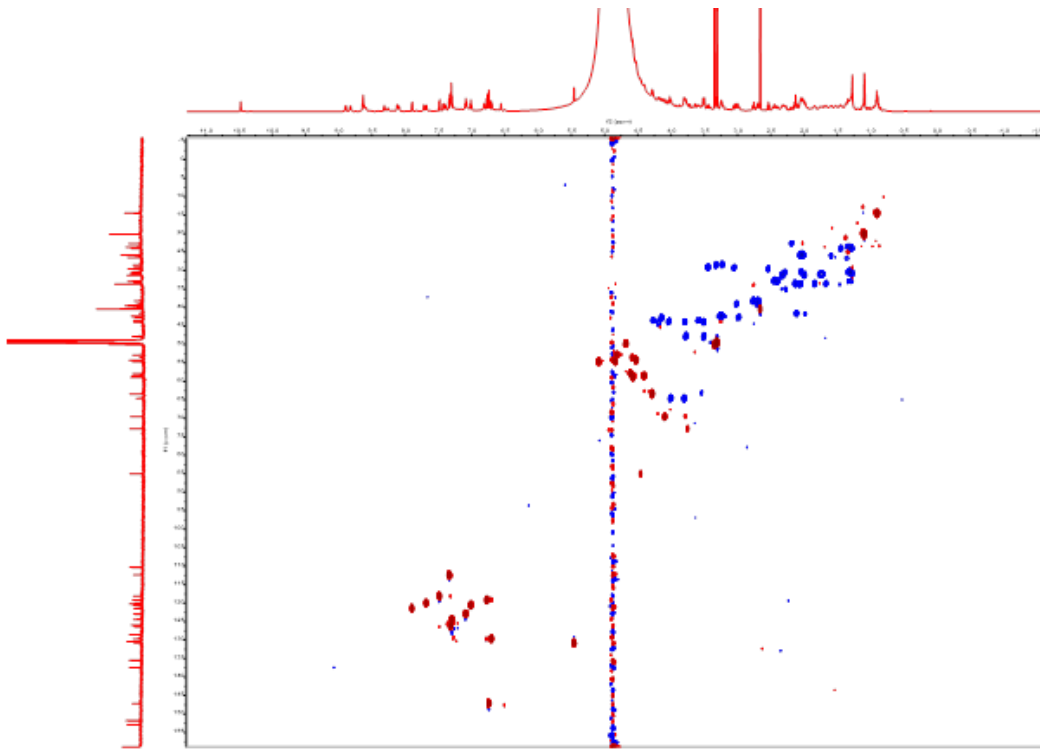
Anhang 42 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (400 MHz) Irceanin Lacton C (100%-Fraktion) in MeOH-d_4 .



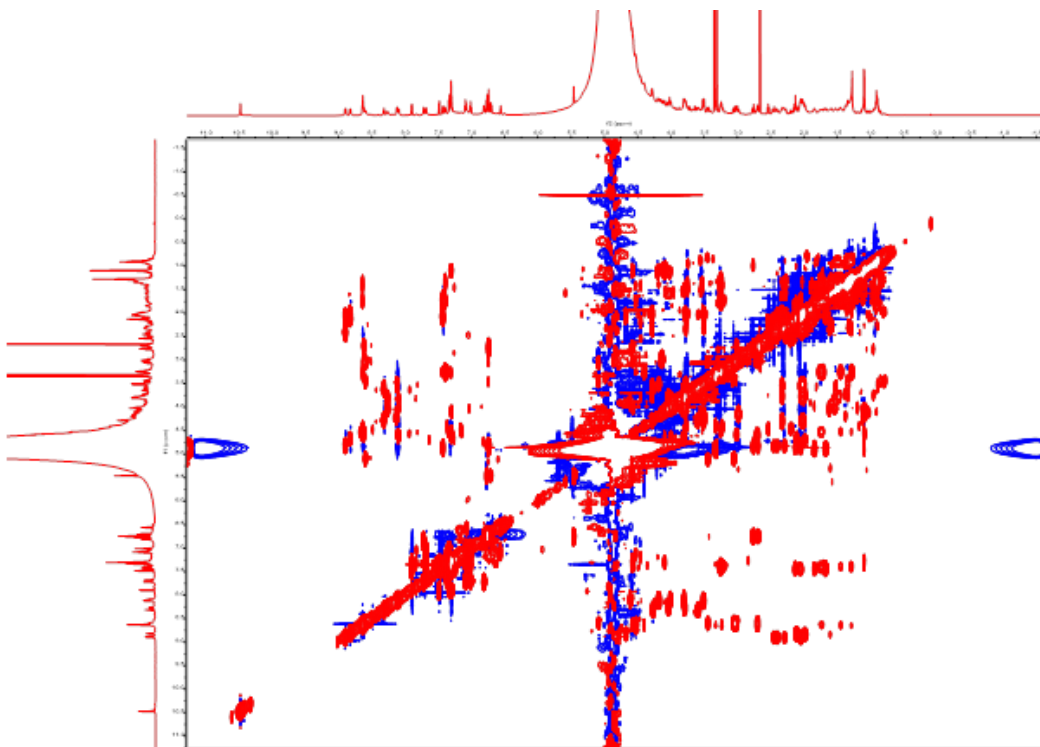
Anhang 43 ^1H NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



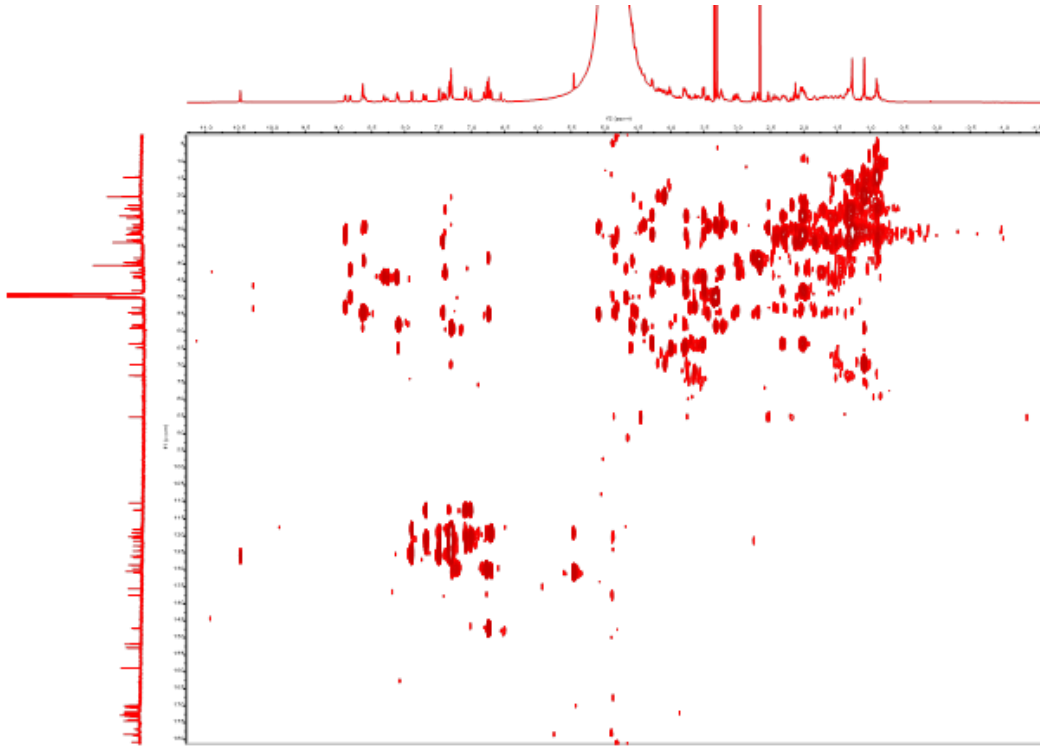
Anhang 44 ^{13}C NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



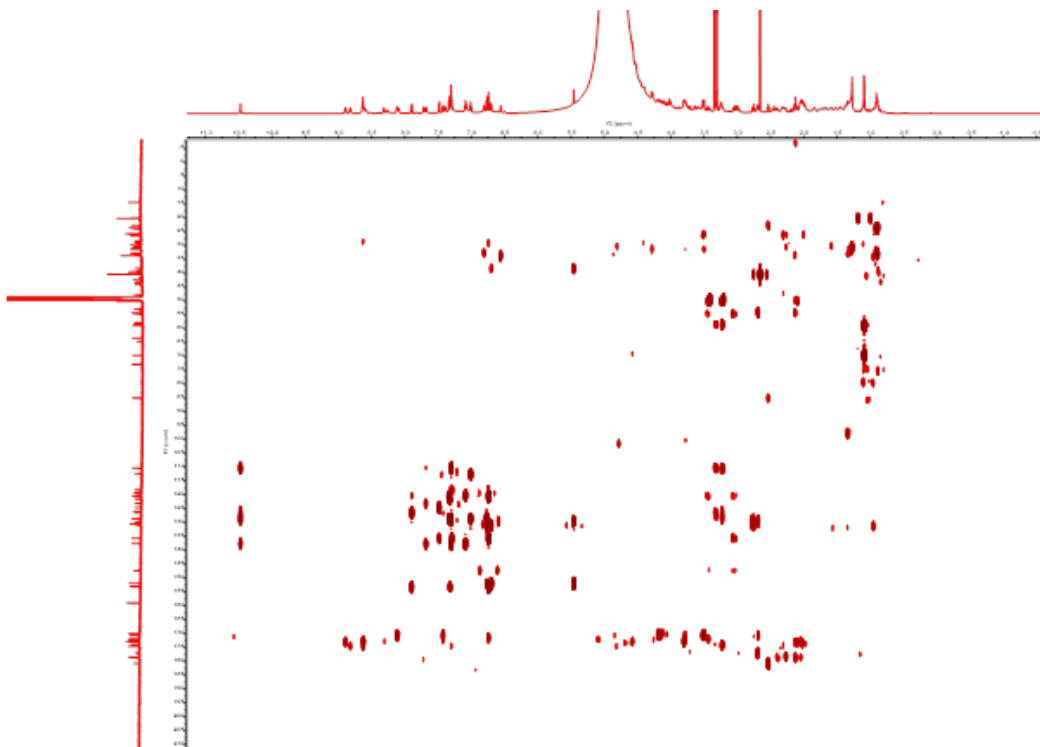
Anhang 45 ¹H-¹³C multiplicity edited HSQC NMR-Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d₃/ Wasser (96:4).



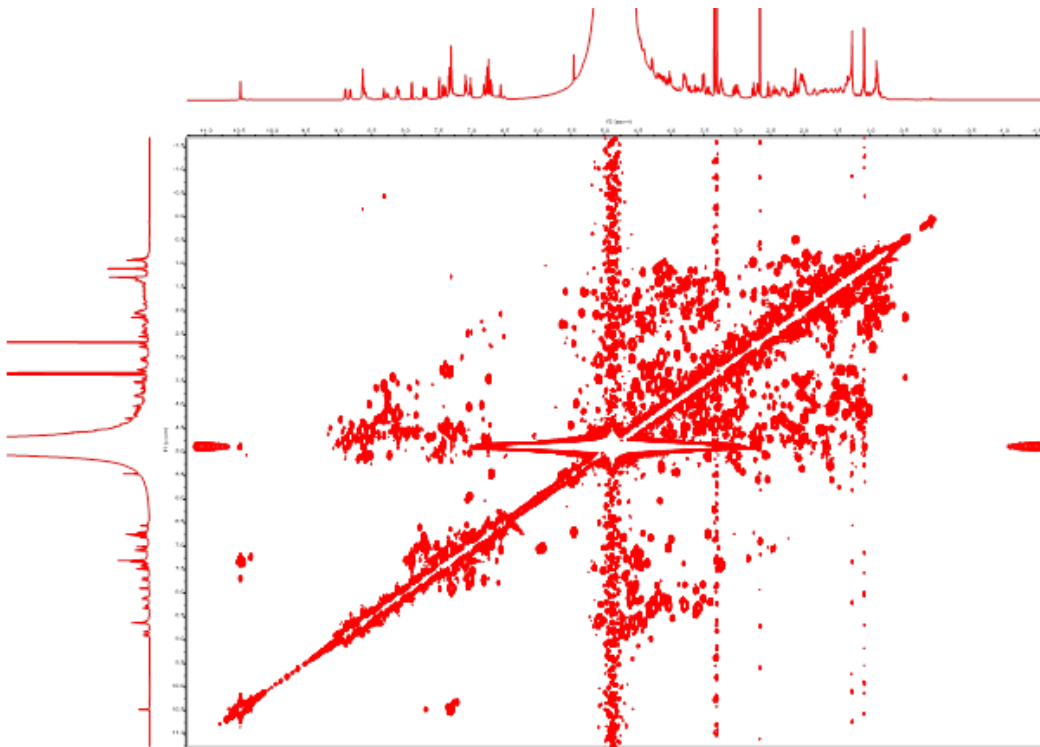
Anhang 46 ¹H-¹H TOCSY NMR-Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d₃/ Wasser (96:4).



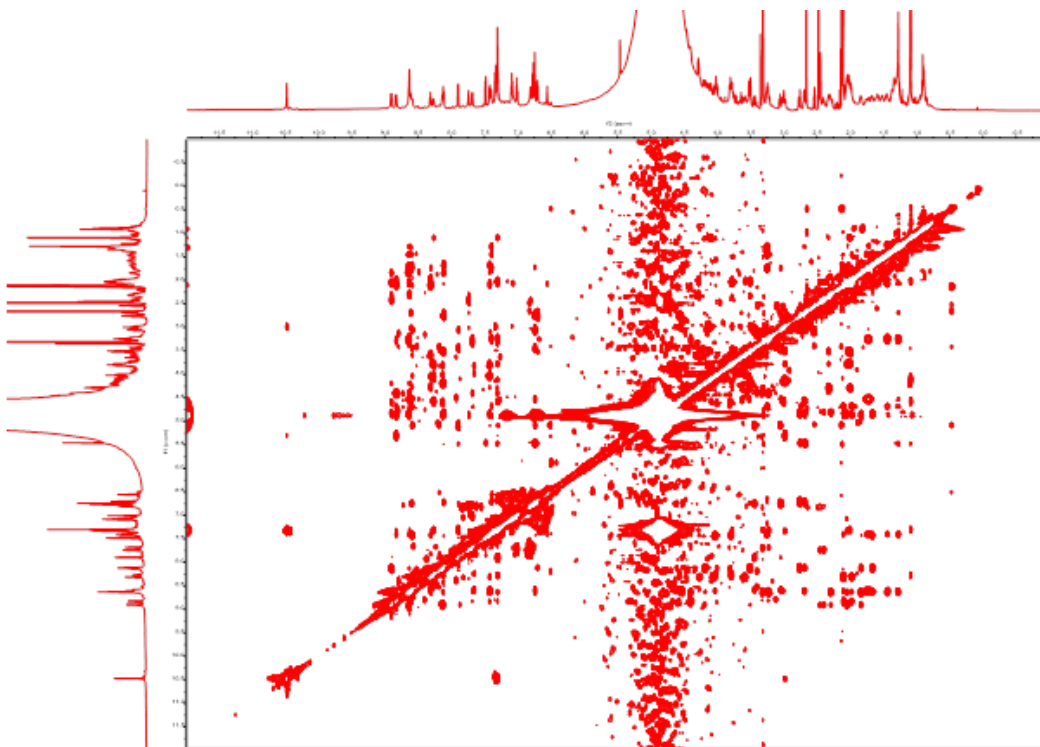
Anhang 47 ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR-Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



