

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München*



*Analytik von freien Sterolen  
und  
Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung  
des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren*

vorgelegt von  
Jörg Müller  
aus München

2002



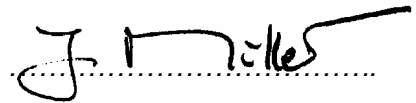
Erklärung

*Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. F. Bracher betreut.*

Ehrenwörtliche Versicherung

*Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.*

*München, am 15.04.2002*

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'J' followed by 'Müller' and a long horizontal stroke extending to the right.

Jörg Müller

*Dissertation eingereicht am 15.04.2002*

*1. Gutachter Prof. Dr. F. Bracher*

*2. Gutachter Prof. em. Dr. Th. Severin*

*Mündliche Prüfung am 14.05.2002*

*Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juli 1998 bis April 2002 am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher.*

*Die Übernahme des Korreferats durch Herrn Prof. em. Dr. Theodor Severin ist für mich eine besondere Ehre.*

*für Petra*

*für meine Familie*



*cogito ergo sterol !*

J.C.BURBIEL





## Danke!

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Bracher, der den Fortschritt dieser Arbeit wohlwollend und motivierend geleitet und begleitet hat. Im Besonderen danke ich ihm für einen enormen Vertrauensvorschuß und die damit verbundenen Freiräume und Kompetenzen, um meine Vorgehensweise und die benötigte analytische Infrastruktur weitgehend nach meinen Vorstellungen zu bestimmen.

Einem glücklichen Zufall verdanke ich den Kontakt mit Herrn Dr. Andreas Meister von der Deutsche Hefewerke GmbH, Hamburg. Ohne seine freundliche Spende von Hefefett wäre die Isolierung und Charakterisierung von Ergosterol-Precursoren als unverzichtbares Fundament für die geplante biologische Testung nicht möglich gewesen.

Frau Nouha Salman, Herrn Joachim Burbiel und Herrn Markus Gans danke ich für viele interessante Testsubstanzen. Von der besonders guten Zusammenarbeit mit Frau Salman hat nicht nur die regelmäßige Auslastung der Testung profitiert, sondern hier zeigten sich durch die Feedbackwirkung bereits erste erfolgreiche Ansätze bei der Optimierung neuer potentieller Wirkstoffe.

Der beinahe gleichzeitigen „Eingebung“ von Herrn Dr. Holger Lerche und Herrn Dr. Georg Höfner verdanke ich, daß die Anschaffung unseres LC-MS/MS-Systems so rasch von statten ging.

Ich bedanke mich bei meiner studentischen Hilfskraft Herrn Christoph Schmidt für die kreative Mitarbeit bei der Isolierung zahlreicher Ergosterolbiosynthese-Vorstufen.

Diese Arbeit hätte nie zu einem glücklichen Ende gefunden, wenn Frau Elke Armbrust nicht so verlässlich die Aufgaben der Hefeanzucht und Aufarbeitung übernommen hätte. Danke Elke, für fast 800 SPE's, die super Zusammenarbeit und alles andere!

Danke, liebe Frau Karin Bauer, für Ihre „stellenpolitische Weitsicht“ und Ihre erfrischende unerschrockene Art.

Ich danke *Microsofts* Rechtschreibprüfung für das Entgegenkommen, dem Anwender die Freiheit zu lassen, sich für die gute alte deutsche Rechtschreibung zu entscheiden. Ich habe das jedenfalls getan und hoffe, daß die Leser dieser Arbeit für meine „nostalgische Ader“ Verständnis haben.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen des Arbeitskreises für das freundschaftliche und heitere Arbeitsklima, bei Matthias Strobl für den Schulteranschlag im gemeinsamen Kampf gegen Shi(t)madzu, bei Wolfram Eisenreich für den einen oder anderen „lässigen“ Trick bei der Erstellung und Verwaltung von Endnoten und Querverweisen in WinWord, bei meinen „Mädels“ aus dem „Hühnerstall“ für mein seelisches Wohlbefinden während der Arbeitszeit, besonders aber bei meinen Laborkollegen Susanne Sproll, Nouha Salman und Berthold Pohl für eine super Zeit im „liberalsten“ Labor der Fakultät.

Herrn Dr. Jürgen Krauß und allen (ehemaligen) Erstsemester-Assistenten danke ich für Ehre, mit ihnen „Dienst“ gehabt haben zu dürfen.

Mein wehmütig-freundschaftlicher Dank gilt den (ehemaligen) ordentlichen Mitgliedern der Freitags-Spätaufsteher-Frühstücksrunde, mit denen mich mehr als nur ein kollegiales Verhältnis verbindet. Caroline Berns, Cornelia Hahn-Graßhoff, Elisabeth Kirchisner, Nouha Salman, Wolfram Eisenreich und Oliver Kast, mögen euch Fleischsalat und Nutella niemals ausgehen!

Mein allerherzlichster Dank jedoch gilt meiner Frau Petra. Ohne ihren liebenswert „katalysierenden“ Einfluß hätte diese Arbeit weder einen Anfang, noch einen so baldigen Abschluß gefunden.

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

amu	<i>atomic mass units</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
br.	breit
ca.	circa
d	Dublett
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DMI	<i>Demethylation-inhibiting fungizide</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EI	<i>Electron Impact Ionisation</i> , Elektronenstoß-Ionisation
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie, <i>die</i> (als Methode) bzw. Gaschromatograph-Massenspektrometer, <i>das</i> (als Gerät)
h	Stunde(n)
(HP)LC	(Hochdruck-)Flüssigkeitschromatographie, <i>die</i> (als Methode) (Hochdruck-)Flüssigkeitschromatograph, <i>der</i> (als Gerät)
KOH	Kaliumhydroxid-Lösung
(HP)LC-MS	(Hochdruck-)Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, <i>die</i> (als Methode) (Hochdruck-)Flüssigkeitschromatograph-Massenspektrometer, <i>das</i> (als Gerät)
m	Multiplett
M <sub>R</sub>	relatives Molekulargewicht
m/z	„ <i>mass over charge</i> “, Masse pro Ladung
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
q	Quartett
Rkt.	Reaktion
S.	Seite
SBI	Sterol-Biosynthese-Inhibitor
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> , Arbeitsvorschrift
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Festphasenextraktion
t	Triplett
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
UV	Ultraviolett (-Spektrum)
vgl.	vergleiche
XIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>

# INHALT

## ALLGEMEINER TEIL

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b> .....	<b>2</b>
1.1	Die physiologische Rolle von Ergosterol in Pilzen und Hefen .....	3
1.2	Die Ergosterolbiosynthese.....	5
1.2.1	Der Prä-Squalen-Abschnitt.....	5
1.2.2	Der Post-Squalen-Abschnitt .....	7
1.2.2.1	Squalenepoxidase .....	10
1.2.2.2	Squalenepoxidcyclase .....	10
1.2.2.3	CytochromP <sub>450</sub> -Sterol-C-14-Demethylase.....	11
1.2.2.4	Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase .....	12
1.2.2.5	Sterol-C-4-Demethylase-Komplex .....	12
1.2.2.6	C-24-Sterol-Methyltransferase (24-SMT).....	13
1.2.2.7	$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase .....	14
1.2.2.8	Sterol-C-5-Desaturase .....	15
1.2.2.9	Cytochrom P <sub>450</sub> -Sterol-C-22-Desaturase .....	15
1.2.2.10	$\Delta^{24(28)}$ -Reduktase.....	16
1.3	Angriffspunkte bekannter Sterolbiosyntheseinhibitoren.....	17
1.3.1	Allylamine und weitere Inhibitoren der Squalenepoxidase .....	18
1.3.2	Aziridine und Azasqualenoide .....	19
1.3.3	Azole und weitere Inhibitoren der Cyt. P-450 <sub>14DM</sub> .....	19
1.3.4	Morpholine .....	21
1.3.5	Weitere Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase .....	23
1.3.6	Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes.....	24
1.3.7	Inhibitoren der C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase .....	25
<b>2</b>	<b>THEMENSTELLUNG</b> .....	<b>27</b>
2.1	„Das Ziel“ .....	27
2.2	„Die Strategie“ .....	27
2.3	„Der Weg“ .....	28
<b>3</b>	<b>ANALYTIK VON FREIEN STEROLEN</b> .....	<b>30</b>
3.1	Bisherige Extraktionsmethoden von Sterolen aus Hefen .....	31
3.2	Hefefett.....	32
3.3	Isolierung von Sterolen aus Hefefett mit präparativer HPLC.....	32
3.4	Sterolanalytik mit HPLC-DAD.....	37
3.5	Sterolanalytik mit GC-MS .....	40
3.5.1	Interpretation von EI-Massenspektren freier Sterole .....	40
3.5.2	Massenspektrometrische Untersuchung von Squalen .....	46
3.5.3	Einfluß der Struktur auf die Retention bei gaschromatographischer Trennung .....	46
3.6	LC-MS/MS Grundlagen .....	48
3.7	Sterolanalytik mit LC-MS/MS.....	53