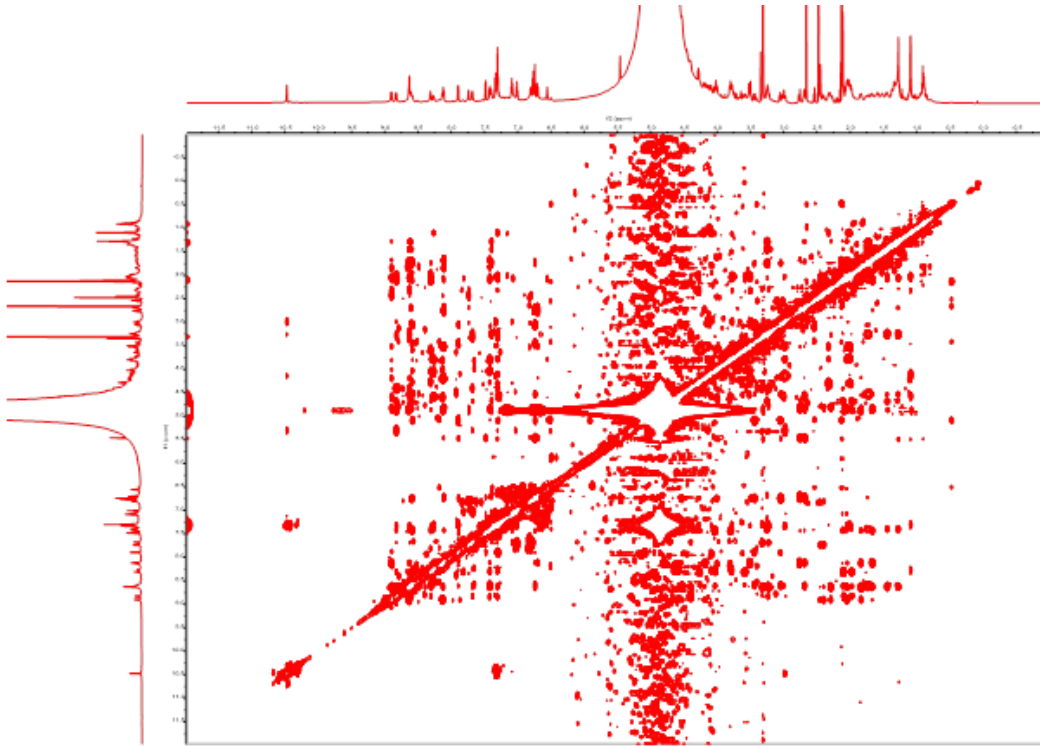
Anhang 48 ^1H - ^{13}C HMBC NMR-Spektrum – Fullset (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



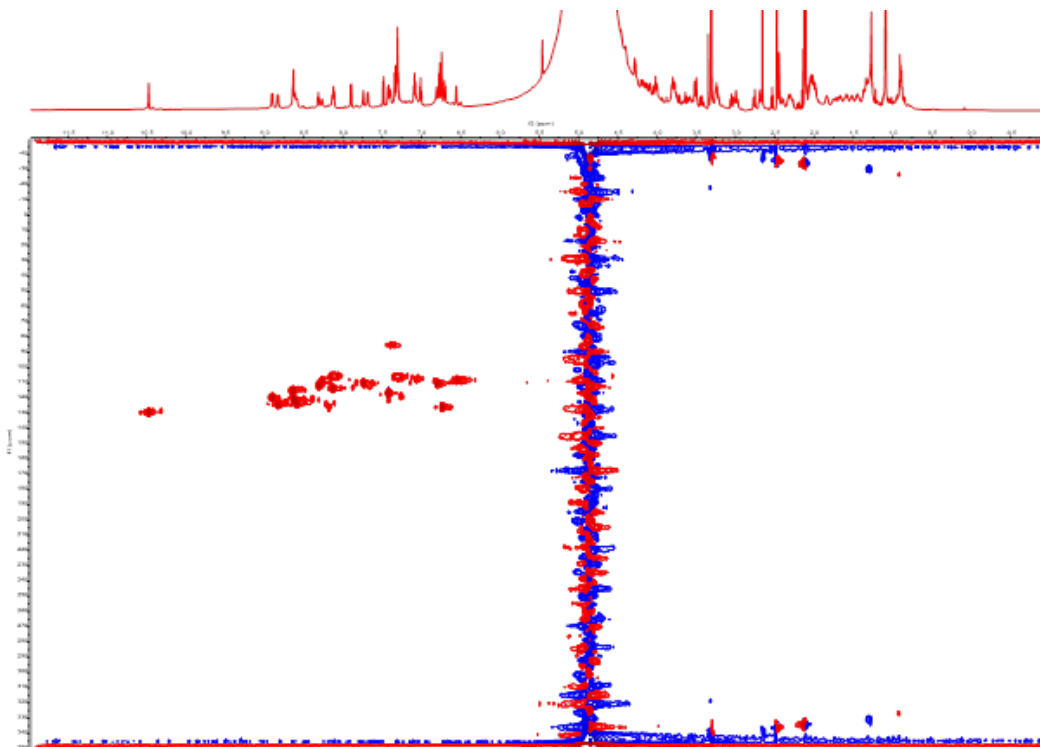
Anhang 49 ¹H-¹H COSY NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d₃/ Wasser (96:4).



Anhang 50 ¹H-¹H NOESY NMR Spektrum (700 MHz, 300 ms) Nocapeptin A in MeOH-d₃/ Wasser (96:4).

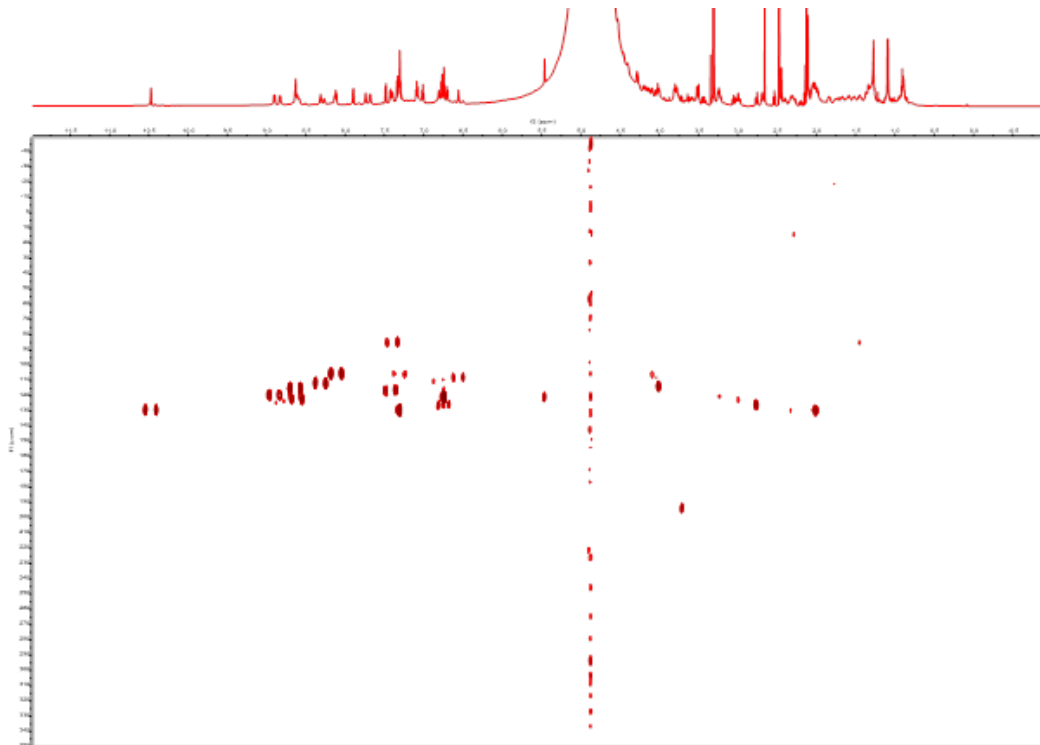


Anhang 51 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (700 MHz, 500 ms) Nocapeptin A in MeOH- d_3 / Wasser (96:4).

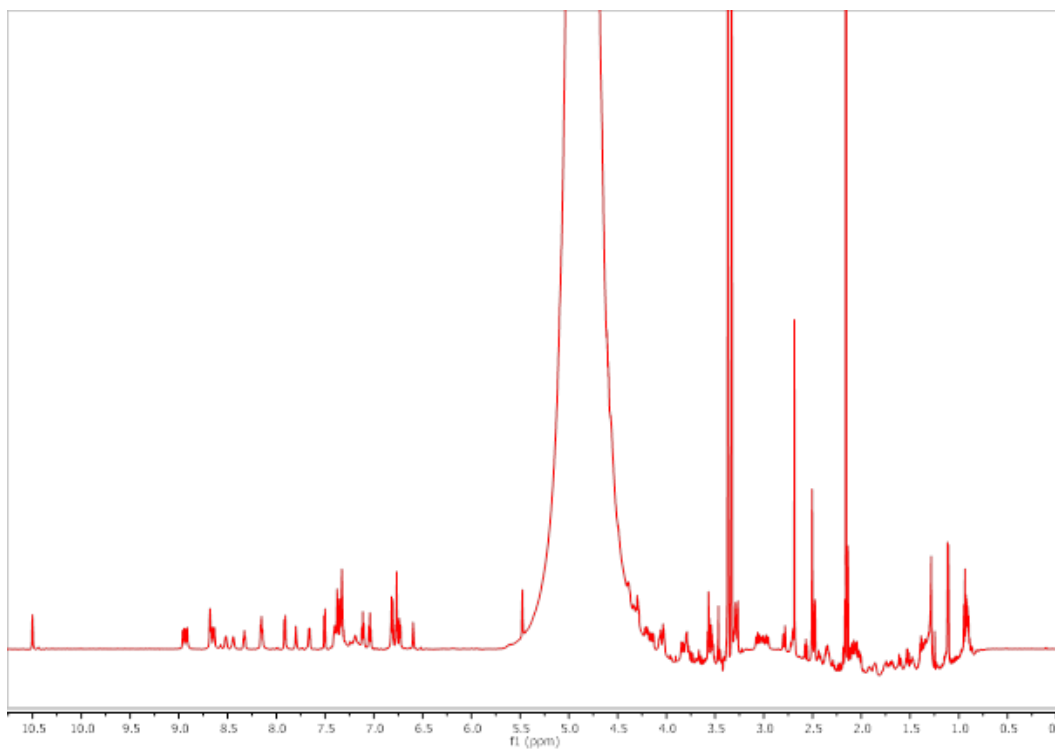


Anhang 52 ^1H - ^{15}N HSQC NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH- d_3 / Wasser (96:4).

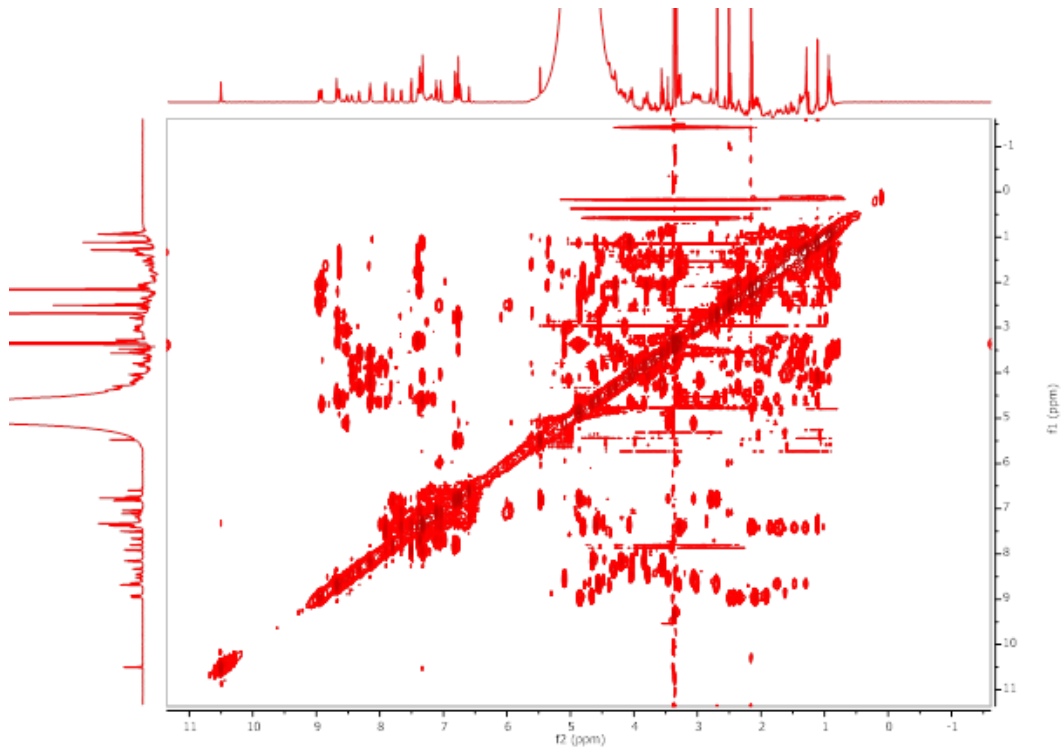
Anhang



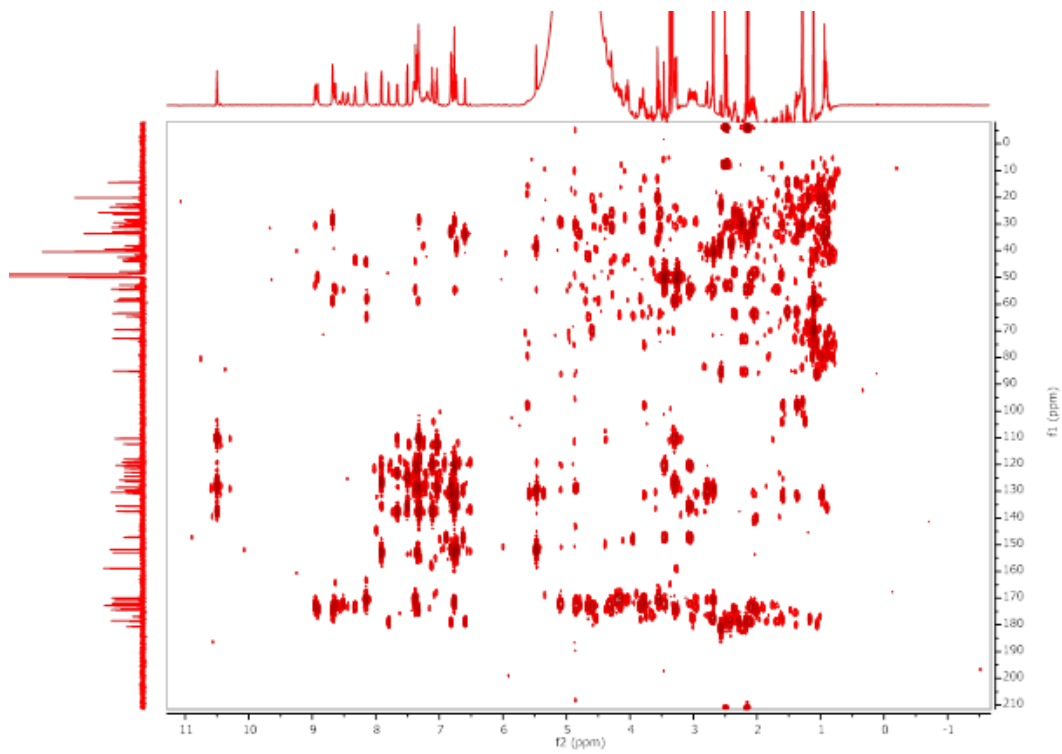
Anhang 53 ^1H - ^{15}N HMBC NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 /Wasser (96:4).



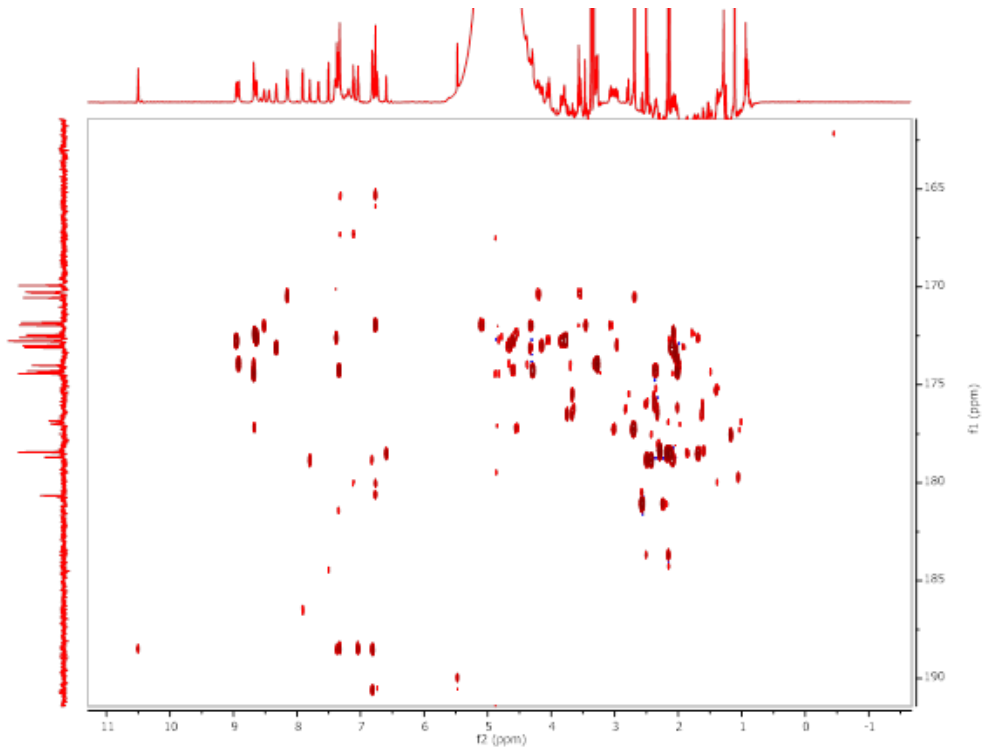
Anhang 54 ^1H NMR Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 /Wasser (96:4); konzentriertere Probe vor weiteren Messungen.