3.8	<b>Sterolanalytik mit NMR</b> .....	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>ENTWICKLUNG EINER SCREENING-METHODE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES INHIBITIONSVERHALTENS NEUER STEROLBIOSYNTHEINHIBITOREN</b> .....	<b>59</b>
4.1	<b>Allgemeine Betrachtungen</b> .....	<b>59</b>
4.1.1	Grundprinzip der Methode .....	59
4.1.2	Bisheriger „Stand der Technik“ .....	60
4.1.3	Möglichkeiten des Testsystems .....	61
4.2	<b>Mikrobiologische Aspekte</b> .....	<b>61</b>
4.2.1	Auswahl und Charakterisierung von <i>Yarrowia lipolytica</i> als Testorganismus.....	61
4.2.2	Kultivierung von <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	62
4.3	<b>Entwicklung einer SPE-Methode zur Extraktion der Sterolfraction aus Hefe</b> ..	<b>63</b>
4.3.1	Nachteile der konventionellen Sterolextraktion.....	63
4.3.2	Forderungen an die zu entwickelnde Extraktionsmethode .....	63
4.3.3	Prinzip der Festphasenextraktion (SPE).....	64
4.3.4	Methodenentwicklung zur SPE .....	64
4.4	<b>Beschreibung des gesamten Testablaufes</b> .....	<b>67</b>
4.4.1	Mikrobiologischer Teil .....	67
4.4.2	Analytischer Teil .....	68
4.4.3	Chromatographische Untersuchung des Sterolextraktes .....	70
4.5	<b>Testergebnisse</b> .....	<b>71</b>
4.5.1	Sterolmuster und Wachstum der <i>Y. lipolytica</i> Kontrolle .....	71
4.5.2	Sterolmuster und EC <sub>50</sub> der Referenz-Wirkstoffe .....	72
4.5.2.1	Allylamin-Gruppe .....	72
4.5.2.2	Azol-Gruppe.....	73
4.5.2.3	Morpholin-Gruppe.....	74
4.5.3	Sterolmuster und EC <sub>50</sub> der getesteten Substanzen aus dem Arbeitskreis .....	76
4.5.3.1	Azasecosteroide .....	76
4.5.3.2	Azasterole.....	80
4.5.4	Weitere Testsubstanzen .....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>83</b>

## EXPERIMENTELLER TEIL

<b>6</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>90</b>
6.1	<b>Allgemeine Angaben</b> .....	<b>90</b>
6.2	<b>Geräte und Parameter</b> .....	<b>90</b>
6.3	<b>Extraktion von Sterolen aus Hefefett</b> .....	<b>93</b>
6.3.1	Bereitung des Rohextraktes .....	93
6.3.2	Fraktionierung des Rohextraktes .....	93
6.3.3	Kristallisation der Sterolfractionen .....	93
6.4	<b>Datenblätter identifizierter Sterole</b> .....	<b>94</b>
	(1) Squalen.....	95
	(2) Lanosterol .....	96

(3)	4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol .....	97
(4)	4,4-Dimethylzymosterol .....	98
(5)	4-Methylzymosterol .....	99
(6)	Zymosterol .....	100
(7)	Fecosterol .....	101
(8)	Episterol .....	102
(9)	24(28)-Dehydroergosterol .....	103
(10)	Ergosterol .....	104
(11)	Fungisterol .....	105
(12)	Lichesterol .....	106
(13)	Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol .....	107
(14)	Ignosterol .....	108
(15)	Cholesta-5,7,24-trienol .....	109
(16)	Ergosta-8-enol .....	110
(17)	Ergosta-8,14,24(28)-trienol .....	111
<b>6.5</b>	<b>Testung auf SBI-Aktivität.....</b>	<b>112</b>
6.5.1	SOP – Kultivierung des Testorganismus <i>Yarrowia lipolytica</i> in Stammkultur ...	113
6.5.2	SOP – Kultivierung von <i>Yarrowia lipolytica</i> unter Zusatz von Testsubstanzen	114
6.5.3	SOP – Gewinnung der Trockenbiomasse aus der Flüssigkultur und Bestimmung von EC <sub>50</sub> .....	116
6.5.4	SOP – Aufarbeitung der Trockenbiomasse zum Hefehydrolysat .....	117
6.5.5	SOP – Extraktion der Sterolfraction aus Hefehydrolysat .....	118
<b>6.6</b>	<b>Datenblätter der getesteten Substanzen.....</b>	<b>119</b>
(i)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Clotrimazol .....	121
(ii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Fluconazol .....	122
(iii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Ketoconazol .....	123
(iv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Amorolfin .....	124
(v)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Fenpropimorph .....	125
(vi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Fenpropidin .....	126
(vii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Tridemorph .....	127
(viii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Terbinafin .....	128
(ix)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Naftifin .....	129
(x)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-N-Allylamin .....	130
(xi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-Methylallylamin .....	131
(xii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-Homoallylamin .....	132
(xiii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-N-Ethylamin .....	133
(xiv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-20 .....	134
(xv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-36 .....	135
(xvi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-40 .....	136
(xvii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-41 .....	137
(xviii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-47 .....	138
(xix)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-53-I .....	139
(xx)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-53 .....	140
(xxi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-54 .....	141
(xxii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-55 .....	142
(xxiii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-56 .....	143
(xxiv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-57-I .....	144
(xxv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-58 .....	145
(xxvi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-62 .....	146
(xxvii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-63 .....	147
(xxviii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-64 .....	148
(xxix)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-65 .....	149
(xxx)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit ausgewählten aktiven Verbindungen unter modifizierten Bedingungen .....	150

---

(xxxi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-18.....	151
(xxxii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-22.....	152
(xxxiii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-30.....	153
(xxxiv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-33.....	154
(xxxv)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Sampangin.....	155
(xxxvi)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Teebaumöl.....	156
(xxxvii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Menthen-4-ol.....	157
(xxxviii)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Melissenöl und Blutorangenöl.....	158
(xxxix)	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit „Parfum“ .....	159
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>160</b>

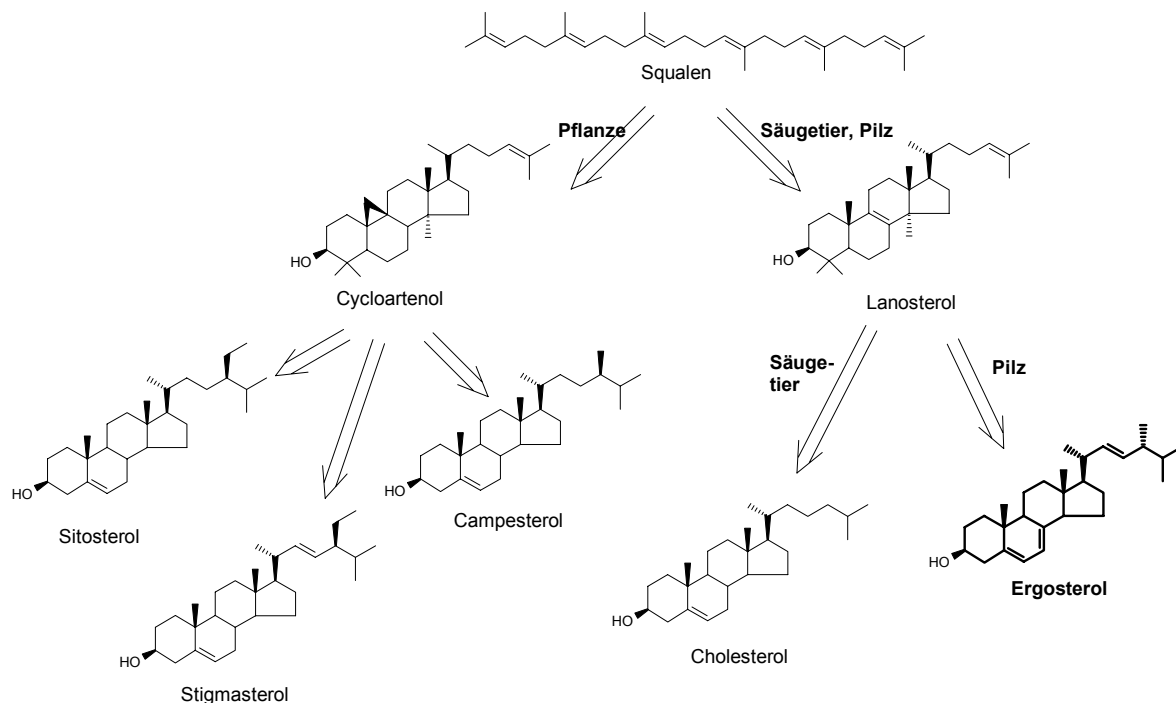
## ALLGEMEINER TEIL

## 1 Einführung

„This is the centenary of the isolation of ergosterol from yeast.“<sup>1</sup> Während 1895 das Interesse an dieser erstmals im Jahre 1889 aus Mutterkorn (engl.: *ergot*) angereicherten Substanz eher dem Einsatz als Ersatzstoff für Vitamin D<sub>3</sub> galt, wurde der möglichen physiologischen Bedeutung von Ergosterol im Metabolismus der Hefe nur wenig Aufmerksamkeit zuteil.