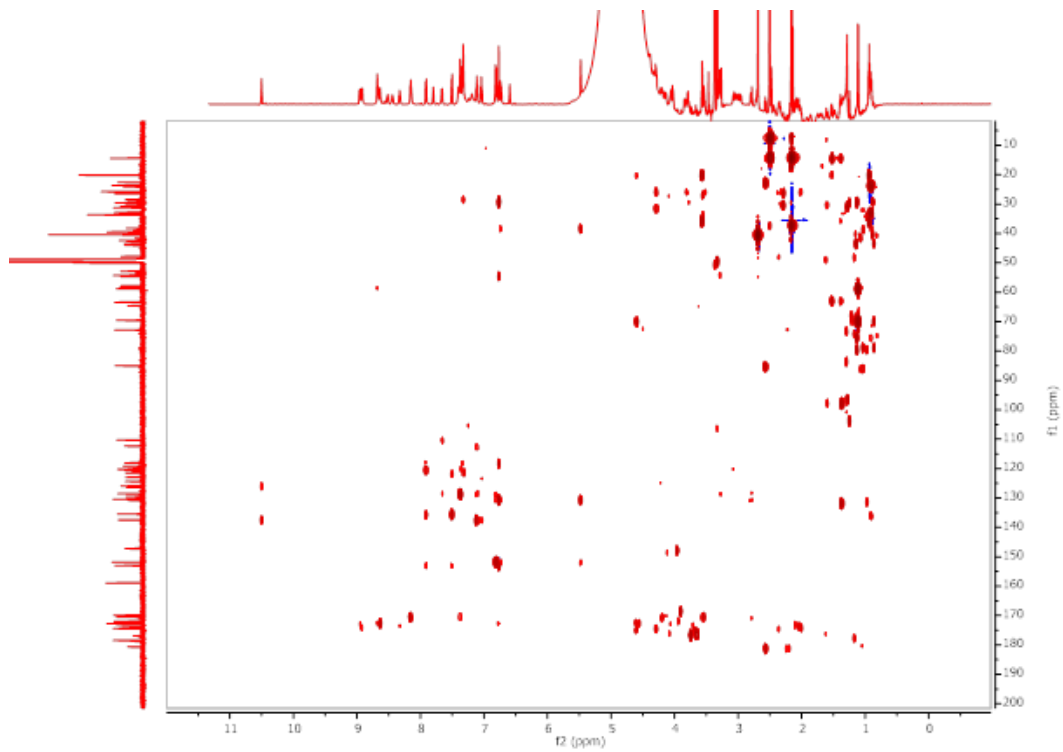
Anhang 55 ^1H - ^1H TOCSY NMR-Spektrum mit water suppression (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



Anhang 56 ^1H - ^{13}C HMBSC NMR-Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

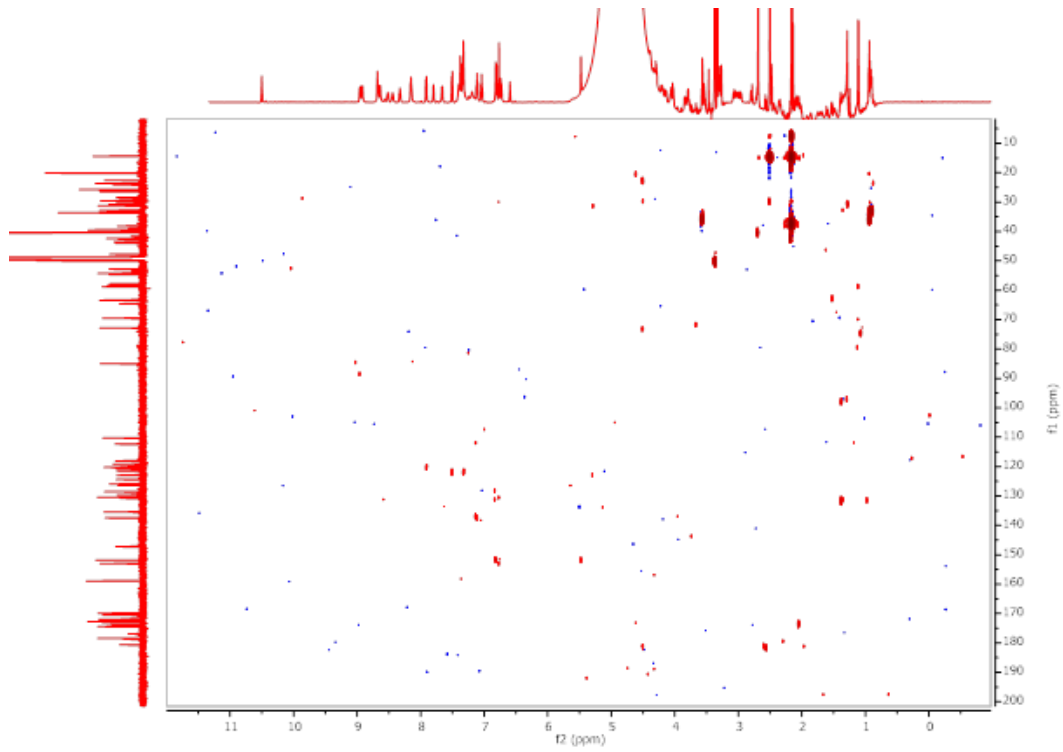


Anhang 57 Band-selective ^1H - ^{13}C HMBC NMR-Spektrum (700 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

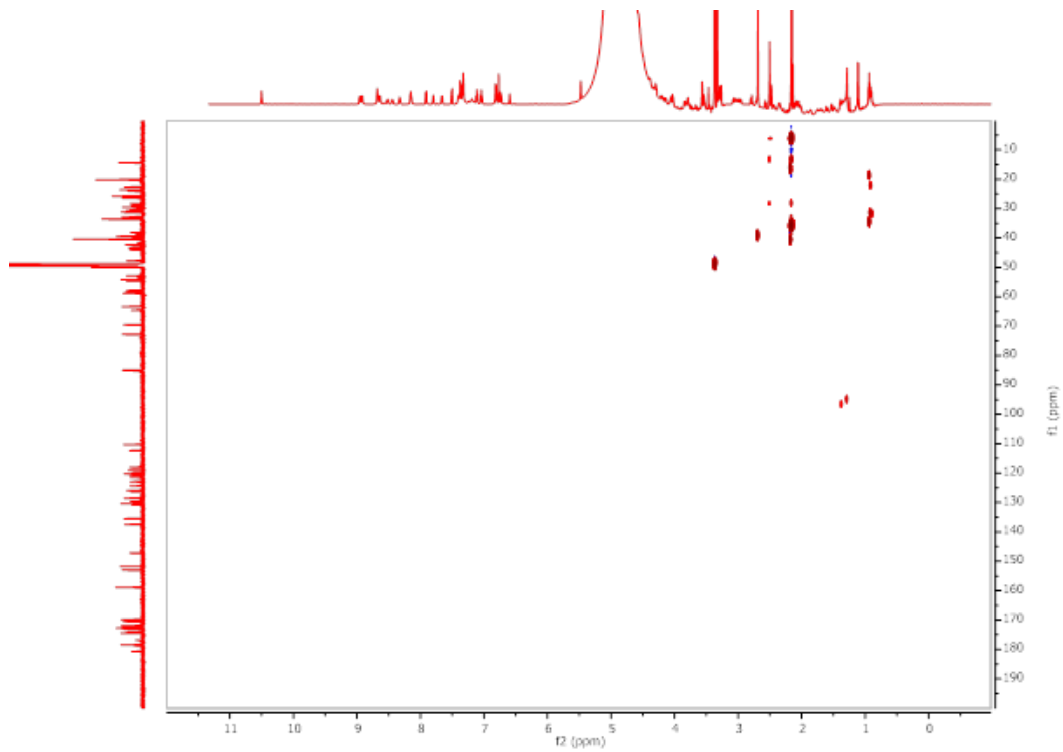


Anhang 58 ^1H - ^{13}C LR-HSQMBC NMR Spektrum (700 MHz, 4 Hz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

Anhang

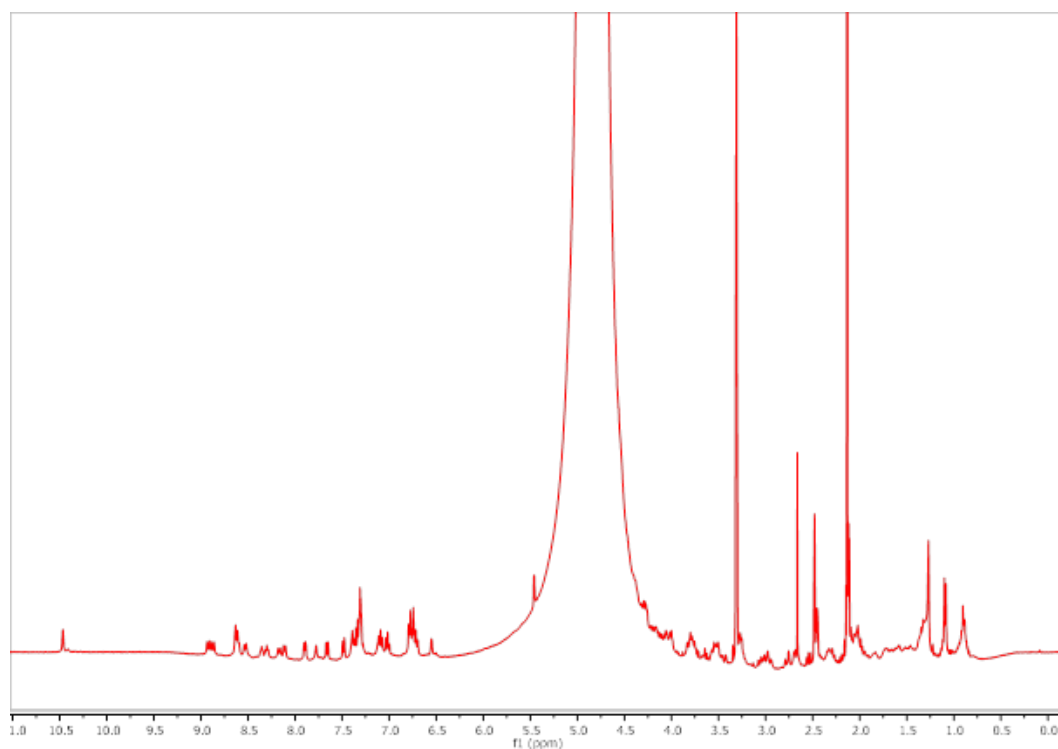


Anhang 59 ^1H - ^{13}C LR-HSQC NMR Spektrum (700 MHz, 2 Hz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

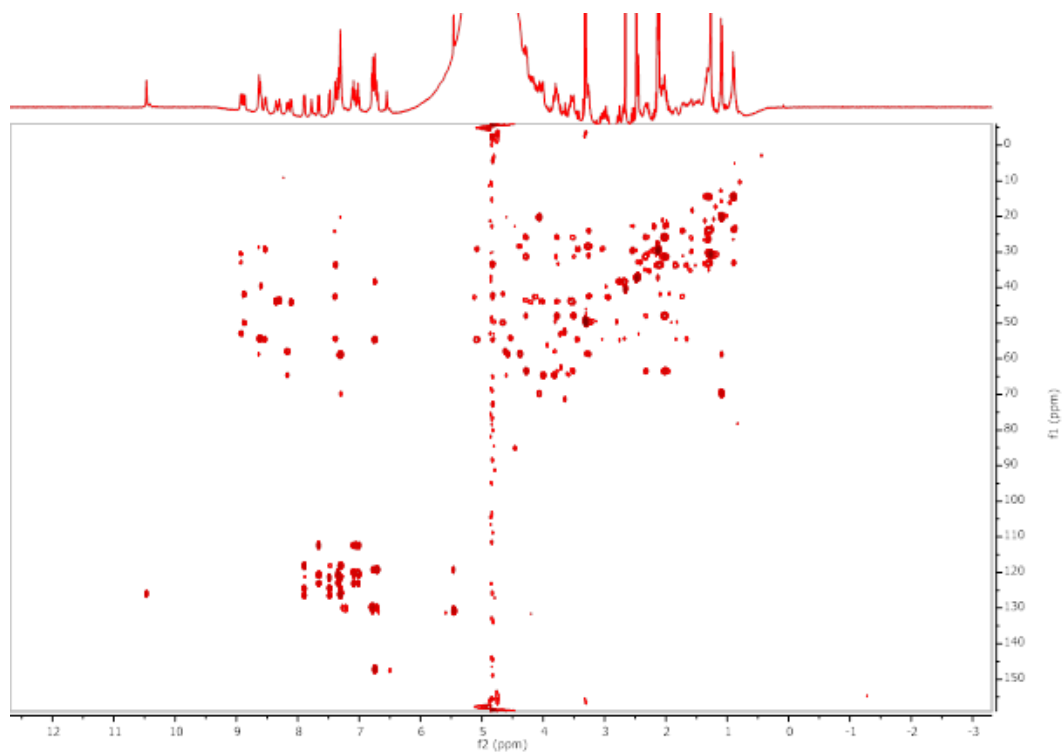


Anhang 60 ^1H - ^{13}C LR-HSQC NMR Spektrum (700 MHz, 1 Hz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