Bis in die 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts führten zahlreiche *in vitro* Studien bezüglich der Interaktionen von Sterolen – besonders Cholesterol – mit anderen Komponenten der Zellmembranen, zu der Auffassung, daß Sterole ausschließlich strukturelle Aufgaben in der Membran erfüllen, die der Stabilität, Rigidität und Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung dienen.<sup>2</sup> Dabei wurde in diesen Studien lange die Beobachtung ignoriert, daß, wenn Ergosterol anstelle von Cholesterol bei den Experimenten zum Einsatz kam, es sich oft anders verhielt. Schließlich führten die Resultate zu der Annahme, daß Ergosterol, obwohl es eine strukturelle Funktion haben muß, vielleicht auch zusätzliche Aufgaben hat.<sup>3</sup> Erst 1967 wurde die Möglichkeit diskutiert, daß Ergosterol wenigstens eine doppelte physiologische Rolle in der Pilzzelle einnimmt.<sup>4</sup>

Mit sehr wenigen Ausnahmen sind Sterole in allen eukaryotischen Organismen enthalten.<sup>5</sup> Allerdings haben Säugetiere, Pilze und Pflanzen im Laufe der Evolution verschiedene Wege im Sterolmetabolismus beschritten und nach der letzten gemeinsamen Sterolvorstufe, dem Squalen bzw. dessen Epoxid, die für ihre Klasse typischen Sterole gebildet (Abbildung 1). Bei Mensch und Tier ist das Hauptsterol das Cholesterol, während das der meisten Pilze und Hefen das Ergosterol ist. Pflanzen hingegen haben einen Cocktail aus drei Sterolen anstelle eines Hauptsterols: Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol.<sup>6</sup>



**Abbildung 1: Unterschiede in der Sterolbiosynthese bei Pflanzen, Säugetieren und Pilzen**

Das Ausnutzen dieser Unterschiede im sogenannten Post-Squalen-Abschnitt der Sterolbiosynthese stellt einen mächtigen Stützpfiler bei der Entwicklung von Antimykotika (Schutz



von Mensch und Tier vor pathogenen Pilzen) und Fungiziden (Schutz von Nutzpflanzen vor phytopathogenen Pilzen) dar, denn es eröffnet Medizin und Landwirtschaft die Möglichkeit, Pilzkrankheiten gezielt zu behandeln, ohne den „Patienten“ zu schädigen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Testsystems, der diesen Post-Squalen-Abschnitt in der Sterolbiosynthese von Pilzen als Indikator nutzt, um Substanzen, die sich in Vorversuchen als wachstumshemmend auf das Pilzwachstum erwiesen haben, auf eine potentielle Ergosterolbiosyntheseinhibition hin zu untersuchen und gegebenenfalls eine Zuordnung zu treffen, welches Enzym inhibiert wurde. Im Vorfeld dazu wurden Ergosterolbiosynthesestufen aus Hefefett isoliert und charakterisiert, sowie eine neue Methode zur Extraktion von Sterolen aus Hefezellen entwickelt.

## 1.1 Die physiologische Rolle von Ergosterol in Pilzen und Hefen

Wie eingangs erwähnt, stellt Ergosterol für Pilze und Hefen einen wichtigen Baustein dar. Zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen von Sterolen in der Zellmembran hat sich dabei die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als sehr geeigneter Organismus erwiesen.<sup>7</sup> Sie läßt sich einfach kultivieren, ist unter strikt anaeroben Bedingungen sterolauxotroph, d.h. auf Supplementierung durch sterolhaltiges Medium angewiesen, und es existieren genetisch genau definierte Mutanten, welche an verschiedenen Stellen der Ergosterolbiosynthese geblockt sind.<sup>8</sup> Die Übertragung solcher Ergebnisse kann unter Einschränkungen auch auf andere Hefen oder Pilze erfolgen.

Die drei Arbeitsgruppen um *Nes*, *Bloch* und *Parks* haben übereinstimmend herausgefunden, daß Ergosterol zumindest zwei Hauptfunktionen in der Zellmembran innehat:

Zum einen erfüllt Ergosterol eine wichtige Funktion in der Modulation der Membranfluidität, indem es in den Phospholipid-Bilayer der Zellwand eingebaut wird. In diesem auch als *fluid-mosaic* beschriebenen Modell, sorgt Ergosterol für die nötige Festigkeit und Struktur, um eine optimale Funktion der zahlreichen membranständigen Enzyme und der Membranpermeabilität zu gewährleisten. Bei normalen Wachstumsbedingungen wurde für die Plasmamembran ein Ergosterol-Phospholipid-Verhältnis von 3,3 (mol/mol) bei *S. cerevisiae* ermittelt.<sup>9</sup> Zur Erfüllung dieser strukturellen Funktion werden offensichtlich große Mengen an Sterol benötigt, daher spricht man auch von einer „*bulk*“-Funktion des Ergosterols.

Die Pilzzelle verfügt im Gegensatz zur Säugerzelle über einen Chitinpanzer unterhalb der Plasmamembran. Für das Wachstum muß diese stabile Chitinschale aufgebrochen und wieder neu geschlossen werden. Dafür ist ein membranständiges Enzym der Pilzzelle, die Chitinsynthetase zuständig. Ihre Funktion ist unverzichtbar für Zellwachstum und -teilung<sup>10</sup>. Sie weist in Abhängigkeit von der Festigkeit der Membran eine unterschiedliche Struktur und Aktivität auf. Ihre Arbeitsfähigkeit ist damit indirekt abhängig von der Struktur und Menge der in die Membran eingelagerten Sterole.

Ein weiteres Beispiel für ein Enzym, welches als Folge einer Änderung der Membranstruktur durch Einlagerung von „falschen“ Sterolen einen Funktionsverlust erleidet, ist die membranständige Membran-ATPase einer Sterinmangelmutante von *Mycoplasma mycoides var. mycoides*: Im Gegensatz zum Wildstamm zeigt die Mutante bei 18°C eine temperaturabhängige Konformationsänderung und daraus resultierend eine temperaturabhängige Änderung der spezifischen Aktivität.<sup>11</sup>

Zahlreiche Untersuchungen<sup>12,13,14</sup>, ob Ergosterol in dieser sogenannten „*bulk*“-Funktion ersetzbar ist, zeigten, daß diese benötigte große Menge mit einer verhältnismäßig großen Strukturtoleranz einhergeht. Beinahe jedes Sterol ist in der Lage, die „*bulk*“-Funktion zu erfüllen, wenn seine Struktur den nachfolgenden Bedingungen entspricht. Demnach ist die 3 $\beta$ -

OH-Gruppe essentiell, die Länge der Alkylkette an C-20 soll nicht über 6 C-Atome betragen und die Stereochemie an C-20 muß *R* sein. Verzweigungen an C-20, C-24 oder C-25 sind fakultativ, ebenso wie eine Methylgruppe an C-14. Auch Doppelbindungen im Molekül müssen nicht zwingend vorhanden sein. Obligatorisch wiederum ist das Fehlen der geminalen Methylgruppen an C-4. Somit sind sterolartige Triterpenoide wie z.B. Cycloartenol oder Lanosterol nicht in der Lage als „*bulk*“-Sterole zu fungieren. Die Einlagerung solcher Sterole in den Bilayer stört die Funktion membranständiger Enzyme, wie z.B. der Chitinsynthetase, erheblich, was sich in einem Ausbleiben von Wachstum zeigt. Das alle genannten Mindestanforderungen erfüllende Cholestanol ist als „*bulk*“-Sterol geeignet. Wichtig jedoch ist, daß in vielen Experimenten gefunden wurde, daß Spuren (10 ng/ml) von Ergosterol notwendig waren, um das Pilzwachstum überhaupt zu initiieren.

Damit wird eine zweite Aufgabe des Ergosterols als Wachstumspromotor aufgezeigt. Im Unterschied zu der genannten „*bulk*“-Funktion, welche große Mengen an Sterol benötigt, aber eine relativ geringe Strukturspezifität aufweist, erfordert die hormonelle Funktion nur geringste Mengen an Sterol, allerdings mit höheren Anforderungen an die Struktur. Diese Funktion wird in der Literatur wahlweise als „*sparkling*“-Funktion<sup>12</sup>, „*synergistic*“-Funktion<sup>15</sup> oder „*sparing*“-Funktion<sup>16</sup> bezeichnet. Über die genauen Aufgaben des Ergosterols im Wachstumsprozeß des Pilzes ist noch nicht viel bekannt, allerdings sind einige Vorschläge gemacht worden<sup>7</sup>, die im Zusammenhang mit dem Wachstum stehen: Ergosterol könnte das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren kontrollieren, ebenso wie die Umwandlung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin, es könnte den Polyphosphoinositolmetabolismus anregen oder eine Proteinkinase, die eine Kontrollfunktion im Zellzyklus wahrnimmt.