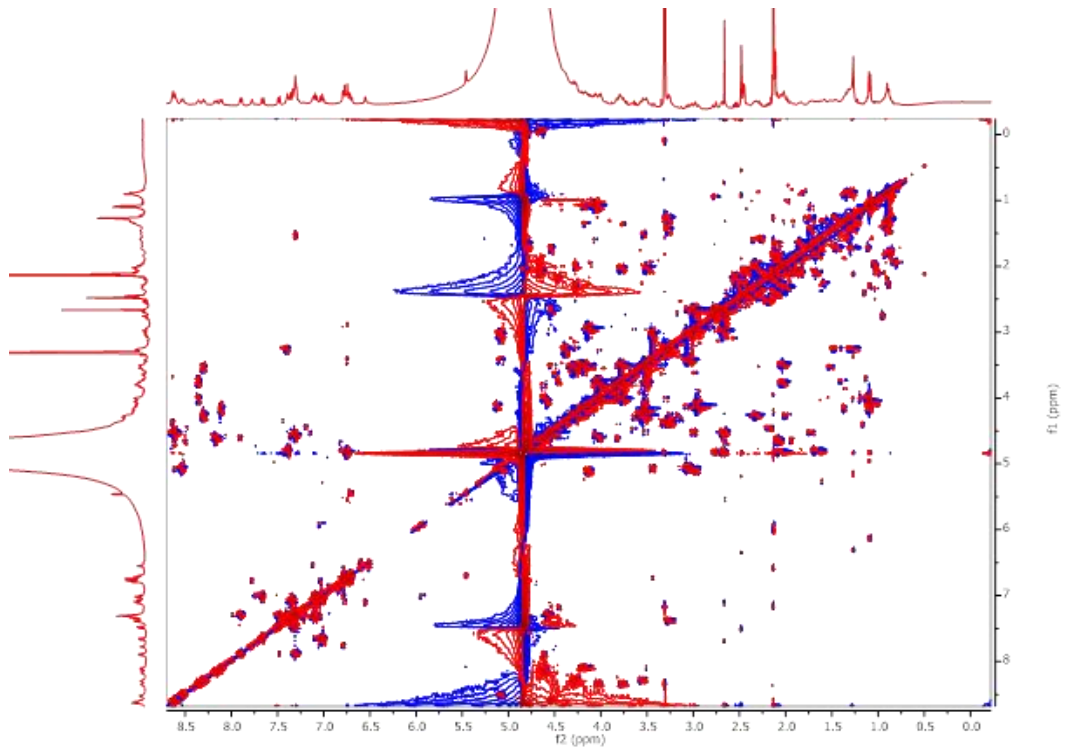
Anhang



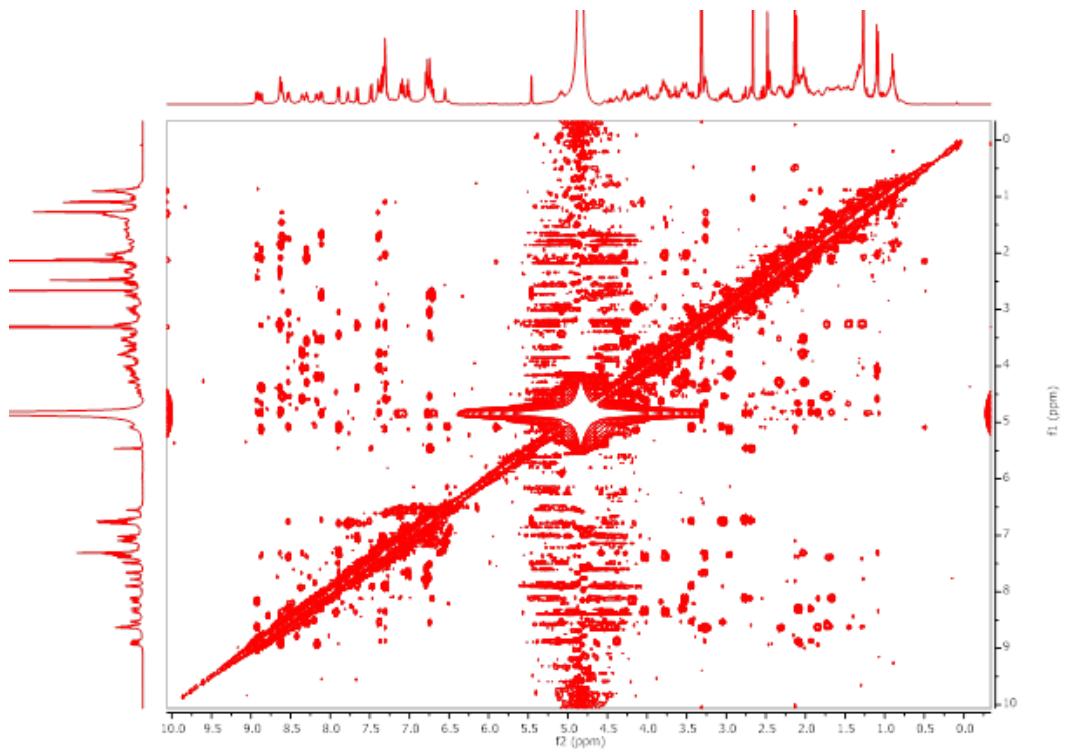
Anhang 61 ^1H NMR Spektrum (400 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4). Zur Bestimmung von Glycin 9 NH.



Anhang 62 ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR Spektrum (400 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

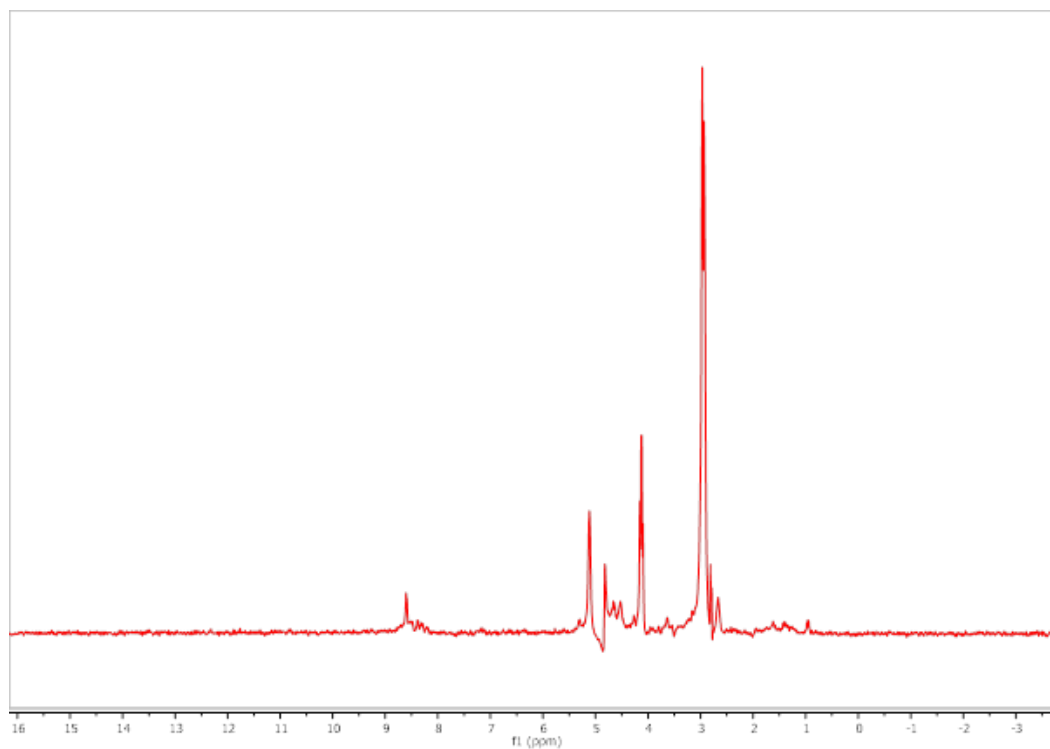


Anhang 63 ^1H - ^1H DQF COSY NMR Spektrum (400 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).



Anhang 64 ^1H - ^1H NOESY NMR Spektrum (400 MHz) Nocapeptin A in MeOH-d_3 / Wasser (96:4).

Anhang



Anhang 65 Selective gradient 1D TOCSY NMR Spektrum (400 MHz) Nocapeptin A MeOH-d₃/ Wasser (96:4).



IUCr Journals

Terms and conditions of use of the article titled

(2*S*,3'*S*,3*a*'*R*,5'*R*,7*a*'*R*)-5'-[(*E*)-5-(Furan-3-yl)-2-methylpent-1-en-1-yl]-3-hydroxy-3',4,7'-trimethyl-1',2',3',3*a*',5',7*a*'-hexahydro-5*H*-spiro[furan-2,4'-inden]-5-one

[Majer *et al.* (2020). *IUCrData*, **5**, x201578
<https://doi.org/10.1107/S2414314620015783>]

Permission to reproduce or reuse in whole or part the above article is granted to

Thomas Majer

provided that the reused material is accompanied by an attribution statement according the terms of the open-access licence under which the original article was published, and that permission has been obtained from any other organizations or individuals where any parts of the material are subject to explicit statements of copyright or prior reproduction permission from such third parties.



Peter Strickland
Executive Managing Editor, IUCr Journals

11. Literatur

1. Cragg, G. M.; Newman, D. J., Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology* **2001**, 39 (sup1), 8-17.
2. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *Journal of Natural Products* **2004**, 67 (8), 1216-1238.
3. Carté, B. K., Biomedical Potential of Marine Natural Products. *BioScience* **1996**, 46 (4), 271-286.
4. John Faulkner, D., Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Natural Product Reports* **2000**, 17 (1), 1-6.
5. Proksch, P.; Edrada, R.; Ebel, R., Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, 59 (2), 125-134.
6. Gerwick, W. H.; Moore, B. S., Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & Biology* **2012**, 19 (1), 85-98.
7. Fenical, W., Marine microbial natural products: the evolution of a new field of science. *The Journal of Antibiotics* **2020**, 73 (8), 481-487.
8. Fenical, W.; Jensen, P. R., Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2 (12), 666-673.
9. Skropeta, D.; Wei, L., Recent advances in deep-sea natural products. *Natural Product Reports* **2014**, 31 (8), 999-1025.
10. Pilkington, L. I., A Chemometric Analysis of Deep-Sea Natural Products. *Molecules* **2019**, 24 (21), 3942.
11. Thornburg, C. C.; Zabriskie, T. M.; McPhail, K. L., Deep-Sea Hydrothermal Vents: Potential Hot Spots for Natural Products Discovery? *Journal of Natural Products* **2010**, 73 (3), 489-499.
12. Jimeno, J.; Faircloth, G.; Sousa-Faro, J. F.; Scheuer, P.; Rinehart, K., New Marine Derived Anticancer Therapeutics – A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Marine Drugs* **2004**, 2 (1), 14-29.
13. Gray, J. S., Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity & Conservation* **1997**, 6 (1), 153-175.
14. Sankaran, A. V., Discovery of life in greater than 2.6 billion-year-old terre trial samples. *Current Science* **2001**, 80 (4), 489-491.
15. Snelgrove, P. V., An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life. *Planta Med* **2016**, 82 (9-10), 790-9.
16. Li, C.-W.; Chen, J.-Y.; Hua, T.-E., Precambrian Sponges with Cellular Structures. *Science* **1998**, 279 (5352), 879-882.
17. Wood, R., Reef-Building Sponges. *American Scientist* **1990**, 78 (3), 224-235.
18. Hooper, J. N., *Spongicide: guide to sponge collection and identification*. Queensland museum: 2000.
19. Mehbub, M. F.; Lei, J.; Franco, C.; Zhang, W., Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Marine Drugs* **2014**, 12 (8), 4539-4577.
20. Deshpande, A.; Thakur, N., Chemical Ecology Driven Bioprospecting of Marine Sponges. In *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 2020; pp 681-692.
21. Burns, E.; Ilan, M., Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. II. Physical defense. *Marine Ecology Progress Series* **2003**, 252, 115-123.
22. Faulkner, D. J., Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, 77 (2), 135-145.
23. Proksch, P., Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* **1994**, 32 (6), 639-655.
24. Pawlik, J. R., Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews* **1993**, 93 (5), 1911-1922.
25. Quévrain, E.; Domart-Coulon, I.; Bourguet-Kondracki, M.-L., Marine Natural Products – Chemical Defense/Chemical Communication in Sponges and Corals. In *Natural Products*, 2014; pp 39-66.
26. Capon, R. J., Marine Natural Products Chemistry: Past, Present, and Future. *Australian Journal of Chemistry* **2010**, 63 (6), 851-854.
27. Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U., A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* **2012**, 2 (2), 303-336.
28. Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck, P. R.; Rahman, S. K., Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *Journal of Natural Products* **1989**, 52 (6), 1189-1208.
29. Piel, J., Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports* **2004**, 21 (4), 519-538.
30. König, G. M.; Kehraus, S.; Seibert, S. F.; Abdel-Lateff, A.; Müller, D., Natural Products from Marine Organisms and Their Associated Microbes. *ChemBioChem* **2006**, 7 (2), 229-238.

31. Taylor, M. W.; Hill, R. T.; Hentschel, U., Meeting Report: 1st International Symposium on Sponge Microbiology. *Marine Biotechnology* **2011**, *13* (6), 1057-1061.
32. Loureiro, C.; Galani, A.; Gavriilidou, A.; Mares, M. C. d.; Oost, J. v. d.; Medema, M. H.; Sipkema, D., Comparative Metagenomic Analysis of Biosynthetic Diversity across Sponge Microbiomes Highlights Metabolic Novelty, Conservation, and Diversification. *mSystems* **2022**, *7* (4), e00357-22.
33. Proksch, P.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R., Drugs from the Sea - Opportunities and Obstacles. *Marine Drugs* **2003**, *1* (1), 5-17.
34. Hentschel, U.; Usher, K. M.; Taylor, M. W., Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology* **2006**, *55* (2), 167-177.
35. Proksch, P.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R., Apotheke am Meeresgrund: Bioaktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen. *Biologie in unserer Zeit* **2006**, *36* (3), 150-159.
36. Wehrl, M.; Steinert, M.; Hentschel, U., Bacterial Uptake by the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial Ecology* **2007**, *53* (2), 355-365.
37. Carrier, T. J.; Maldonado, M.; Schmittmann, L.; Pita, L.; Bosch, T. C. G.; Hentschel, U., Symbiont transmission in marine sponges: reproduction, development, and metamorphosis. *BMC Biology* **2022**, *20* (1), 100.
38. Taylor, M. W.; Radax, R.; Steger, D.; Wagner, M., Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2007**, *71* (2), 295-347.
39. Webster, N. S.; Thomas, T., The Sponge Hologenome. *mBio* **2016**, *7* (2), 10.1128/mbio.00135-16.
40. Lee, Y. K.; Lee, J.-H.; Lee, H. K., Microbial symbiosis in marine sponges. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-* **2001**, *39* (4), 254-264.
41. Pita, L.; Rix, L.; Slaby, B. M.; Franke, A.; Hentschel, U., The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* **2018**, *6* (1), 46.
42. Aguila-Ramírez, R. N.; Hernández-Guerrero, C. J.; González-Acosta, B.; Id-Daoud, G.; Hewitt, S.; Pope, J.; Hellio, C., Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina gerardogreeni*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2014**, *90*, 64-70.
43. Selvin, J.; Ninawe, A. S.; Seghal Kiran, G.; Lipton, A. P., Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues. *Critical Reviews in Microbiology* **2010**, *36* (1), 82-90.
44. Zhang, S.; Song, W.; Nothias, L.-F.; Couvillion, S. P.; Webster, N.; Thomas, T., Comparative metabolomic analysis reveals shared and unique chemical interactions in sponge holobionts. *Microbiome* **2022**, *10* (1), 22.
45. Blunt, J. W.; Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Natural Product Reports* **2018**, *35* (1), 8-53.
46. Muigg, P.; Rosén, J.; Bohlin, L.; Backlund, A., In silico comparison of marine, terrestrial and synthetic compounds using ChemGPS-NP for navigating chemical space. *Phytochemistry Reviews* **2013**, *12* (3), 449-457.
47. Shang, J.; Hu, B.; Wang, J.; Zhu, F.; Kang, Y.; Li, D.; Sun, H.; Kong, D.-X.; Hou, T., Cheminformatic Insight into the Differences between Terrestrial and Marine Originated Natural Products. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2018**, *58* (6), 1182-1193.
48. Kong, D.-X.; Jiang, Y.-Y.; Zhang, H.-Y., Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. *Drug Discovery Today* **2010**, *15* (21), 884-886.
49. Costantino, V.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Tagliatela-Scafati, O., Chemical Diversity of Bioactive Marine Natural Products: An Illustrative Case Study. *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11* (13), 1671-1692.
50. Montaser, R.; Luesch, H., Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3* (12), 1475-1489.
51. Haefner, B., Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* **2003**, *8* (12), 536-544.
52. Leão, P. N.; Pereira, A. R.; Liu, W.-T.; Ng, J.; Pevzner, P. A.; Dorrestein, P. C.; König, G. M.; Vasconcelos, V. M.; Gerwick, W. H., Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (25), 11183-11188.
53. Wang, H.; Zhang, R.; Ma, B.; Wang, W.; Yu, C.; Han, J.; Zhu, L.; Zhang, X.; Dai, H.; Liu, H.; Chen, B., Japonamides A and B, Two New Cyclohexadepsipeptides from the Marine-Sponge-Derived Fungus *Aspergillus japonicus* and Their Synergistic Antifungal Activities. *Journal of Fungi* **2022**, *8* (10), 1058.
54. König, G. M.; Wright, A. D., Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Med* **1996**, *62* (3), 193-211.

55. Noyer, C.; Thomas, O. P.; Becerro, M. A., Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge *Spongia lamella*. *PLOS ONE* **2011**, *6* (6), e20844.
56. Mora, C.; Tittensor, D. P.; Adl, S.; Simpson, A. G. B.; Worm, B., How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology* **2011**, *9* (8), e1001127.
57. Sigwart, J. D.; Blasiak, R.; Jaspars, M.; Jouffray, J.-B.; Tasdemir, D., Unlocking the potential of marine biodiscovery. *Natural Product Reports* **2021**, *38* (7), 1235-1242.
58. Haque, N.; Parveen, S.; Tang, T.; Wei, J.; Huang, Z., Marine Natural Products in Clinical Use. *Marine Drugs* **2022**, *20* (8), 528.
59. <https://www.marinepharmacology.org/approved>. **abgerufen am 10.06.2023**.
60. Ramanjooloo, A.; Andersen, R. J.; Bhaw-Luximon, A., Marine sponge-derived/inspired drugs and their applications in drug delivery systems. *Future Medicinal Chemistry* **2021**, *13* (5), 487-504.
61. Atadja, P.; Perez, L., Discovery and Development of Farydak (NVP-LBH589, Panobinostat) as an Anticancer Drug. In *Successful Drug Discovery*, 2016; pp 59-88.
62. Bauer, A., Story of Eribulin Mesylate: Development of the Longest Drug Synthesis. In *Synthesis of Heterocycles in Contemporary Medicinal Chemistry*, Časar, Z., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 209-270.
63. Nicolaou, K. C.; Pan, S.; Shelke, Y.; Das, D.; Ye, Q.; Lu, Y.; Sau, S.; Bao, R.; Rigol, S., A Reverse Approach to the Total Synthesis of Halichondrin B. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143* (24), 9267-9276.
64. Altmann, K.-H., Drugs from the Oceans: Marine Natural Products as Leads for Drug Discovery. *CHIMIA* **2017**, *71* (10), 646.
65. Bergmann, W.; Feeney, R. J., THE ISOLATION OF A NEW THYMINE PENTOSIDE FROM SPONGES¹. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72* (6), 2809-2810.
66. Bergmann, W.; Feeney, R. J., CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I.¹. *The Journal of Organic Chemistry* **1951**, *16* (6), 981-987.
67. Bergmann, W.; Burke, D. C., CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXIX. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. III.¹ SPONGOTHYIMIDINE AND SPONGOURIDINE². *The Journal of Organic Chemistry* **1955**, *20* (11), 1501-1507.
68. de Voogd, N. J. A., B.; Boury-Esnault, N.; Carballo, J.L.; Cárdenas, P.; Díaz, M.-C.; Dohrmann, M.; Downey, R.; Goodwin, C.; Hajdu, E.; Hooper, J.N.A.; Kelly, M.; Klautau, M.; Lim, S.C.; Manconi, R.; Morrow, C.; Pinheiro, U.; Pisera, A.B.; Ríos, P.; Rützler, K.; Schönberg, C.; Vacelet, J.; van Soest, R.W.M.; Xavier, J., World Porifera Database. Accessed at <https://www.marinespecies.org/porifera> on 2023-03-16.
69. Suckling, C. J., Chemical approaches to the discovery of new drugs. *Science Progress (1933-)* **1991**, *75* (3/4 (298)), 323-359.
70. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M., The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* **2000**, *17* (3), 215-234.
71. Rangel, M.; Falkenberg, M., An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *J. Coast. Life Med* **2015**, *3* (6), 421-428.
72. Borchers, M., Mehr als bloß ein altes Zytostatikum in neuem Schlauch. *InFo Hämatologie + Onkologie* **2021**, *24* (6), 56-56.
73. Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E., The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **2010**, *31* (6), 255-265.
74. Abdelaleem, E. R.; Samy, M. N.; Desoukey, S. Y.; Liu, M.; Quinn, R. J.; Abdelmohsen, U. R., Marine natural products from sponges (Porifera) of the order Dictyoceratida (2013 to 2019); a promising source for drug discovery. *RSC Advances* **2020**, *10* (57), 34959-34976.
75. Mehubub, M. F.; Perkins, M. V.; Zhang, W.; Franco, C. M. M., New marine natural products from sponges (Porifera) of the order Dictyoceratida (2001 to 2012); a promising source for drug discovery, exploration and future prospects. *Biotechnology Advances* **2016**, *34* (5), 473-491.
76. Cimino, G.; De Stefano, S.; Minale, L.; Fattorusso, E., Ircinin-1 and -2, linear sesterterpenes from the marine sponge *Ircinia oros*. *Tetrahedron* **1972**, *28* (2), 333-341.
77. Fernández, R.; Bayu, A.; Aryono Hadi, T.; Bueno, S.; Pérez, M.; Cuevas, C.; Yunovilsa Putra, M., Unique Polyhalogenated Peptides from the Marine Sponge *Ircinia* sp. *Marine Drugs* **2020**, *18* (8), 396.
78. Chevallier, C.; Bugni, T. S.; Feng, X.; Harper, M. K.; Orendt, A. M.; Ireland, C. M., Tedanolide C: A Potent New 18-Membered-Ring Cytotoxic Macrolide Isolated from the Papua New Guinea Marine Sponge *Ircinia* sp. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71* (6), 2510-2513.

79. Kobayashi, J. i.; Shinonaga, H.; Shigemori, H.; Umeyama, A.; Shoji, N.; Arihara, S., Xestobergsterol C, a New Pentacyclic Steroid from the Okinawan Marine Sponge *Ircinia* sp. and Absolute Stereochemistry of Xestobergsterol A. *Journal of Natural Products* **1995**, *58* (2), 312-318.
80. Pettit, G. R.; Xu, J.-P.; Chapuis, J.-C.; Pettit, R. K.; Tackett, L. P.; Doubek, D. L.; Hooper, J. N. A.; Schmidt, J. M., Antineoplastic Agents. 520. Isolation and Structure of Irciniastatins A and B from the Indo-Pacific Marine Sponge *Ircinia ramosa*. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47* (5), 1149-1152.
81. An, C.; Jurica, J. A.; Walsh, S. P.; Hoye, A. T.; Smith, A. B., III, Total Synthesis of (+)-Irciniastatin A (a.k.a. Psymberin) and (-)-Irciniastatin B. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78* (9), 4278-4296.
82. Kondo, K.; Shigemori, H.; Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, J., Ircinals A and B from the Okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (8), 2480-2483.
83. Abdjul, D. B.; Yamazaki, H.; Ukai, K.; Namikoshi, M., Two new indole derivatives from a marine sponge *Ircinia* sp. collected at Iriomote Island. *J Nat Med* **2015**, *69* (3), 416-20.
84. Hanson, J. R., Sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **1986**, *3* (0), 123-132.
85. Hanson, J. R., The sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **1992**, *9* (5), 481-489.
86. Hanson, J. R., The sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **1996**, *13* (6), 529-535.
87. Liu, Y.; Wang, L.; Jung, J. H.; Zhang, S., Sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **2007**, *24* (6), 1401-1429.
88. Wang, L.; Yang, B.; Lin, X.-P.; Zhou, X.-F.; Liu, Y., Sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **2013**, *30* (3), 455-473.
89. Li, K.; Gustafson, K. R., Sesterterpenoids: chemistry, biology, and biosynthesis. *Natural Product Reports* **2021**, *38* (7), 1251-1281.
90. Balansa, W.; Islam, R.; Fontaine, F.; Piggott, A. M.; Zhang, H.; Webb, T. I.; Gilbert, D. F.; Lynch, J. W.; Capon, R. J., Ircinialactams: Subunit-selective glycine receptor modulators from Australian sponges of the family Irciniidae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (8), 2912-2919.
91. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Santacroce, C.; Minale, L., Fasciculatin, a novel sesterterpene from the sponge *Ircinia fasciculata*. *Tetrahedron* **1972**, *28* (6), 1579-1583.
92. Uenishi, J. i.; Kawahama, R.; Yonemitsu, O., Total Synthesis of (-)-Ircinianin and (+)-Wistarin. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (6), 1691-1701.
93. Chianese, G.; Silber, J.; Luciano, P.; Merten, C.; Erpenbeck, D.; Topaloglu, B.; Kaiser, M.; Tasdemir, D., Antiprotozoal Linear Furanosesterterpenoids from the Marine Sponge *Ircinia oros*. *Journal of Natural Products* **2017**, *80* (9), 2566-2571.
94. Shen, Y.-C.; Lo, K.-L.; Lin, Y.-C.; Khalil, A. T.; Kuo, Y.-H.; Shih, P.-S., Novel linear C₂₂-sesterterpenoids from sponge *Ircinia formosana*. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (24), 4007-4010.
95. Hofheinz, W.; Schönholzer, P., Ircinianin, a Novel Sesterterpene from a Marine Sponge. *Helvetica Chimica Acta* **1977**, *60* (4), 1367-1370.
96. Cambie, R. C.; Rickard, C. E. F.; Rutledge, P. S.; Yang, X.-S., Scalarolide and scalarin, sesterterpenes from *Cacospongia* and *Ircinia* sponges. *Acta Crystallographica Section C* **1999**, *55* (1), 112-114.
97. Wright, A. E.; McCarthy, P. J.; Schulte, G. K., Sulfircin: a new sesterterpene sulfate from a deep-water sponge of the genus *Ircinia*. *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54* (14), 3472-3474.
98. Cebula, R. E.; Blanchard, J. L.; Boisclair, M. D.; Pal, K.; Bockovich, N. J., Synthesis and phosphatase inhibitory activity of analogs of sulfircin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7* (15), 2015-2020.
99. Manes, L. V.; Naylor, S.; Crews, P.; Bakus, G. J., Suvanine, a novel sesterterpene from an *Ircinia* marine sponge. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50* (2), 284-286.
100. Manes, L. V.; Crews, P.; Kernan, M. R.; Faulkner, D. J.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D., Chemistry and revised structure of suvanine. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53* (3), 570-575.
101. Buchanan, M. S.; Edser, A.; King, G.; Whitmore, J.; Quinn, R. J., Cheilanthane Sesterterpenes, Protein Kinase Inhibitors, from a Marine Sponge of the Genus *Ircinia*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64* (3), 300-303.
102. Martinez, A.; Duque, C.; Sato, N.; Fujimoto, Y., (8Z, 13Z, 20Z)-Strobilin and (7Z, 13Z, 20Z)-Felixinin : New Furanosesterterpene Tetrone Acids from Marine Sponges of the Genus *Ircinia*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1997**, *45* (1), 181-184.
103. Barrow, C. J.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Perry, N. B., Oxygenated Furanosesterterpene Tetrone Acids from a Sponge of the Genus *Ircinia*. *Journal of Natural Products* **1988**, *51* (6), 1294-1298.
104. Shen, Y.-C.; Shih, P.-S.; Lin, Y.-S.; Lin, Y.-C.; Kuo, Y.-H.; Kuo, Y.-C.; Khalil, A. T., Irciformonins E–K, C₂₂-Trinorsesterterpenoids from the Sponge *Ircinia formosana*. *Helvetica Chimica Acta* **2009**, *92* (10), 2101-2110.

105. Rothberg, I.; Shubiak, P., The structure of some antibiotics from the sponge *ircinia strobilina*. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16 (10), 769-772.
106. De Giulio, A.; De Rosa, S.; Di Vincenzo, G.; Strazzullo, G.; Zavodnik, N., Norsesterterpenes from the North Adriatic Sponge *Ircinia oros*. *Journal of Natural Products* **1990**, 53 (6), 1503-1507.
107. Höller, U.; König, G. M.; Wright, A. D., Two New Sesterterpene Tetrionic Acids from the Marine Sponge *Ircinia oros*. *Journal of Natural Products* **1997**, 60 (8), 832-835.
108. Capon, R.; Macleod, J., A New Sesterterpene Tetrionic Acid From an Australian Sponge, *Ircinia* sp. *Australian Journal of Chemistry* **1987**, 40 (7), 1327-1330.
109. Lai, Y.-Y.; Lu, M.-C.; Wang, L.-H.; Chen, J.-J.; Fang, L.-S.; Wu, Y.-C.; Sung, P.-J., New Scalarane Sesterterpenoids from the Formosan Sponge *Ircinia felix*. *Marine Drugs* **2015**, 13 (7), 4296-4309.
110. Gregson, R. P.; Ouvrier, D., Wistarin, A Tetracyclic Furanosesterterpene From the Marine Sponge *Ircinia wistarii*. *Journal of Natural Products* **1982**, 45 (4), 412-414.
111. Issa, H. H.; Tanaka, J.; Higa, T., New Cytotoxic Furanosesterterpenes from an Okinawan Marine Sponge, *Ircinia* sp. *Journal of Natural Products* **2003**, 66 (2), 251-254.
112. Yang, S. W.; Chan, T. M.; Pomponi, S. A.; Gonsiorek, W.; Chen, G.; Wright, A. E.; Hipkin, W.; Patel, M.; Gullo, V.; Pramanik, B.; Zavodny, P.; Chu, M., A new sesterterpene, Sch 599473, from a marine sponge, *Ircinia* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **2003**, 56 (9), 783-6.
113. Coll, J. C.; Kearns, P. S.; Rideout, J. A.; Hooper, J., Ircinianin Sulfate from the Marine Sponge *Ircinia (Psammocinia) wistarii*. *Journal of Natural Products* **1997**, 60 (11), 1178-1179.
114. Susumu, K.; Kentaro, Y.; Jasim, U. M.; Toshiyasu, I.; Kiyotake, S.; Katsuhiko, U.; Daisuke, U., Kohamaic Acids A and B, Novel Cytotoxic Sesterterpenic Acids, from the Marine Sponge *Ircinia* sp. *Chemistry Letters* **2001**, 30 (2), 176-177.
115. Wilkinson, C. R., Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology* **1978**, 49 (2), 161-167.
116. Gross, H., Genomic mining--a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2009**, 12 (2), 207-19.
117. Ziemert, N.; Alanjary, M.; Weber, T., The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports* **2016**, 33 (8), 988-1005.
118. Balansa, W.; Islam, R.; Fontaine, F.; Piggott, A. M.; Zhang, H.; Xiao, X.; Webb, T. I.; Gilbert, D. F.; Lynch, J. W.; Capon, R. J., Sesterterpene glycinyllactams: a new class of glycine receptor modulator from Australian marine sponges of the genus *Psammocinia*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, 11 (28), 4695-4701.
119. Wilkinson, C. R., Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Marine Biology* **1978**, 49 (2), 177-185.
120. Wilkinson, C. R., Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology* **1978**, 49 (2), 169-176.
121. Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P., Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports* **2016**, 33 (3), 432-455.
122. Perez, G. V.; Perez, A. L., Organic Acids without a Carboxylic Acid Functional Group. *Journal of Chemical Education* **2000**, 77 (7), 910.
123. Tang, W.; Harada, K.; Kubo, M.; Hioki, H.; Fukuyama, Y., Eight New Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Ptychopetalum olacoides*. *Natural Product Communications* **2011**, 6 (3), 1934578X1100600305.
124. Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Choi, J. S.; Jung, J. H., Cytotoxic Pyrrolo- and Furanoterpenoids from the Sponge *Sarcotragus* Species. *Journal of Natural Products* **2002**, 65 (9), 1307-1314.
125. Khushi, S.; Nahar, L.; Salim, A. A.; Capon, R. J., Cacolides: Sesterterpene Butenolides from a Southern Australian Marine Sponge, *Cacospongia* sp. *Marine Drugs* **2018**, 16 (11), 456.
126. Couperus, P. A.; Clague, A. D. H.; van Dongen, J. P. C. M., ¹³C chemical shifts of some model olefins. *Organic Magnetic Resonance* **1976**, 8 (8), 426-431.
127. Gross, H.; Kehraus, S.; Nett, M.; König, G. M.; Beil, W.; Wright, A. D., New cytotoxic cembrane based diterpenes from the soft corals *Sarcophyton cherbonnieri* and *Nephthea* sp. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1 (6), 944-949.
128. Saroglou, V.; Karioti, A.; Rancic, A.; Dimas, K.; Koukoulitsa, C.; Zervou, M.; Skaltsa, H., Sesquiterpene Lactones from *Anthemis melanolepis* and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. *Journal of Natural Products* **2010**, 73 (2), 242-246.