Die strukturellen Anforderungen wurden von *Parks et al.* an einer *S. cerevisiae*-Mutante erforscht<sup>12</sup>. Dabei fand man heraus, daß eine Doppelbindung an C-5,6 ( $\Delta^5$ ) die Grundvoraussetzung für „*sparkling*“-Sterole ist, während die - verzichtbaren - Funktionalisierungen in der Reihenfolge  $\Delta^{22} > \Delta^7 > \text{C-24-Methylierung}$  nur die Wartezeit bis zur „Zündung“ des Wachstums verkürzen konnten (vgl. Abbildung 5).

Vor dem Hintergrund, daß allein ein Methylierungsschritt den Pilz 15 ATP-Äquivalente kostet<sup>8</sup>, und in Experimenten mit Modellmembranen und biologischen Membranen herausgefunden wurde, daß Cholesterol die Membranfluidität und die Permeabilität oftmals deutlich besser reguliert, als das Ergosterol, bleibt es rätselhaft, warum soviel Energie für die Bildung von „*bulk*“-Ergosterol „verschwendet“ wird.<sup>7</sup>

*Oldfield et al.* konnten allerdings 1995 in Modellversuchen und NMR-Experimenten klären, daß die Vergleiche zwischen Sterolen und ihren Ordnungseffekten in Phosphatidylcholin-Bilayern stark abhängig sind von der Art der im Phospholipid beteiligten Fettsäuren.<sup>13</sup> Cholesterol konnte höhere Ordnungseffekte bei 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylcholin-Bilayern erzielen als Ergosterol, während Ergosterol bei Dimyristoylphosphatidylcholin- und Dipalmitoylphosphatidylcholin-Bilayern einen höheren Ordnungsgrad und damit geringere Fluidität bewirkte.

Die Tatsache, daß das Fettsäureprofil von *S. cerevisiae* zu rund 80% aus zwei Monoensäuren, namentlich Palmitoleinsäure (C16:1, n-7) und Ölsäure (C18:1, n-9), besteht<sup>17, 18</sup> und die experimentelle Bestätigung, daß Ergosterol in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-phosphatidylcholin-Bilayern eine höhere Membranfluidität aufweist, unterstreichen die von *Bloch et al.*<sup>19</sup> gemachte Vermutung, daß die nicht-optimalen „*bulk*“-Sterole dem Organismus ermöglichen, unter variableren Umweltbedingungen zu wachsen.

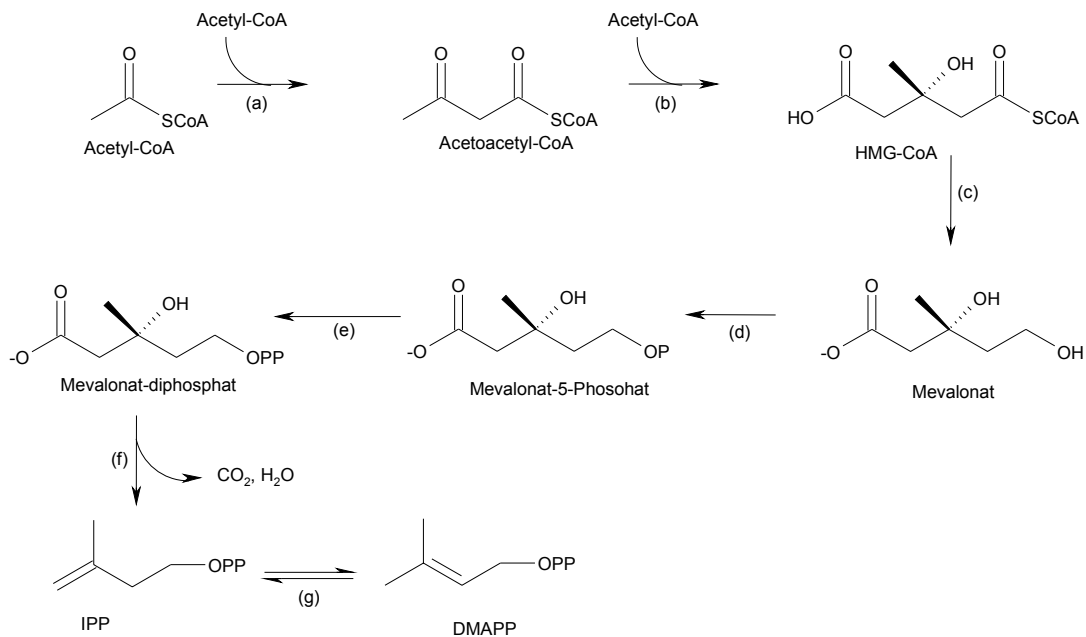
## 1.2 Die Ergosterolbiosynthese

Die Biosynthese von Ergosterol lässt sich in einen Prä- und einen Post-Squalen-Abschnitt unterteilen.

Der Prä-Squalen-Abschnitt verläuft ausgehend von Acetyl-CoA über Squalen zu dessen Epoxid. Daran anschließend wird im Post-Squalen-Abschnitt nach der Cyclisierung zu Lanosterol über acht isolierbare Zwischenstufen schließlich Ergosterol gebildet.<sup>6, 20</sup>

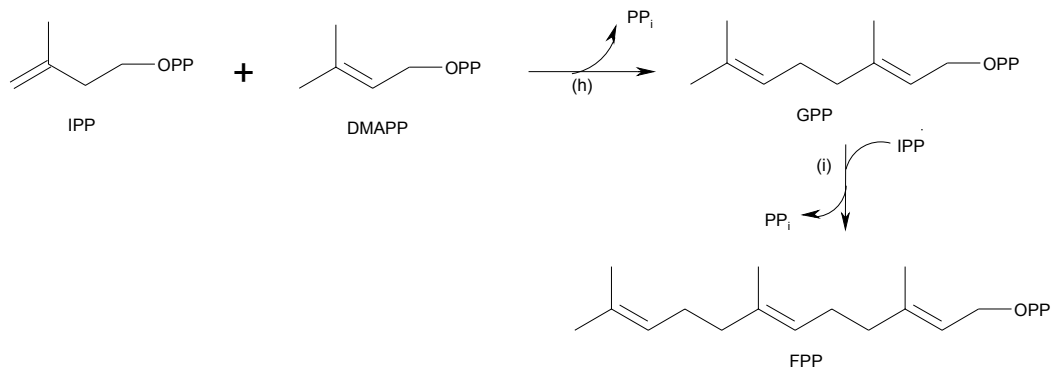
### 1.2.1 Der Prä-Squalen-Abschnitt

Drei Acetat-Einheiten Acetyl-CoA kondensieren unter Beteiligung der Thiokinase (a) und der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase (b) zu Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA), das durch die HMG-CoA-Reduktase (c) zu Mevalonat reduziert wird. Dieses Enzym stellt das erste Schlüsselenzym zur Regulation der Sterolbiosynthese in Pflanzen, Pilzen und Säugtieren dar. Aus Mevalonsäure entsteht nach doppelter Phosphorylierung durch die Mevalonatkinase (d) und Mevalonatphosphatkinase (e) und Abspaltung der Carboxylgruppe mit Hilfe der Mevalonatdiphosphatdecarboxylase (f) der eigentliche Isoprenbaustein, das „aktive Isopren“ Isopentenylidiphosphat (IPP). Dieses steht vermittelt durch die IPP-DMAPP-Isomerase (g) im Gleichgewicht mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP)**

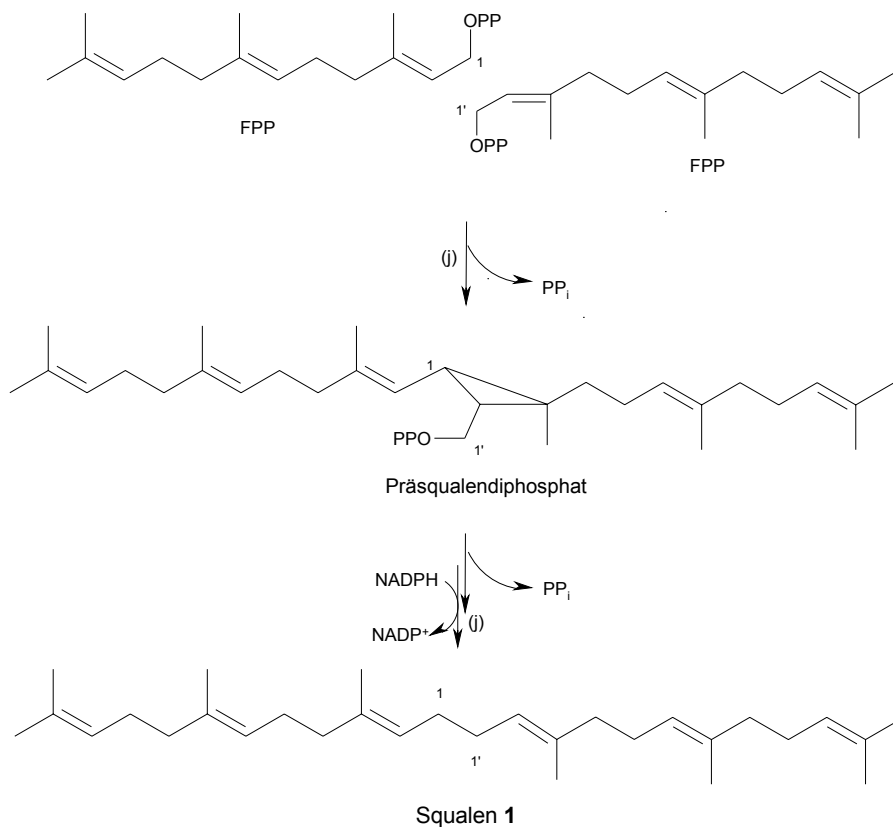
Ein Molekül IPP reagiert unter Verlust von Diphosphat mit dem isomeren DMAPP zu Geranylidiphosphat (GPP), einem Monoterpen. Nach Addition eines weiteren IPP an das Monoterpen entsteht das Sesquiterpen Farnesylidiphosphat (FPP). Beide Reaktionen (h), (i) katalysiert die Isoprenyltransferase (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Biosynthese von Farnesyl diphosphat (FPP)**

Durch Verknüpfung von zwei dieser C<sub>15</sub>-Einheiten entsteht in einer „Kopf-Kopf-Kupplung“ das Triterpen Squalen.

Die Squalensynthese (j) katalysiert unter Abspaltung von Diphosphat die Dimerisierung von zwei Molekülen FPP zu Präsqalendiphosphat. Nach Eliminierung eines zweiten Äquivalents Diphosphat unter Bildung eines Cyclopropylcarbinyl-Kations, wird dieses zum Cyclobutyl-Kation umgelagert<sup>6</sup> (nicht gezeigt), welches unter Verbrauch von NADPH zu Squalen (**1**) reagiert (Abbildung 4).

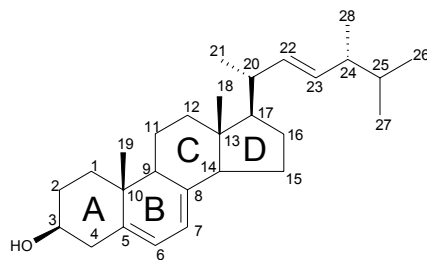


**Abbildung 4: Biosynthese von Squalen**

### 1.2.2 Der Post-Squalen-Abschnitt

Der Post-Squalen-Abschnitt beginnt mit der Epoxidierung des Squalens (**1**) zum entsprechenden 2,3-Epoxid. Dieses ist das Substrat für die Squalenepoxidcyclase, welche schließlich Lanosterol (**2**), das erste Sterol der Biosynthese von Ergosterol, produziert. Es folgt eine Reihe von Demethylierungen, Reduktionen und Isomerisierungen, bis schließlich Ergosterol gebildet wird. *Rodriguez* und *Parks* haben die Energiebilanz für die Biosynthese der Ergosterols aufgestellt und dabei wenigstens 25 Reaktionsschritte gezählt, wobei insgesamt 22 Äquivalente ATP und 16 Äquivalente NADPH verbraucht werden um ein Molekül Ergosterol zu produzieren!<sup>21</sup>

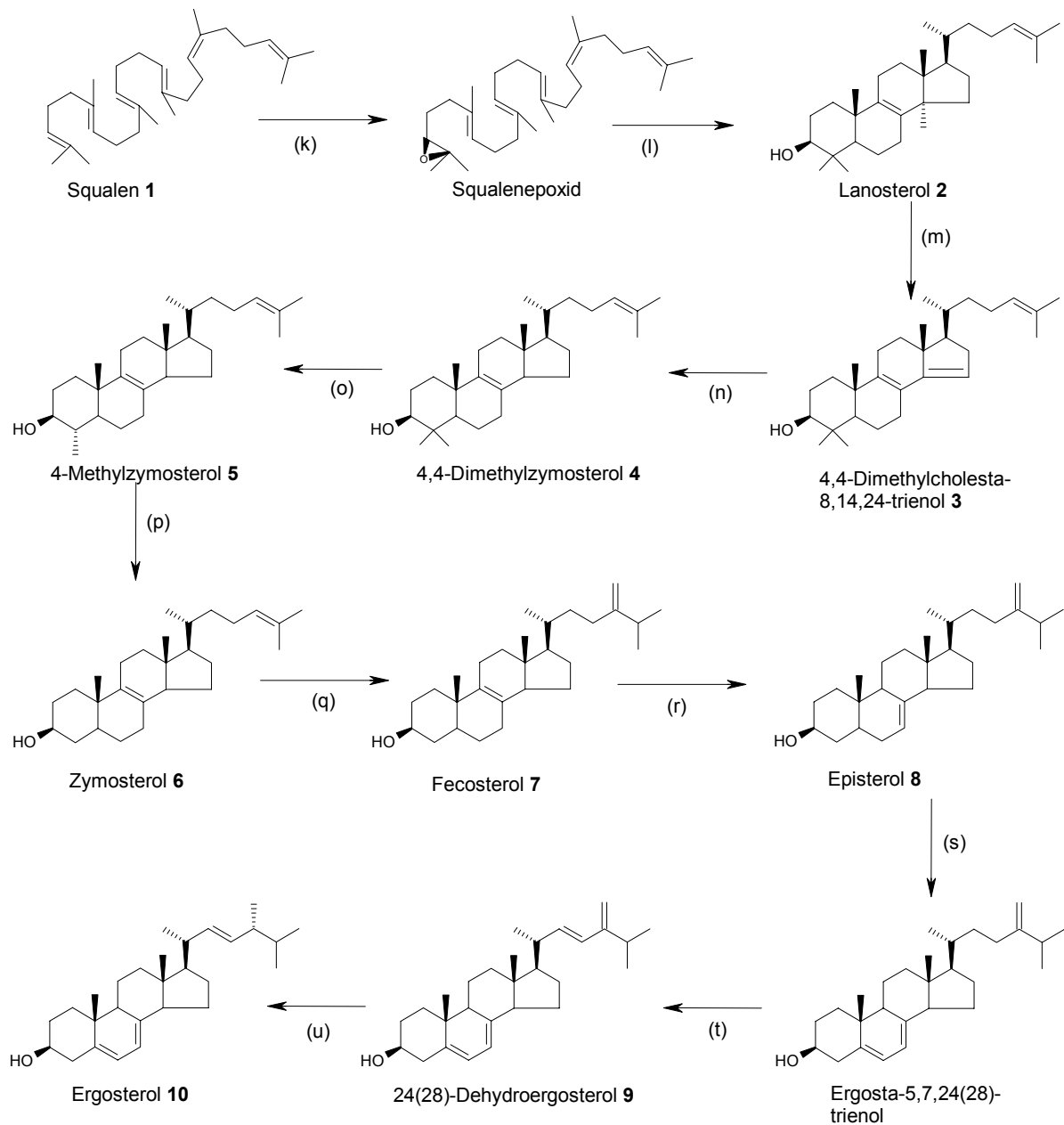
Zum besseren Verständnis der „Ortsangaben“ am Sterolgerüst sei nachfolgend Ergosterol entsprechend des Numerierungsvorschlages der IUPAC gezeigt, sowie die übliche Benennung der Ringe:



**Abbildung 5: Numerierung von Ergosterol**

Nachstehend ist die Ergosterolbiosynthese im Post-Squalen-Abschnitt dargestellt. Numerierte Substanzen konnten selbst isoliert bzw. identifiziert werden und sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit aufgeführt (Abbildung 6).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Biosynthesewege von Sterolen der meisten eukaryotischen Organismen zwar bekannt sind, es sich auf Grund der differierenden Angaben jedoch teilweise um Postulate handelt, für deren Richtigkeit noch keine ausreichenden Beweise vorliegen. Darüber hinaus ist zwar das Biosyntheseprinzip oftmals gleich, jedoch zeigen sich Unterschiede in den Details. Somit sollten die Mechanismen und vor allem die postulierten Reihenfolgen der Biosyntheseschritte nicht vorbehaltlos auf andere Organismen übertragen werden. Die hier gemachten Angaben beziehen sich, sofern nicht anders erwähnt, auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.