129. Hamada, T.; Harada, D.; Hirata, M.; Yamashita, K.; Palaniveloo, K.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Arima, N.; Iriguchi, T.; de Voogd, N. J.; Vairappan, C. S., Manoalide-related Sesterterpene from the Marine Sponge *Luffariella variabilis*. *Nat Prod Commun* **2015**, *10* (6), 863-4.
130. Shen, S.-M.; Appendino, G.; Guo, Y.-W., Pitfalls in the structural elucidation of small molecules. A critical analysis of a decade of structural misassignments of marine natural products. *Natural Product Reports* **2022**, *39* (9), 1803-1832.
131. Maier, M. E., Structural revisions of natural products by total synthesis. *Natural Product Reports* **2009**, *26* (9), 1105-1124.
132. Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A., Chasing Molecules That Were Never There: Misassigned Natural Products and the Role of Chemical Synthesis in Modern Structure Elucidation. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (7), 1012-1044.
133. Capon, R. J., Extracting value: mechanistic insights into the formation of natural product artifacts – case studies in marine natural products. *Natural Product Reports* **2020**, *37* (1), 55-79.
134. Maltese, F.; van der Kooy, F.; Verpoorte, R., Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Nat Prod Commun* **2009**, *4* (3), 447-54.
135. Venditti, A., What is and what should never be: artifacts, improbable phytochemicals, contaminants and natural products. *Natural Product Research* **2020**, *34* (7), 1014-1031.
136. Brown, P. D.; Lawrence, A. L., The importance of asking “how and why?” in natural product structure elucidation. *Natural Product Reports* **2017**, *34* (10), 1193-1202.
137. Tietz, J. I.; Mitchell, D. A., Using Genomics for Natural Product Structure Elucidation. *Curr Top Med Chem* **2016**, *16* (15), 1645-94.
138. Takeda, K.; Sato, M.-a.; Yoshii, E., Synthesis of (±)-ircinianin, a marine sponge sesterterpene. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27* (33), 3903-3906.
139. Hog, D. T.; Webster, R.; Trauner, D., Synthetic approaches toward sesterterpenoids. *Natural Product Reports* **2012**, *29* (7), 752-779.
140. Prasad, P.; Zhang, A.; Salim, A. A.; Capon, R. J., Pursuing sesterterpene lactams in Australian Irciniidae sponges. *Fitoterapia* **2018**, *126*, 83-89.
141. Su, J.-H.; Tseng, S.-W.; Lu, M.-C.; Liu, L.-L.; Chou, Y.; Sung, P.-J., Cytotoxic C₂₁ and C₂₂ Terpenoid-Derived Metabolites from the Sponge *Ircinia* sp. *Journal of Natural Products* **2011**, *74* (9), 2005-2009.
142. Lai, Y.-Y.; Chen, L.-C.; Wu, C.-F.; Lu, M.-C.; Wen, Z.-H.; Wu, T.-Y.; Fang, L.-S.; Wang, L.-H.; Wu, Y.-C.; Sung, P.-J., New Cytotoxic 24-Homoscalarane Sesterterpenoids from the Sponge *Ircinia felix*. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (9), 21950-21958.
143. Trinh, T. T. V.; Truong, B. N.; Longeon, A.; Doan, T. M. H.; Deville, A.; Chau, V. M.; Pham, V. C.; Bourguet-Kondracki, M.-L., New 9 α -Hydroxy-5 α ,6 α -epoxysterols from the Vietnamese Marine Sponge *Ircinia echinata*. *Marine Drugs* **2018**, *16* (11), 424.
144. Heidary Jamebozorgi, F.; Yousefzadi, M.; Firuzi, O.; Nazemi, M.; Zare, S.; Chandran, J. N.; Schneider, B.; Baldwin, I. T.; Jassbi, A. R., Cytotoxic furanosesquiterpenoids and steroids from *Ircinia mutans* sponges. *Pharmaceutical Biology* **2021**, *59* (1), 573-581.
145. Walesch, S.; Birkelbach, J.; Jézéquel, G.; Haeckl, F. P. J.; Hegemann, J. D.; Hestekamp, T.; Hirsch, A. K. H.; Hammann, P.; Müller, R., Fighting antibiotic resistance—strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials. *EMBO reports* **2023**, *24* (1), e56033.
146. Orhan, I.; Şener, B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Tasdemir, D., Inhibitory Activity of Marine Sponge-Derived Natural Products against Parasitic Protozoa. *Marine Drugs* **2010**, *8* (1), 47-58.
147. Yang, I.; Choi, H.; Nam, S.-J.; Kang, H., A new 9,11-secosterol with a 1,4-quinone from a Korean marine sponge *Ircinia* sp. *Archives of Pharmacal Research* **2015**, *38* (11), 1970-1974.
148. Fusetani, N., Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports* **2004**, *21* (1), 94-104.
149. Vinagre, P. A.; Simas, T.; Cruz, E.; Pinori, E.; Svenson, J., Marine Biofouling: A European Database for the Marine Renewable Energy Sector. *Journal of Marine Science and Engineering* **2020**, *8* (7), 495.
150. Briand, J.-F., Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* **2009**, *25* (4), 297-311.
151. Qi, S.-H.; Ma, X., Antifouling Compounds from Marine Invertebrates. *Marine Drugs* **2017**, *15* (9), 263.
152. Raveendran, T. V.; Mol, V. P. L., Natural product antifoulants. *Current Science* **2009**, *97* (4), 508-520.
153. Fusetani, N., Antifouling marine natural products. *Natural Product Reports* **2011**, *28* (2), 400-410.
154. Tsoukatou, M.; Hellio, C.; Vagias, C.; Harvala, C.; Roussis, V., Chemical Defense and Antifouling Activity of Three Mediterranean Sponges of the Genus *Ircinia*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2002**, *57* (1-2), 161-171.

155. Hellio, C.; Tsoukatou, M.; Maréchal, J.-P.; Aldred, N.; Beauvil, C.; Clare, A. S.; Vagias, C.; Roussis, V., Inhibitory Effects of Mediterranean Sponge Extracts and Metabolites on Larval Settlement of the Barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Biotechnology* **2005**, *7* (4), 297-305.
156. De Marchi, L.; Pretti, C.; Cuccaro, A.; Oliva, M.; Tardelli, F.; Monni, G.; Magri, M.; Bulleri, F., A multi-bioassay integrated approach to assess antifouling potential of extracts from the Mediterranean sponge *Ircinia oros*. *Environmental Science and Pollution Research* **2022**, *29* (1), 1521-1531.
157. Chen, L.; Xia, C.; Qian, P.-Y., Optimization of antifouling coatings incorporating butenolide, a potent antifouling agent via field and laboratory tests. *Progress in Organic Coatings* **2017**, *109*, 22-29.
158. Chiang, H. Y.; Cheng, J.; Liu, X.; Ma, C.; Qian, P.-Y., Synthetic Analogue of Butenolide as an Antifouling Agent. *Marine Drugs* **2021**, *19* (9), 481.
159. Shi, H.; Yu, S.; Liu, D.; Van Ofwegen, L.; Proksch, P.; Lin, W., Sinularones A–I, New Cyclopentenone and Butenolide Derivatives from a Marine Soft Coral *Sinularia* sp. and Their Antifouling Activity. *Marine Drugs* **2012**, *10* (6), 1331-1344.
160. Oliveira, D. M. P. D.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J., Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* **2020**, *33* (3), e00181-19.
161. Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Natural Product Reports* **2022**, *39* (6), 1122-1171.
162. Holland, D. C.; Carroll, A. R., Marine indole alkaloid diversity and bioactivity. What do we know and what are we missing? *Natural Product Reports* **2023**.
163. Quintana, J.; Brango-Vanegas, J.; M. Costa, G.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C., Marine organisms as source of extracts to disrupt bacterial communication: bioguided isolation and identification of quorum sensing inhibitors from *Ircinia felix*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2015**, *25* (3), 199-207.
164. Pawlik, J. R.; McFall, G.; Zea, S., Does the Odor from Sponges of the Genus *Ircinia* Protect Them from Fish Predators? *Journal of Chemical Ecology* **2002**, *28* (6), 1103-1115.
165. Epifanio, R. D. A.; Gabriel, R.; Martins, D. L.; Muricy, G., The Sesterterpene Variabilin as a Fish-Predation Deterrent in the Western Atlantic Sponge *Ircinia strobilina*. *Journal of Chemical Ecology* **1999**, *25* (10), 2247-2254.
166. Goswami, A.; Van Lanen, S. G., Enzymatic strategies and biocatalysts for amide bond formation: tricks of the trade outside of the ribosome. *Molecular BioSystems* **2015**, *11* (2), 338-353.
167. Pitzer, J.; Steiner, K., Amides in Nature and Biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **2016**, *235*, 32-46.
168. Giessen, T. W.; Marahiel, M. A., Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Letters* **2012**, *586* (15), 2065-2075.
169. Dell, M.; Dunbar, K. L.; Hertweck, C., Ribosome-independent peptide biosynthesis: the challenge of a unifying nomenclature. *Natural Product Reports* **2022**, *39* (3), 453-459.
170. Ogasawara, Y.; Dairi, T., Biosynthesis of Oligopeptides Using ATP-Grasp Enzymes. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (45), 10714-10724.
171. Belin, P.; Moutiez, M.; Lautru, S.; Seguin, J.; Pernodet, J.-L.; Gondry, M., The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural Product Reports* **2012**, *29* (9), 961-979.
172. Sieber, S. A.; Marahiel, M. A., Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (2), 715-738.
173. Süßmuth, R. D.; Mainz, A., Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (14), 3770-3821.
174. Felnagle, E. A.; Jackson, E. E.; Chan, Y. A.; Podevels, A. M.; Berti, A. D.; McMahon, M. D.; Thomas, M. G., Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5* (2), 191-211.
175. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A., Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports* **2003**, *20* (3), 275-287.
176. Reimer, J. M.; Haque, A. S.; Tarry, M. J.; Schmeing, T. M., Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **2018**, *49*, 104-113.
177. Mordhorst, S.; Ruijne, F.; Vagstad, A. L.; Kuipers, O. P.; Piel, J., Emulating nonribosomal peptides with ribosomal biosynthetic strategies. *RSC Chemical Biology* **2023**, *4* (1), 7-36.
178. Finking, R.; Marahiel, M. A., Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual Review of Microbiology* **2004**, *58* (1), 453-488.
179. Hudson, G. A.; Mitchell, D. A., RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential. *Curr Opin Microbiol* **2018**, *45*, 61-69.

180. Lee, H.; Donk, W. A. v. d., Macrocyclization and Backbone Modification in RiPP Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* **2022**, *91* (1), 269-294.
181. Dang, T.; Süßmuth, R. D., Bioactive Peptide Natural Products as Lead Structures for Medicinal Use. *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50* (7), 1566-1576.
182. Vagstad, A. L., Engineering ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides as new antibiotics. *Current Opinion in Biotechnology* **2023**, *80*, 102891.
183. Montalbán-López, M.; Scott, T. A.; Ramesh, S.; Rahman, I. R.; van Heel, A. J.; Viel, J. H.; Bandarian, V.; Dittmann, E.; Genilloud, O.; Goto, Y.; Grande Burgos, M. J.; Hill, C.; Kim, S.; Koehnke, J.; Latham, J. A.; Link, A. J.; Martínez, B.; Nair, S. K.; Nicolet, Y.; Rebuffat, S.; Sahl, H.-G.; Sareen, D.; Schmidt, E. W.; Schmitt, L.; Severinov, K.; Süßmuth, R. D.; Truman, A. W.; Wang, H.; Weng, J.-K.; van Wezel, G. P.; Zhang, Q.; Zhong, J.; Piel, J.; Mitchell, D. A.; Kuipers, O. P.; van der Donk, W. A., New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports* **2021**, *38* (1), 130-239.
184. Kretsch, A. M.; Gadgil, M. G.; DiCaprio, A. J.; Barrett, S. E.; Kille, B. L.; Si, Y.; Zhu, L.; Mitchell, D. A., Peptidase Activation by a Leader Peptide-Bound RiPP Recognition Element. *Biochemistry* **2023**, *62* (4), 956-967.
185. Arnison, P. G.; Bibb, M. J.; Bierbaum, G.; Bowers, A. A.; Bugni, T. S.; Bulaj, G.; Camarero, J. A.; Campopiano, D. J.; Challis, G. L.; Clardy, J.; Cotter, P. D.; Craik, D. J.; Dawson, M.; Dittmann, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P. C.; Entian, K.-D.; Fischbach, M. A.; Garavelli, J. S.; Göransson, U.; Gruber, C. W.; Haft, D. H.; Hemscheidt, T. K.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A. R.; Jaspars, M.; Kelly, W. L.; Klinman, J. P.; Kuipers, O. P.; Link, A. J.; Liu, W.; Marahiel, M. A.; Mitchell, D. A.; Moll, G. N.; Moore, B. S.; Müller, R.; Nair, S. K.; Nes, I. F.; Norris, G. E.; Olivera, B. M.; Onaka, H.; Patchett, M. L.; Piel, J.; Reaney, M. J. T.; Rebuffat, S.; Ross, R. P.; Sahl, H.-G.; Schmidt, E. W.; Selsted, M. E.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonen, K.; Smith, L.; Stein, T.; Süßmuth, R. D.; Tagg, J. R.; Tang, G.-L.; Truman, A. W.; Vederas, J. C.; Walsh, C. T.; Walton, J. D.; Wenzel, S. C.; Willey, J. M.; van der Donk, W. A., Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports* **2013**, *30* (1), 108-160.
186. Hegemann, J. D.; Zimmermann, M.; Xie, X.; Marahiel, M. A., Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48* (7), 1909-1919.
187. Cortés-Albayay, C.; Jarmusch, S. A.; Trusch, F.; Ebel, R.; Andrews, B. A.; Jaspars, M.; Asenjo, J. A., Downsizing Class II Lasso Peptides: Genome Mining-Guided Isolation of Huascopeptin Containing the First Gly1-Asp7 Macrocycle. *The Journal of Organic Chemistry* **2020**, *85* (3), 1661-1667.
188. Cheung-Lee, W. L.; Cao, L.; Link, A. J., Pandonodin: A Proteobacterial Lasso Peptide with an Exceptionally Long C-Terminal Tail. *ACS Chemical Biology* **2019**, *14* (12), 2783-2792.
189. Maksimov, M. O.; Pan, S. J.; James Link, A., Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Natural Product Reports* **2012**, *29* (9), 996-1006.
190. Martín-Gómez, H.; Tulla-Puche, J., Lasso peptides: chemical approaches and structural elucidation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16* (28), 5065-5080.
191. Hegemann, J. D.; Zimmermann, M.; Zhu, S.; Steuber, H.; Harms, K.; Xie, X.; Marahiel, M. A., Xanthomonins I–III: A New Class of Lasso Peptides with a Seven-Residue Macrolactam Ring. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (8), 2230-2234.
192. Zimmermann, M.; Hegemann, J. D.; Xie, X.; Marahiel, M. A., Characterization of caulonodin lasso peptides revealed unprecedented N-terminal residues and a precursor motif essential for peptide maturation. *Chemical Science* **2014**, *5* (10), 4032-4043.
193. Tietz, J. I.; Schwalen, C. J.; Patel, P. S.; Maxson, T.; Blair, P. M.; Tai, H.-C.; Zakai, U. I.; Mitchell, D. A., A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nature Chemical Biology* **2017**, *13* (5), 470-478.
194. Metelev, M.; Tietz, Jonathan I.; Melby, Joel O.; Blair, Patricia M.; Zhu, L.; Livnat, I.; Severinov, K.; Mitchell, Douglas A., Structure, Bioactivity, and Resistance Mechanism of Streptomomicin, an Unusual Lasso Peptide from an Understudied Halophilic Actinomycete. *Chemistry & Biology* **2015**, *22* (2), 241-250.
195. Ferguson, A. L.; Zhang, S.; Dikiy, I.; Panagiotopoulos, A. Z.; Debenedetti, P. G.; James Link, A., An Experimental and Computational Investigation of Spontaneous Lasso Formation in Microcin J25. *Biophysical Journal* **2010**, *99* (9), 3056-3065.
196. Maksimov, M. O.; Link, A. J., Prospecting genomes for lasso peptides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2014**, *41* (2), 333-344.
197. Zhao, N.; Pan, Y.; Cheng, Z.; Liu, H., Lasso peptide, a highly stable structure and designable multifunctional backbone. *Amino Acids* **2016**, *48* (6), 1347-1356.
198. Knappe, T. A.; Linne, U.; Xie, X.; Marahiel, M. A., The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Letters* **2010**, *584* (4), 785-789.