**Abbildung 6: Ergosterolbiosynthese ab Squalen**

Die nachfolgende Übersicht faßt die Reaktionsschritte und die beteiligten Enzyme zusammen:

	Reaktionsschritt	Enzym(-system)	EC-Nr. <sup>33</sup>	Codierendes Gen <sup>22</sup>
(k)	Oxidation von Squalen zu 2,3-Squalenepoxid	Squalenepoxidase	1.14.99.7	ERG1
(l)	Cyclisierung von Squalenepoxid zu Lanosterol	Squalenepoxidcyclase	5.4.99.7	ERG7
(m)	Demethylierung (C-14) von Lanosterol	CytochromP <sub>450</sub> -Sterol-C-14-Demethylase	1.14.99.X	ERG11
(n)	Reduktion der $\Delta^{14}$ -Doppelbindung zu Dimethylzymosterol	Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase	1.3.1.X	ERG24
		Sterol-C-4-Demethylase-Komplex		ERG25
(o)	Abspaltung der 4 $\alpha$ -Methylgruppe zu Methylzymosterol und Konversion von 4 $\beta$ -Methyl zu 4 $\alpha$ -Methyl	→ C-4-Methyl-Sterol-Mono-oxygenase	1.14.99.16	
		→ Sterol-C-4-Decarboxylase	1.14.99.X	
		→ 3-Keto-Sterol-Reduktase	1.1.1.X	
		Sterol-C-4-Demethylase-Komplex		ERG25
(p)	Abspaltung der 4 $\alpha$ -Methylgruppe zu Zymosterol	→ C-4-Methyl-Sterol-Mono-oxygenase	1.14.99.16	
		→ Sterol-C-4-Decarboxylase	1.14.99.X	
		→ 3-Keto-Sterol-Reduktase	1.1.1.X	
(q)	Methylierung an C-24 zu Fecosterol	C-24-Methyltransferase (SMT)	2.1.1.41	ERG6
(r)	Isomerisierung der $\Delta^8$ -Doppelbindung zu Episterol ( $\Delta^7$ )	$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase	5.3.3.X	ERG2
		„Sterol-C-5-Desaturase“		ERG3
(s)	Einführung der $\Delta^5$ -Doppelbindung zu Ergosta-5,7,24(28)-trienol	→ Sterol-C-6(5)-Hydroxylase	1.14.99.X	
		→ 6(5) $\alpha$ -Hydroxysterol-Dehydratase	4.2.1.62	
(t)	Einführung der $\Delta^{22}$ -Doppelbindung zu Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol (= 24(28)-Dehydroergosterol)	CytochromP <sub>450</sub> -Sterol-C-22-Desaturase	1.14.99.X	ERG5
(u)	Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung zu Ergosterol	$\Delta^{24(28)}$ -Reduktase	1.3.1.X	ERG4

**Tabelle 1: Übersicht über die an der Ergosterolbiosynthese beteiligten Enzyme**

### 1.2.2.1 Squalenepoxidase

Squalen (**1**) kann unter dem Einfluß von Enzymen in eine bestimmte Anordnung gezwungen werden. Erster Schritt ist dabei die durch Squalenepoxidase katalysierte Bildung von 2,3-Squalenepoxid (**k**). Die eigentliche Sterolbiosynthese beginnt so mit einer Vorstufe, in der vier Ringe in der Sessel-Wanne-Sessel-Wanne-Konformation vorfixiert sind (Abbildung 7).

Die Squalenepoxidase katalysiert die stereospezifische Epoxidierung der  $\Delta^2$ -Doppelbindung von *all trans*-Squalen (**1**) zu *all-trans*-(3S)-2,3-Squalenepoxid. Sie ist eine zellwandgebundene FAD-abhängige Mono-Oxygenase und benötigt daher Sauerstoff. Sie ist vergesellschaftet mit einer Reduktase, deren Aufgabe es ist, Reduktionsäquivalente auf die Epoxidase zu übertragen.<sup>6</sup>

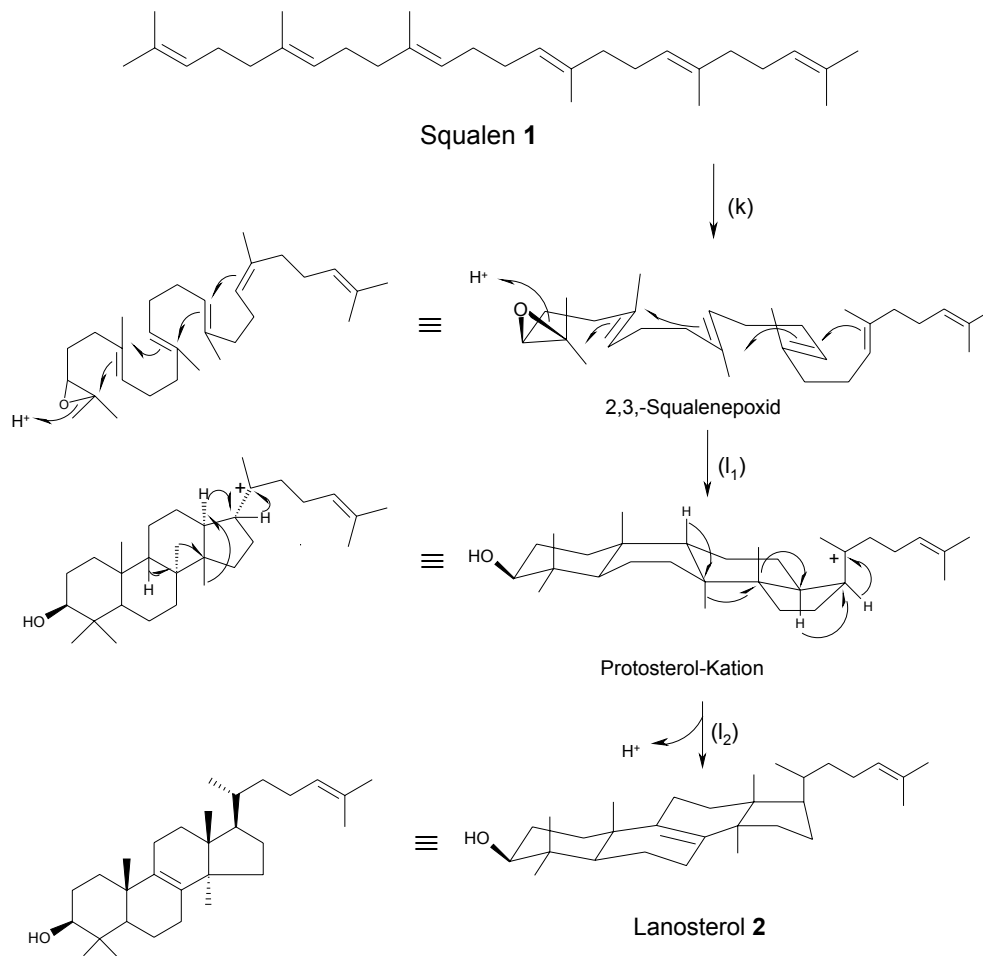
Unter strikt anaeroben Bedingungen ist keine Epoxidierung des Squalens möglich und der weitere Biosyntheseweg ist unterbrochen. Es kann kein Ergosterol gebildet werden, somit kommt es zur Fungistase. Gleichzeitig wirkt die Akkumulation von Squalen zusätzlich fungizid. Unter diesen Bedingungen wird *S. cerevisiae* in Kultur sterolauxotroph und nimmt Ergosterol oder dessen Precursoren aus dem Medium auf, während es unter aeroben Bedingungen strikt autotroph ist, also seine Sterole selbst synthetisiert, selbst wenn Ergosterol im Medium enthalten ist.<sup>23</sup>

### 1.2.2.2 Squalenepoxidcyclase

Die Squalenepoxidcyclase katalysiert die Umwandlung von 2,3-Squalenepoxid in einer Kettenreaktion zu Lanosterol (**2**), der gemeinsamen ersten cyclischen Sterol-Vorstufe sowohl von Tieren als auch Pilzen, während im Pflanzenreich letztendlich Cycloartenol, der Precursor von Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol entsteht. (vgl. Abbildung 1). Ab hier gabelt sich der Sterolbiosyntheseweg zwischen photosynthesefähigen und nicht-photosynthesefähigen Organismen.<sup>6</sup>

Die angesprochene Kettenreaktion verläuft in mehreren durch Protonen initiierten Cyclisierungen ( $I_1$ ). Das entstehende C-20 Protosterolkation durchläuft anschließend fünf *1,2-trans* Wagner-Meerwein-Umlagerungen, gefolgt von einer Stabilisierung durch Protonenabgabe ( $I_2$ ). Das gebildete Lanosterol (**2**) ist das letzte gemeinsame Sterol von Pilzen, Hefen und Säugetieren (Abbildung 7).





**Abbildung 7: Squalenepoxidierung und Cyclisierung zum Lanosterol**

### 1.2.2.3 CytochromP<sub>450</sub>-Sterol-C-14-Demethylase

Die C-14-Demethylierung von Lanosterol (**2**) läuft in vier Schritten ab, wovon die ersten drei Sauerstoff und NADPH benötigen. Im einzelnen sind dies: (m<sub>1</sub>) Oxidation der C-14 $\alpha$ -Methylgruppe zur Hydroxymethyl-Gruppe, (m<sub>2</sub>) Weiteroxidation zur Formyl-Gruppe, (m<sub>3</sub>) Weiteroxidation zur Formyloxy-Gruppe und (m<sub>4</sub>) Eliminierung der Formyloxy-Gruppe und des benachbarten 15 $\alpha$ -Protons in Form von Ameisensäure. Es entsteht 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**) (Abbildung 8).

Es ist bekannt, daß ein Cytochrom P-450-System, welches als CYP51A1 identifiziert wurde, in *S. cerevisiae* alle vier Schritte katalysiert.<sup>24</sup> Das Enzym ist membranständig und wird häufig als Cyt. P-450<sub>14DM</sub> abgekürzt. Da das Substrat nur bei Hefen Lanosterol ist, während es bei filamentösen Pilzen 24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol ist, differenziert man noch genauer: Cyt. P-450<sub>Lano14DM</sub> bzw. Cyt. P-450<sub>MeLano14DM</sub>.<sup>6</sup>

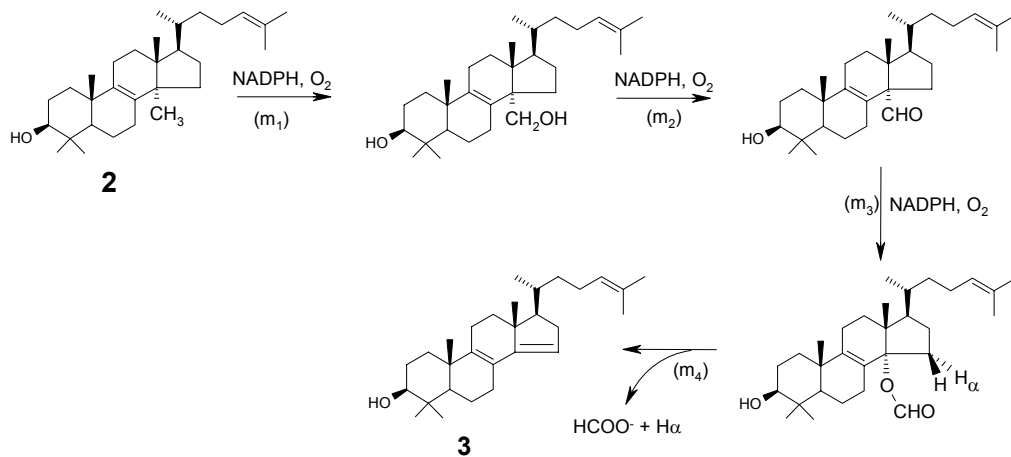


Abbildung 8: Mechanismus der C-14-Demethylierung von Lanosterol (2)

### 1.2.2.4 Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase

Diese membranständige Oxidoreduktase katalysiert die Reduktion der von der Cyt. P450<sub>Lano14DM</sub> eingeführten Doppelbindung. In Hefen ist das bevorzugte Substrat 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (3). Als Reduktionsmittel dient NADPH. Nach enzymvermittelter Protonenübertragung aus dem Wasser des Mediums an C-15 wird ein Hydridäquivalent auf das intermediär auftretende *High Energy Intermediate* (HEI) übertragen.

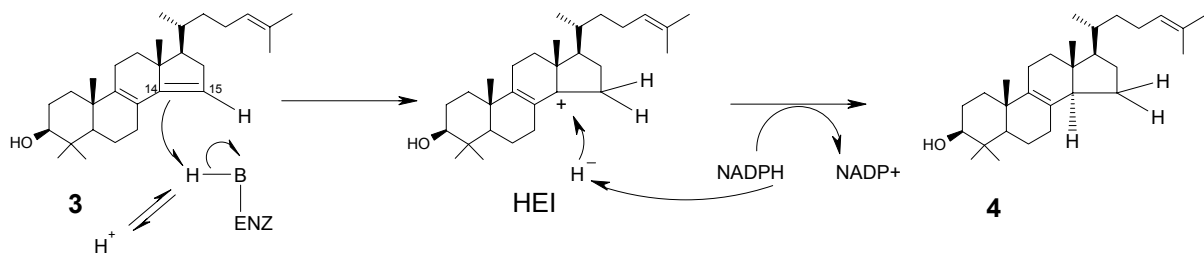


Abbildung 9: Mechanismus der Reduktion durch die Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase

### 1.2.2.5 Sterol-C-4-Demethylase-Komplex

Die Demethylierung von 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (3) wird von einem microsomalen Enzymkomplex katalysiert, der aus einer Mono-Oxygenase, einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Sterol-C-4-Decarboxylase und einer NADPH-abhängigen 3-Keto-Sterol-Reduktase besteht. Dieser Enzymkomplex katalysiert die schrittweise Oxidation der 4 $\alpha$ -Methylgruppe eines 4,4-Dimethylsterols oder 4-Methylsterols bis zur 4 $\alpha$ -Carboxylgruppe über die Zwischenstufen 4 $\alpha$ -Hydroxymethyl- bzw. 4 $\alpha$ -Formylgruppe. Es folgt eine oxidative Decarboxylierung unter gleichzeitiger Eliminierung des 3 $\alpha$ -Wasserstoffs als „H“ durch NAD<sup>+</sup>. Daran schließt sich eine nicht-enzymatische Tautomerisierung des entstandenen Enols zum 3-Keto-Sterol an. Im Falle der ersten Demethylierung orientiert sich die verbleibende 4 $\beta$ -Methylgruppe in die 4 $\alpha$ -Position um und ist damit für den nächsten Demethylierungsschritt richtig positioniert. Der letzte Schritt der Demethylierung ist die Reduktion der 3-Ketogruppe zur 3 $\beta$ -Hydroxygruppe, katalysiert durch die 3-Keto-Sterol-Reduktase. Es entstehen aus 4,4-Dimethylzymosterol (4) schrittweise (o<sub>1-7</sub>) 4-Methylzymosterol (5), und (p<sub>1-7</sub>) Zymosterol (6) (Abbildung 10).

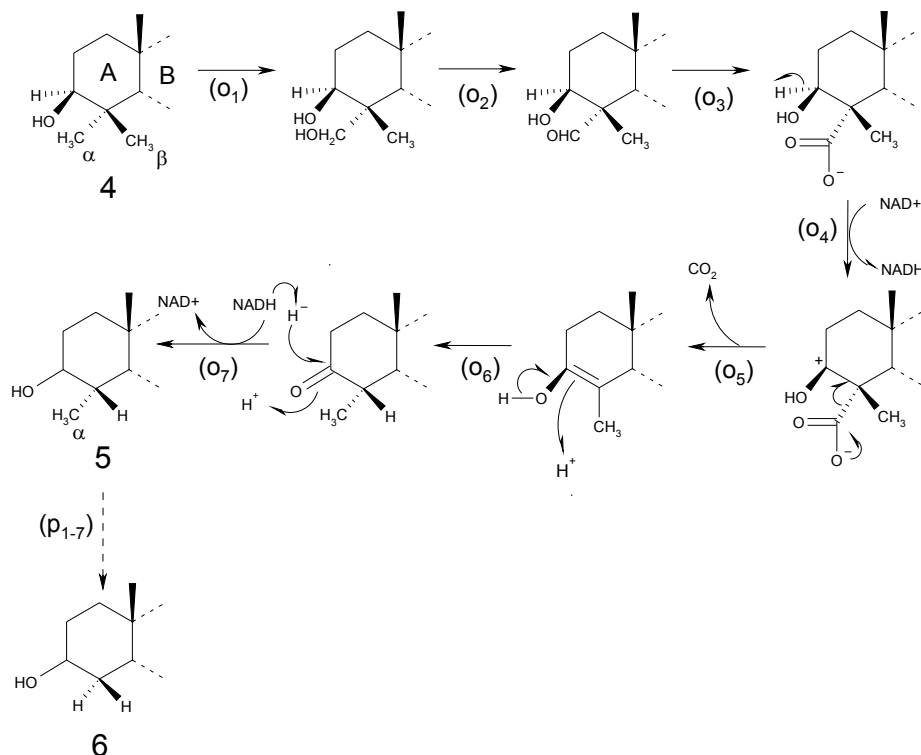
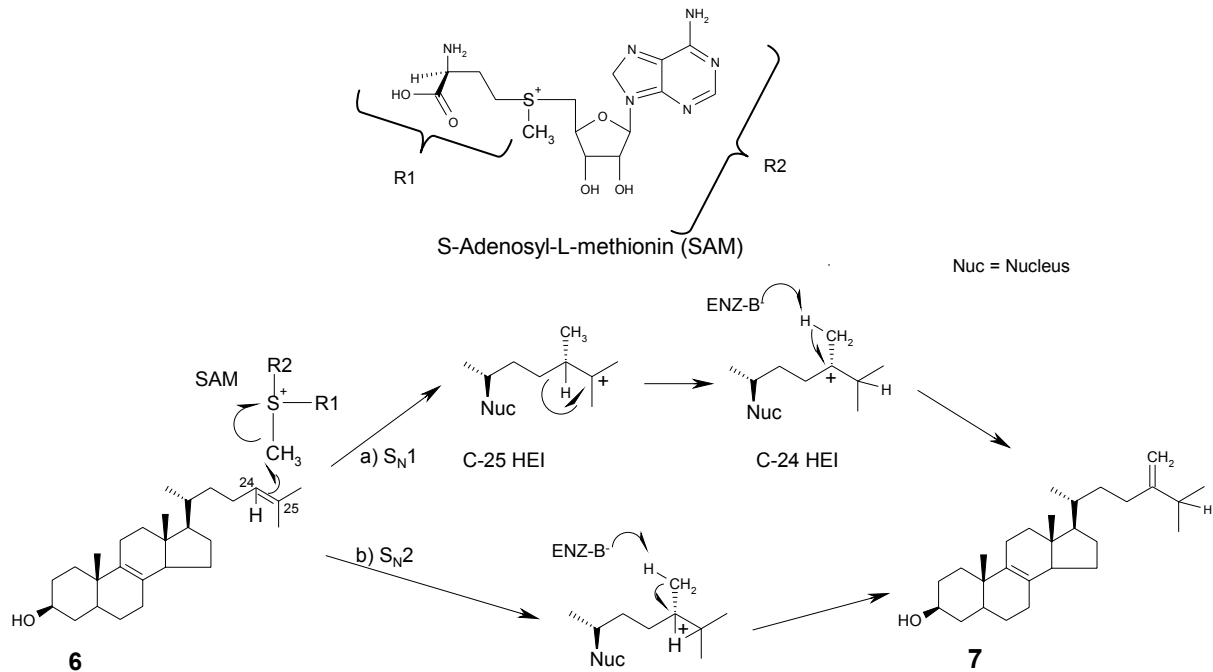