199. Hegemann, J. D., Factors Governing the Thermal Stability of Lasso Peptides. *ChemBioChem* **2020**, *21* (1-2), 7-18.
200. Hegemann, J. D.; Zimmermann, M.; Xie, X.; Marahiel, M. A., Caulosegnins I–III: A Highly Diverse Group of Lasso Peptides Derived from a Single Biosynthetic Gene Cluster. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (1), 210-222.
201. Zimmermann, M.; Hegemann, Julian D.; Xie, X.; Marahiel, Mohamed A., The Astexin-1 Lasso Peptides: Biosynthesis, Stability, and Structural Studies. *Chemistry & Biology* **2013**, *20* (4), 558-569.
202. Hegemann, J. D.; Fage, C. D.; Zhu, S.; Harms, K.; Di Leva, F. S.; Novellino, E.; Marinelli, L.; Marahiel, M. A., The ring residue proline 8 is crucial for the thermal stability of the lasso peptide caulosegnin II. *Molecular BioSystems* **2016**, *12* (4), 1106-1109.
203. Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D., The Future of Peptide-based Drugs. *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, *81* (1), 136-147.
204. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M., Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* **2010**, *15* (1), 40-56.
205. Jing, X.; Jin, K., A gold mine for drug discovery: Strategies to develop cyclic peptides into therapies. *Medicinal Research Reviews* **2020**, *40* (2), 753-810.
206. Tapeinou, A.; Matsoukas, M.-T.; Simal, C.; Tselios, T., Review cyclic peptides on a merry-go-round; towards drug design. *Peptide Science* **2015**, *104* (5), 453-461.
207. Gang, D.; Kim, D. W.; Park, H.-S., Cyclic Peptides: Promising Scaffolds for Biopharmaceuticals. *Genes* **2018**, *9* (11), 557.
208. Tan, S.; Moore, G.; Nodwell, J., Put a Bow on It: Knotted Antibiotics Take Center Stage. *Antibiotics* **2019**, *8* (3), 117.
209. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O., Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases* **2013**, *13* (12), 1057-1098.
210. Wright, G. D., Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports* **2017**, *34* (7), 694-701.
211. Tan, S.; Ludwig, K. C.; Müller, A.; Schneider, T.; Nodwell, J. R., The Lasso Peptide Siamycin-I Targets Lipid II at the Gram-Positive Cell Surface. *ACS Chemical Biology* **2019**, *14* (5), 966-974.
212. Mukhopadhyay, J.; Sineva, E.; Knight, J.; Levy, R. M.; Ebricht, R. H., Antibacterial Peptide Microcin J25 Inhibits Transcription by Binding within and Obstructing the RNA Polymerase Secondary Channel. *Molecular Cell* **2004**, *14* (6), 739-751.
213. Cheung-Lee, W. L.; Parry, M. E.; Zong, C.; Cartagena, A. J.; Darst, S. A.; Connell, N. D.; Russo, R.; Link, A. J., Discovery of Ubonodin, an Antimicrobial Lasso Peptide Active against Members of the *Burkholderia cepacia* Complex. *ChemBioChem* **2020**, *21* (9), 1335-1340.
214. Metelev, M.; Arseniev, A.; Bushin, L. B.; Kuznedelov, K.; Artamonova, T. O.; Kondratenko, R.; Khodorkovskii, M.; Seyedsayamdost, M. R.; Severinov, K., Acinetodin and Klebsidin, RNA Polymerase Targeting Lasso Peptides Produced by Human Isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12* (3), 814-824.
215. Stariha, L. M.; McCafferty, D. G., Discovery of the Class I Antimicrobial Lasso Peptide Arcumycin. *ChemBioChem* **2021**, *22* (16), 2632-2640.
216. Elsayed, S. S.; Trusch, F.; Deng, H.; Raab, A.; Prokes, I.; Busarakam, K.; Asenjo, J. A.; Andrews, B. A.; van West, P.; Bull, A. T.; Goodfellow, M.; Yi, Y.; Ebel, R.; Jaspars, M.; Rateb, M. E., Chaxapeptin, a Lasso Peptide from Extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* Strain C58 from the Hyperarid Atacama Desert. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (20), 10252-10260.
217. Son, S.; Jang, M.; Lee, B.; Hong, Y.-S.; Ko, S.-K.; Jang, J.-H.; Ahn, J. S., Ulleungdin, a Lasso Peptide with Cancer Cell Migration Inhibitory Activity Discovered by the Genome Mining Approach. *Journal of Natural Products* **2018**, *81* (10), 2205-2211.
218. Carson, D. V.; Patiño, M.; Elashal, H. E.; Cartagena, A. J.; Zhang, Y.; Whitley, M. E.; So, L.; Kayser-Browne, A. K.; Earl, A. M.; Bhattacharyya, R. P.; Link, A. J., Cloacaenodin, an Antimicrobial Lasso Peptide with Activity against *Enterobacter*. *ACS Infectious Diseases* **2023**, *9* (1), 111-121.
219. Andersen, F. D.; Pedersen, K. D.; Wilkens Juhl, D.; Mygind, T.; Chopin, P.; B. Svenningsen, E.; Poulsen, T. B.; Braad Lund, M.; Schramm, A.; Gottfredsen, C. H.; Tørring, T., Triculamin: An Unusual Lasso Peptide with Potent Antimycobacterial Activity. *Journal of Natural Products* **2022**, *85* (6), 1514-1521.
220. Potterat, O.; Wagner, K.; Gemmecker, G.; Mack, J.; Puder, C.; Vettermann, R.; Streicher, R., BI-32169, a Bicyclic 19-Peptide with Strong Glucagon Receptor Antagonist Activity from *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* **2004**, *67* (9), 1528-1531.

221. Kodani, S.; Inoue, Y.; Suzuki, M.; Dohra, H.; Suzuki, T.; Hemmi, H.; Ohnishi-Kameyama, M., Sphaericin, a Lasso Peptide from the Rare Actinomycete *Planomonospora sphaerica*. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, 2017 (8), 1177-1183.
222. Tsunakawa, M.; Hu, S. L.; Hoshino, Y.; Detlefson, D. J.; Hill, S. E.; Furumai, T.; White, R. J.; Nishio, M.; Kawano, K.; Yamamoto, S.; et al., Siamycins I and II, new anti-HIV peptides: I. Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, 48 (5), 433-4.
223. Morishita, Y.; Chiba, S.; Tsukuda, E.; Tanaka, T.; Ogawa, T.; Yamasaki, M.; Yoshida, M.; Kawamoto, I.; Matsuda, Y., RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I. Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **1994**, 47 (3), 269-75.
224. Saad, H., Expanding The Chemical Space of RiPPs in Rare Actinobacteria Employing a Tunable Metabologenomic Approach *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Pharmazie, Gutachter: Prof. Dr. Harald Groß, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, 2021, <http://dx.doi.org/10.15496/publikation-60504>*.
225. Götze, S.; Stallforth, P., Structure elucidation of bacterial nonribosomal lipopeptides. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2020**, 18 (9), 1710-1727.
226. Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D., ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR* **1995**, 5 (1), 67-81.
227. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M.; Bühlmann, Philippe; Badertscher, Martin, Structure Determination of Organic Compounds : Tables of Spectral Data. *Springer Berlin, Heidelberg* **2009**.
228. Zancchi, R.; Moore, W., Temperature and pH dependence of proton N.M.R. of glutamine in peptides. *Australian Journal of Chemistry* **1980**, 33 (7), 1505-1510.
229. Claridge, T. D. W.; Pérez-Victoria, I., Enhanced ¹³C resolution in semi-selective HMBC: a band-selective, constant-time HMBC for complex organic structure elucidation by NMR. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1 (21), 3632-3634.
230. SHEINBLATT, M.; ANDORN, M.; RUDI, A., N.m.r. studies on the conformation of cyclo(-I-Trp-I-His) in solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1988**, 31 (4), 373-387.
231. Keller, R. M.; Wüthrich, K., ¹H NMR studies at 360 MHz of the aromatic amino acid residues in ferrocyclochrome c-552 from *euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1977**, 491 (2), 416-422.
232. Wyche, T. P.; Ruzzini, A. C.; Schwab, L.; Currie, C. R.; Clardy, J., Tryptorubin A: A Polycyclic Peptide from a Fungus-Derived Streptomyces. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139 (37), 12899-12902.
233. Nanudorn, P.; Thiengmag, S.; Biermann, F.; Erkoc, P.; Dirnberger, S. D.; Phan, T. N.; Fürst, R.; Ueoka, R.; Helfrich, E. J. N., Atropopeptides are a Novel Family of Ribosomally Synthesized and Posttranslationally Modified Peptides with a Complex Molecular Shape. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, 61 (41), e202208361.
234. Williamson, R. T.; Buevich, A. V.; Martin, G. E.; Parella, T., LR-HSQMBC: A Sensitive NMR Technique To Probe Very Long-Range Heteronuclear Coupling Pathways. *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, 79 (9), 3887-3894.
235. Xie, X.; Marahiel, M. A., NMR as an Effective Tool for the Structure Determination of Lasso Peptides. *ChemBioChem* **2012**, 13 (5), 621-625.
236. Vettore, L. A.; Westbrook, R. L.; Tennant, D. A., Proline metabolism and redox; maintaining a balance in health and disease. *Amino Acids* **2021**, 53 (12), 1779-1788.
237. Kricheldorf, H. R.; Haupt, E. T. K.; Müller, D., Secondary structure of peptides. 17—Cis/trans isomerism of solid proline-containing oligopeptides as revealed by ¹³C NMR CP/MAS spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1986**, 24 (1), 41-52.
238. Deber, C. M.; Bovey, F. A.; Carver, J. P.; Blout, E. R., Nuclear magnetic resonance evidence for cis-peptide bonds in proline oligomers. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92 (21), 6191-6198.
239. Grathwohl, C.; Wüthrich, K., Nmr studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **1981**, 20 (12), 2623-2633.
240. Schubert, M.; Labudde, D.; Oschkinat, H.; Schmieder, P., A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ¹³C chemical shift statistics. *Journal of Biomolecular NMR* **2002**, 24 (2), 149-154.
241. van Bergeijk, D. A.; Terlouw, B. R.; Medema, M. H.; van Wezel, G. P., Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology* **2020**, 18 (10), 546-558.

242. Jose, P. A.; Maharshi, A.; Jha, B., Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research* **2021**, *246*, 126708.
243. Engelbrecht, A.; Saad, H.; Gross, H.; Kaysser, L., Natural Products from *Nocardia* and Their Role in Pathogenicity. *Microbial Physiology* **2021**, *31* (3), 217-232.
244. Männle, D.; McKinnie, S. M. K.; Mantri, S. S.; Steinke, K.; Lu, Z.; Moore, B. S.; Ziemert, N.; Kaysser, L., Comparative Genomics and Metabolomics in the Genus *Nocardia*. *mSystems* **2020**, *5* (3), e00125-20.
245. Dhakal, D.; Rayamajhi, V.; Mishra, R.; Sohng, J. K., Bioactive molecules from *Nocardia*: diversity, bioactivities and biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2019**, *46* (3-4), 385-407.
246. Saad, H.; Aziz, S.; Gehringer, M.; Kramer, M.; Straetener, J.; Berscheid, A.; Brötz-Oesterhelt, H.; Gross, H., Nocathioamides, Uncovered by a Tunable Metabologenomic Approach, Define a Novel Class of Chimeric Lanthipeptides. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (30), 16472-16479.
247. Wiebach, V.; Mainz, A.; Siegert, M. J.; Jungmann, N. A.; Lesquame, G.; Tirat, S.; Dreux-Zigha, A.; Aszodi, J.; Le Beller, D.; Süßmuth, R. D., The anti-staphylococcal lipolanthines are ribosomally synthesized lipopeptides. *Nat Chem Biol* **2018**, *14* (7), 652-654.
248. Duan, Y.; Niu, W.; Pang, L.; Bian, X.; Zhang, Y.; Zhong, G., Unusual Post-Translational Modifications in the Biosynthesis of Lasso Peptides. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (13), 7231.
249. Lu, J.; Li, Y.; Bai, Z.; Lv, H.; Wang, H., Enzymatic macrocyclization of ribosomally synthesized and posttranslational modified peptides via C–S and C–C bond formation. *Natural Product Reports* **2021**, *38* (5), 981-992.
250. Mahanta, N.; Hudson, G. A.; Mitchell, D. A., Radical S-Adenosylmethionine Enzymes Involved in RiPP Biosynthesis. *Biochemistry* **2017**, *56* (40), 5229-5244.
251. Wenski, S. L.; Thiengmag, S.; Helfrich, E. J. N., Complex peptide natural products: Biosynthetic principles, challenges and opportunities for pathway engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2022**, *7* (1), 631-647.
252. Hudson, G. A.; Burkhart, B. J.; DiCaprio, A. J.; Schwalen, C. J.; Kille, B.; Pogorelov, T. V.; Mitchell, D. A., Bioinformatic Mapping of Radical S-Adenosylmethionine-Dependent Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides Identifies New C α , C β , and C γ -Linked Thioether-Containing Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141* (20), 8228-8238.
253. Guo, S.; Wang, S.; Ma, S.; Deng, Z.; Ding, W.; Zhang, Q., Radical SAM-dependent ether crosslink in daropeptide biosynthesis. *Nature Communications* **2022**, *13* (1), 2361.
254. Kunakom, S.; Otani, H.; Udway, D. W.; Doering, D. T.; Mouncey, N. J., Cytochromes P450 involved in bacterial RiPP biosyntheses. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2023**, *50* (1).
255. Zdouc, M. M.; Alanjary, M. M.; Zarazúa, G. S.; Maffioli, S. I.; Crüsemann, M.; Medema, M. H.; Donadio, S.; Sosio, M., A biaryl-linked tripeptide from *Planomonospora* reveals a widespread class of minimal RiPP gene clusters. *Cell Chemical Biology* **2021**, *28* (5), 733-739.e4.
256. Zhao, Y.; Marschall, E.; Treisman, M.; McKay, A.; Padva, L.; Crüsemann, M.; Nelson, D. R.; Steer, D. L.; Schittenhelm, R. B.; Tailhades, J.; Cryle, M. J., Cytochrome P450_{Bit} Enables Versatile Peptide Cyclisation to Generate Histidine- and Tyrosine-Containing Crosslinked Tripeptide Building Blocks. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (37), e202204957.
257. He, B.-B.; Cheng, Z.; Liu, J.; Liu, R.; Zhong, Z.; Gao, Y.; Liu, H.; Li, Y.-X., Bacterial Cytochrome P450-catalyzed Post-translational Macrocyclization. *bioRxiv* **2023**, 2023.05.08.539676.
258. Zhao, J.-C.; Yu, S.-M.; Liu, Y.; Yao, Z.-J., Biomimetic Synthesis of ent(-)-Azonazine and Stereochemical Reassignment of Natural Product. *Organic Letters* **2013**, *15* (17), 4300-4303.
259. Li, J.; Burgett, A. W. G.; Esser, L.; Amezcua, C.; Harran, P. G., Total Synthesis of Nominal Diazonamides—Part 2: On the True Structure and Origin of Natural Isolates. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (24), 4770-4773.
260. Tang, S.; Vincent, G., Natural Products Originated from the Oxidative Coupling of Tyrosine and Tryptophan: Biosynthesis and Bioinspired Synthesis. *Chemistry – A European Journal* **2021**, *27* (8), 2612-2622.
261. Swain, J. A.; Walker, S. R.; Calvert, M. B.; Brimble, M. A., The tryptophan connection: cyclic peptide natural products linked via the tryptophan side chain. *Natural Product Reports* **2022**, *39* (2), 410-443.
262. Lindquist, N.; Fenical, W.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J., Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (6), 2303-2304.

263. Li, J.; Jeong, S.; Esser, L.; Harran, P. G., Total Synthesis of Nominal Diazonamides—Part 1: Convergent Preparation of the Structure Proposed for (–)-Diazonamide A. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (24), 4765-4769.
264. Wu, Q.-X.; Crews, M. S.; Draskovic, M.; Sohn, J.; Johnson, T. A.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Yao, X.-J.; Bjeldanes, L. F.; Crews, P., Azonazine, a Novel Dipeptide from a Hawaiian Marine Sediment-Derived Fungus, *Aspergillus insulicola*. *Organic Letters* **2010**, *12* (20), 4458-4461.
265. An, J. S.; Lee, H.; Kim, H.; Woo, S.; Nam, H.; Lee, J.; Lee, J. Y.; Nam, S.-J.; Lee, S. K.; Oh, K.-B.; Kim, S.; Oh, D.-C., Discovery and Biosynthesis of Cihunamides, Macrocyclic Antibacterial RiPPs with a Unique C-N Linkage Formed by CYP450 Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* *n/a* (n/a), e202300998.
266. Hug, J. J.; Frank, N. A.; Walt, C.; Šenica, P.; Panter, F.; Müller, R., Genome-Guided Discovery of the First Myxobacterial Biarylittide Myxarylin Reveals Distinct C-N Biaryl Crosslinking in RiPP Biosynthesis. *Molecules* **2021**, *26* (24), 7483.
267. Knappe, T. A.; Linne, U.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; Xie, X.; Marahiel, M. A., Isolation and Structural Characterization of Capistruin, a Lasso Peptide Predicted from the Genome Sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (34), 11446-11454.
268. Cheung-Lee, W. L.; Parry, M. E.; Jaramillo Cartagena, A.; Darst, S. A.; Link, A. J., Discovery and structure of the antimicrobial lasso peptide citrocin. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294* (17), 6822-6830.
269. Carson, D. V.; Zhang, Y.; So, L.; Cheung-Lee, W. L.; Cartagena, A. J.; Darst, S. A.; Link, A. J., Discovery, Characterization, and Bioactivity of the Achromonodins: Lasso Peptides Encoded by *Achromobacter*. *bioRxiv* **2023**, 2023.06.21.545946.
270. Li, Y.; Han, Y.; Zeng, Z.; Li, W.; Feng, S.; Cao, W., Discovery and Bioactivity of the Novel Lasso Peptide Microcin Y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69* (31), 8758-8767.
271. Do, T.; Thokkadam, A.; Leach, R.; Link, A. J., The Anti *Burkholderia* Lasso Peptide Ubonodin Co-opts the Siderophore Receptor PupB for Cellular Entry. *bioRxiv* **2022**, 2022.03.09.483586.
272. Salomón, R. A.; Fariás, R. N., The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *Journal of Bacteriology* **1995**, *177* (11), 3323-3325.
273. Mathavan, I.; Zirah, S.; Mehmood, S.; Choudhury, H. G.; Goulard, C.; Li, Y.; Robinson, C. V.; Rebuffat, S.; Beis, K., Structural basis for hijacking siderophore receptors by antimicrobial lasso peptides. *Nature Chemical Biology* **2014**, *10* (5), 340-342.
274. Braffman, N. R.; Piscotta, F. J.; Hauver, J.; Campbell, E. A.; Link, A. J.; Darst, S. A., Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistruin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, *116* (4), 1273-1278.
275. Gavrish, E.; Sit, Clarissa S.; Cao, S.; Kandror, O.; Spoering, A.; Peoples, A.; Ling, L.; Fetterman, A.; Hughes, D.; Bissell, A.; Torrey, H.; Akopian, T.; Mueller, A.; Epstein, S.; Goldberg, A.; Clardy, J.; Lewis, K., Lassomycin, a Ribosomally Synthesized Cyclic Peptide, Kills *Mycobacterium tuberculosis* by Targeting the ATP-Dependent Protease ClpC1P1P2. *Chemistry & Biology* **2014**, *21* (4), 509-518.
276. Iwatsuki, M.; Tomoda, H.; Uchida, R.; Gouda, H.; Hirono, S.; Ōmura, S., Lariatins, Antimycobacterial Peptides Produced by *Rhodococcus* sp. K01-B0171, Have a Lasso Structure. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (23), 7486-7491.
277. Iwatsuki, M.; Uchida, R.; Takakusagi, Y.; Matsumoto, A.; Jiang, C.-L.; Takahashi, Y.; Arai, M.; Kobayashi, S.; Matsumoto, M.; Inokoshi, J.; Tomoda, H.; Ōmura, S., Lariatins, Novel Antimycobacterial Peptides with a Lasso Structure, Produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *The Journal of Antibiotics* **2007**, *60* (6), 357-363.
278. Hensel, A.; Bauer, R.; Heinrich, M.; Spiegler, V.; Kayser, O.; Hempel, G.; Kraft, K., Challenges at the Time of COVID-19: Opportunities and Innovations in Antivirals from Nature. *Planta Med* **2020**, *86* (10), 659-664.
279. Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Natural Product Reports* **2023**, *40* (2), 275-325.
280. Burkhardt, I.; de Rond, T.; Chen, P. Y.-T.; Moore, B. S., Ancient plant-like terpene biosynthesis in corals. *Nature Chemical Biology* **2022**, *18* (6), 664-669.
281. Scesa, P. D.; Lin, Z.; Schmidt, E. W., Ancient defensive terpene biosynthetic gene clusters in the soft corals. *Nature Chemical Biology* **2022**, *18* (6), 659-663.
282. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Natural Product Reports* **2015**, *32* (2), 116-211.
283. Chu, L.; Huang, J.; Muhammad, M.; Deng, Z.; Gao, J., Genome mining as a biotechnological tool for the discovery of novel marine natural products. *Critical Reviews in Biotechnology* **2020**, *40* (5), 571-589.

284. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Natural Product Reports* **2016**, 33 (3), 382-431.
285. Leal, M. C.; Anaya-Rojas, J. M.; Munro, M. H. G.; Blunt, J. W.; Melian, C. J.; Calado, R.; Lürig, M. D., Fifty years of capacity building in the search for new marine natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, 117 (39), 24165-24172.
286. The Nagoya Protocol and Natural Product-Based Research. *ACS Chemical Biology* **2011**, 6 (4), 289-289.
287. <https://www.marinepharmacology.org/phase-2-drugs>. abgerufen am 11.06.2023.
288. <https://www.marinepharmacology.org/phase-3-drugs>. abgerufen am 11.06.2023.
289. Kinghorn, A. D., Pharmacognosy in the 21st century*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2001**, 53 (2), 135-148.
290. Süntar, I., Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews* **2020**, 19 (5), 1199-1209.
291. McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T., Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* **2007**, 68 (14), 2015-2022.
292. Fitzgerald, M.; Heinrich, M.; Booker, A., Medicinal Plant Analysis: A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, 10.
293. Salmerón-Manzano, E.; Garrido-Cardenas, J. A.; Manzano-Agugliaro, F., Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, 17 (10), 3376.
294. Joppa, L. N.; Roberts, D. L.; Myers, N.; Pimm, S. L., Biodiversity hotspots house most undiscovered plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (32), 13171-13176.
295. Atanasov, A. G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E. H.; Rollinger, J. M.; Schuster, D.; Breuss, J. M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M. D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Stuppner, H., Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances* **2015**, 33 (8), 1582-1614.
296. Shan, Z.-J.; Ye, J.-F.; Hao, D.-C.; Xiao, P.-G.; Chen, Z.-D.; Lu, A.-M., Distribution patterns and industry planning of commonly used traditional Chinese medicinal plants in China. *Plant Diversity* **2022**, 44 (3), 255-261.
297. Tatsis, E. C.; O'Connor, S. E., New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, 42, 126-132.
298. Medema, M. H.; Osbourn, A., Computational genomic identification and functional reconstitution of plant natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports* **2016**, 33 (8), 951-962.
299. Nützmann, H.-W.; Huang, A.; Osbourn, A., Plant metabolic clusters – from genetics to genomics. *New Phytologist* **2016**, 211 (3), 771-789.
300. Caesar, L. K.; Montaser, R.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L., Metabolomics and genomics in natural products research: complementary tools for targeting new chemical entities. *Natural Product Reports* **2021**, 38 (11), 2041-2065.
301. Goodstein, D. M.; Shu, S.; Howson, R.; Neupane, R.; Hayes, R. D.; Fazo, J.; Mitros, T.; Dirks, W.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Rokhsar, D. S., Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **2011**, 40 (D1), D1178-D1186.
302. Matasci, N.; Hung, L.-H.; Yan, Z.; Carpenter, E. J.; Wickett, N. J.; Mirarab, S.; Nguyen, N.; Warnow, T.; Ayyampalayam, S.; Barker, M.; Burleigh, J. G.; Gitzendanner, M. A.; Wafula, E.; Der, J. P.; dePamphilis, C. W.; Roure, B.; Philippe, H.; Ruhfel, B. R.; Miles, N. W.; Graham, S. W.; Mathews, S.; Surek, B.; Melkonian, M.; Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Rothfels, C.; Pokorny, L.; Shaw, J. A.; DeGironimo, L.; Stevenson, D. W.; Villarreal, J. C.; Chen, T.; Kutchan, T. M.; Rolf, M.; Baucom, R. S.; Deyholos, M. K.; Samudrala, R.; Tian, Z.; Wu, X.; Sun, X.; Zhang, Y.; Wang, J.; Leebens-Mack, J.; Wong, G. K.-S., Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *GigaScience* **2014**, 3 (1), 17.
303. Kersten, R. D.; Weng, J.-K., Gene-guided discovery and engineering of branched cyclic peptides in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, 115 (46), E10961-E10969.
304. Chigumba, D. N.; Mydy, L. S.; de Waal, F.; Li, W.; Shafiq, K.; Wotring, J. W.; Mohamed, O. G.; Mladenovic, T.; Tripathi, A.; Sexton, J. Z.; Kautsar, S.; Medema, M. H.; Kersten, R. D., Discovery and biosynthesis of cyclic plant peptides via autocatalytic cyclases. *Nature Chemical Biology* **2022**, 18 (1), 18-28.
305. Kersten, R. D.; Mydy, L. S.; Fallon, T. R.; de Waal, F.; Shafiq, K.; Wotring, J. W.; Sexton, J. Z.; Weng, J.-K., Gene-Guided Discovery and Ribosomal Biosynthesis of Moroidin Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, 144 (17), 7686-7692.
306. Bauman, K. D.; Butler, K. S.; Moore, B. S.; Chekan, J. R., Genome mining methods to discover bioactive natural products. *Natural Product Reports* **2021**, 38 (11), 2100-2129.

307. Agrawal, P.; Khater, S.; Gupta, M.; Sain, N.; Mohanty, D., RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic Acids Research* **2017**, *45* (W1), W80-W88.
308. Juarez, R. J.; Jiang, Y.; Tremblay, M.; Shao, Q.; Link, A. J.; Yang, Z. J., LassoHTP: A High-Throughput Computational Tool for Lasso Peptide Structure Construction and Modeling. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2023**, *63* (2), 522-530.
309. Ramesh, S.; Guo, X.; DiCaprio, A. J.; De Lio, A. M.; Harris, L. A.; Kille, B. L.; Pogorelov, T. V.; Mitchell, D. A., Bioinformatics-Guided Expansion and Discovery of Graspptides. *ACS Chemical Biology* **2021**, *16* (12), 2787-2797.
310. Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya P, C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* **2016**, *34* (8), 828-837.
311. Babij, N. R.; McCusker, E. O.; Whiteker, G. T.; Canturk, B.; Choy, N.; Creemer, L. C.; Amicis, C. V. D.; Hewlett, N. M.; Johnson, P. L.; Knobelsdorf, J. A.; Li, F.; Lorschach, B. A.; Nugent, B. M.; Ryan, S. J.; Smith, M. R.; Yang, Q., NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry. *Organic Process Research & Development* **2016**, *20* (3), 661-667.
312. Flores-Bocanegra, L.; Raja, H. A.; Bacon, J. W.; Maldonado, A. C.; Burdette, J. E.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H., Cytotoxic Naphthoquinone Analogues, Including Heterodimers, and Their Structure Elucidation Using LR-HSQMBC NMR Experiments. *Journal of Natural Products* **2021**, *84* (3), 771-778.
313. Molecular Operating Environment (MOE), S. S. W., Suite #910; H3A 2R7. Chemical Computing Group ULC: Montreal, QC, Canada, 2022.
314. Halgren, T. A., Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 490-519.
315. Halgren, T. A., Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 520-552.
316. Halgren, T. A., Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 553-586.
317. Halgren, T. A.; Nachbar, R. B., Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 587-615.
318. Halgren, T. A., Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5-6), 616-641.
319. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (7), 5648-5652.
320. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J., Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of physical chemistry* **1994**, *98* (45), 11623-11627.
321. Weigend, F.; Ahlrichs, R., Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7* (18), 3297-3305.

322. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H., A consistent and accurate *ab initio* parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132* (15).
323. University of Karlsruhe, F. K. G., TURBOMOLE V7.4.1 2018. TURBOMOLE GmbH: Karlsruhe, Germany 2007.
324. Kollwitz, M.; Gauss, J., A direct implementation of the GIAO-MBPT(2) method for calculating NMR chemical shifts. Application to the naphthalenium and anthracenium ions. *Chemical Physics Letters* **1996**, *260* (5), 639-646.
325. Aryal, N.; Chen, J.; Bhattarai, K.; Hennrich, O.; Handayani, I.; Kramer, M.; Straetener, J.; Wommer, T.; Berscheid, A.; Peter, S.; Reiling, N.; Brötz-Oesterhelt, H.; Geibel, C.; Lämmerhofer, M.; Mast, Y.; Gross, H., High Plasticity of the Amicetin Biosynthetic Pathway in *Streptomyces* sp. SHP 22-7 Led to the Discovery of Streptocytosine P and Cytosaminomycins F and G and Facilitated the Production of 12F-Plicacatin. *Journal of Natural Products* **2022**, *85* (3), 530-539.
326. Patel, J. B. C., F.R.; Bradford, P.A.; Eliopoulos, G.M.; Hindler, J.A.; Jenkins, S.G.; Lewis II, J.S.; Limbago, B.; Miller, L.A.; Nicolau, D.P.; et al., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 10th ed.; *Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2015; Volume 35*.
327. Böffert, R.; Businger, R.; Preiß, H.; Ehmman, D.; Truffault, V.; Simon, C.; Ruetalo, N.; Hamprecht, K.; Müller, P.; Wehkamp, J.; Schindler, M., The human α -defensin-derived peptide HD5(1–9) inhibits cellular attachment and entry of human cytomegalovirus. *Antiviral Research* **2020**, *177*, 104779.
328. Große, M.; Ruetalo, N.; Layer, M.; Hu, D.; Businger, R.; Rheber, S.; Setz, C.; Rauch, P.; Auth, J.; Fröba, M.; Brysch, E.; Schindler, M.; Schubert, U., Quinine Inhibits Infection of Human Cell Lines with SARS-CoV-2. *Viruses* **2021**, *13* (4), 647.
329. Baltz, T.; Baltz, D.; Giroud, C.; Crockett, J., Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO J* **1985**, *4* (5), 1273-1277.
330. Rätz, B.; Iten, M.; Grether-Bühler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R., The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. *Acta Tropica* **1997**, *68* (2), 139-147.
331. Huber, W.; Koella, J. C., A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Tropica* **1993**, *55* (4), 257-261.
332. Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; Flamme, A. C. L.; Voorhis, W. C. V., Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40* (11), 2592-2597.
333. CUNNINGHAM, I., New Culture Medium for Maintenance of Tsetse Tissues and Growth of Trypanosomatids*. *The Journal of Protozoology* **1977**, *24* (2), 325-329.
334. Matile, H.; Richard, J.; Pink, L., 15 - *Plasmodium falciparum* Malaria Parasite Cultures and Their Use in Immunology. In *Immunological Methods*, Lefkovits, I.; Pernis, B., Eds. Academic Press: 1990; pp 221-234.
335. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D., Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, *16* (6), 710-718.
336. Ponnudurai, T.; Leeuwenberg, A. D.; Meuwissen, J. H., Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* **1981**, *33* (1), 50-54.
337. Boyd, M. R.; Paull, K. D., Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* **1995**, *34* (2), 91-109.
338. Shoemaker, R. H., The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6* (10), 813-823.
339. Page, B.; Page, M.; Noel, C., A NEW FLUOROMETRIC ASSAY FOR CYTOTOXICITY MEASUREMENTS IN-VITRO. *Int J Oncol* **1993**, *3* (3), 473-476.
340. Ansar Ahmed, S.; Gogal, R. M.; Walsh, J. E., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* **1994**, *170* (2), 211-224.
341. Grant, T. M.; Rennison, D.; Cervin, G.; Pavia, H.; Hellio, C.; Foulon, V.; Brimble, M. A.; Cahill, P.; Svenson, J., Towards eco-friendly marine antifouling biocides – Nature inspired tetrasubstituted 2,5-diketopiperazines. *Science of The Total Environment* **2022**, *812*, 152487.
342. Cahill PL, A. J., Selwood AI, Kuhajek JM, Metamorphosis of the invasive ascidian *Ciona savignyi*: environmental variables and chemical exposure. *PeerJ*:e1739 **2016**.

Literatur

343. ASTM., Standard Guide for Conducting Static Short-Term Chronic Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. *ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2021.*
344. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harald Groß für die Möglichkeit und Unterstützung bedanken, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich zudem bei Herrn PD Dr. Bertolt Gust für seine Hilfe als Zweitbetreuer und als Gutachter meiner Arbeit bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Frau JProf. Dr. Silja Mordhorst und Herrn Prof. Dr. Pierre Koch für Ihre Bereitschaft bedanken, als Prüfer bei meiner mündlichen Prüfung mitzuwirken. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der pharmazeutischen Biologie und insbesondere bei meinen Master-Studenten für die nette Zeit in Tübingen bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Mama und meinem Bruder für die Unterstützung und Hilfe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Lebenslauf