Abbildung 10: Mechanismus der Sterol-C-4-Demethylierung

### 1.2.2.6 C-24-Sterol-Methyltransferase (24-SMT)

Das bei Hefen bevorzugte Substrat der 24-SMT ist Zymosterol (**6**).<sup>25</sup> Damit unterscheidet sich hier der Ergosterolbiosyntheseweg von dem der Pilze, wo meist Lanosterol (**2**) als Substrat dient.<sup>6</sup> Im tierischen Organismus fehlt dieses Enzym, welches im Endoplasmatischen Reticulum, in Lipidtröpfchen und als integrales Membranprotein anzutreffen ist, völlig.<sup>26,27</sup>

Das methylübertragende Agens ist S-Adenosyl-L-methionin, welches unter Abspaltung von Triphosphat aus ATP und Methionin gebildet wird. Über den genauen enzymatischen Mechanismus besteht noch keine völlige Klarheit.<sup>27</sup> Beispielsweise ist noch nicht geklärt, ob die Methylierung in einem zweistufigen Prozeß (S<sub>N</sub>1) abläuft und dabei zwei carbokationische HEI's an C-25 bzw. C-24 erzeugt, oder ob nach einer konzertierten Additions-Umlagerungs-Aktion nur ein cyclischer Übergangszustand nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus existiert. Auch wird noch darüber debattiert, welche Auswirkungen damit für die räumliche Lage des Protonenakzeptors im Enzym einhergehen, oder ob es sogar zwei basische Stellen im aktiven Zentrum gibt, wobei die zweite Base das C-25-HEI durch intermediäre kovalente Bindung stabilisiert („X-group mechanism“), was den Weg a) untermauern würde. Eine ebenfalls diskutierte Überlegung ist das sogenannte *steric-electric plug model*<sup>28</sup>, nach welchem eine zweite Base die Verankerung des Zymosterols im Enzym-Substrat-Komplex durch H-Brückenbindungen mit der 3β-OH-Gruppe des Sterols unterstützt. In dieser Variante wird ein Methylierungsmechanismus nach b) favorisiert. (Abbildung 11)



**Abbildung 11: SAM und Sterol-C-24-Methyltransferase-katalysierte Methylierung**

Dieser Reaktionsschritt erzeugt das erste Sterol der „Ergostan-Reihe“, Fecosterol (**7**) (= *Ergosta-8,24(28)*-dienol). Im Unterschied zur „Lanostan-Reihe“ mit den Attributen Dimethylierung an C-4, sowie C-14-Methylierung und dem einzigen Vertreter Lanosterol **2** in dieser Biosynthese, sowie der „Cholestan-Reihe“, mit den Sterolen (**3**) – (**6**) (z.B. Zymosterol = *Cholesta-8,24*-dienol), weist die „Ergostan-Reihe“ eine C-24-Methylen- oder C-24 $\beta$ -Methylgruppe auf.

Im Vergleich dazu wird in der Pflanzenwelt, wo Cycloartenol (vgl. Abbildung 1) als Substrat der 24-SMT dient, nach Methylierung und Reduktion ein 24 $\alpha$ -Methylsterol erzeugt („Campestan-Reihe“).

In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß die Bezeichnungen „ $\alpha$ “ und „ $\beta$ “ als Angaben für die räumliche Orientierung im Nucleus (z.B. 3 $\beta$ -OH zeigt nach *vorne*) und der Seitenkette (z.B. 24 $\beta$ -CH<sub>3</sub> zeigt nach *hinten*) vertauscht sind! Diese eigenartige Regelung in der Benennung sollte deshalb auch mehr vor einem historischen, als einem logischen Hintergrund gesehen werden.<sup>27</sup>

### 1.2.2.7 $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase

Als membranständiges Enzym ist die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase zuständig für die Isomerisierung von Fecosterol (**7**) zu Episterol (**8**), sowohl bei Hefen als auch bei Pilzen. Es zeigen sich auch Ähnlichkeiten bei der Reaktionsfolge mit der bereits erwähnten  $\Delta^{14}$ -Reduktase und der im Pflanzenreich vorkommenden Cycloeucalenol-Obtusifolliol-Isomerase (COI), welche eine protonenkatalysierte 9 $\beta$ ,19-Cyclopropylring-Öffnung durchführt und das intermediäre C-9-HEI durch H<sup>+</sup>-Eliminierung am benachbarten C-8 in ein  $\Delta^8$ -Sterol überführt.<sup>6</sup>

Während der Isomerisierung von Fecosterol (**7**) wird – in Analogie zur  $\Delta^{14}$ -Reduktase- und zur COI-vermittelten Umsetzung - in einem ersten Schritt zunächst protoniert, und zwar an C-9 (r<sub>1</sub>), wobei ein enzymstabilisiertes carbokationisches C-8-HEI gebildet wird. Dieses stabilisiert sich durch 7 $\alpha$ -H<sup>+</sup>-Eliminierung zu Episterol (**8**) (r<sub>2</sub>) (Abbildung 12).

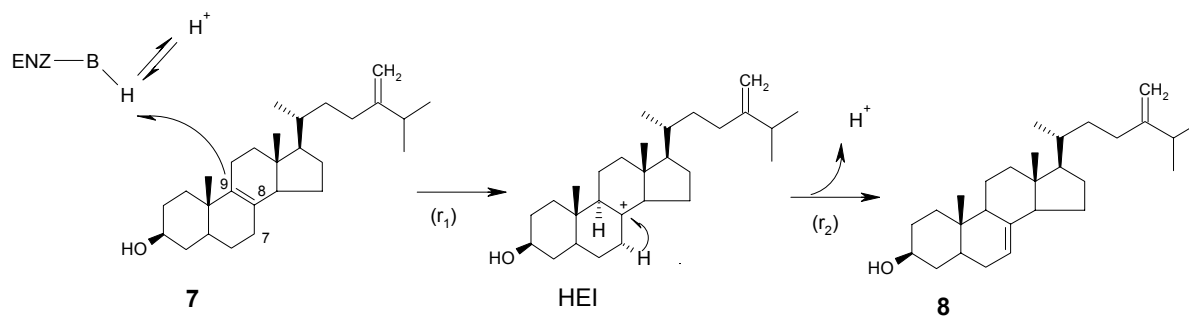


Abbildung 12:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion

### 1.2.2.8 Sterol-C-5-Desaturase

Die Einführung einer  $\Delta^5$ -Doppelbindung erfolgt üblicherweise an  $\Delta^7$ -Sterolen. Das Substrat dieses membranständigen Multienzymkomplexes ist daher Episterol (**8**). In der Hefe vollzieht sich die Desaturierung in einem zweistufigen Prozeß. Zunächst wird an C-6 oder C-5 hydroxyliert. Die Reaktion wird von der Sterol-C-6(5)-Hydroxylase, einer NADPH-Cytochrom  $b_5$ -abhängigen Monooxygenase katalysiert ( $s_1$ ). Das resultierende  $3\beta,6\alpha$ -Diol konnte in Inhibitionsversuchen mit *S. cerevisiae* und *Ustilago maydis* nachgewiesen werden<sup>29</sup> und in Fütterungsversuchen mit Ergosta-7,24(28)-dien- $3\beta,5\alpha$ -diol konnte die Umsetzung zu Ergosterol belegt werden.<sup>30</sup> Dieser Sauerstoff verbrauchende erste Reaktionsschritt benötigt aerobe Bedingungen.

In einem zweiten Schritt erfolgt die Dehydratisierung zur  $\Delta^5$ -Doppelbindung durch die  $6(5)\alpha$ -Hydroxysterol-Dehydratase ( $s_2$ ). Mit Episterol (**8**) als Substrat entsteht Ergosta-5,7,24(28)-triolenol (Abbildung 13).

Wie schon erwähnt (s. Seite 4) ist eine der strukturellen Grundvoraussetzungen für die „sparking“-Aktivität die Existenz einer  $\Delta^5$ -Doppelbindung im Sterolgerüst. Daher kommt diesem Schritt in der Ergosterolbiosynthese eine besondere Bedeutung zu. Erwähnenswert ist auch, daß der Mechanismus von dem der ebenfalls bei Säugetieren vorkommenden Sterol-C-5-Desaturase verschieden sein muß. In entsprechenden Versuchen an Rattenleberextrakten konnten keine diolischen Sterole gefunden werden – dort wird ein einstufiger Prozeß vermutet.<sup>6</sup>

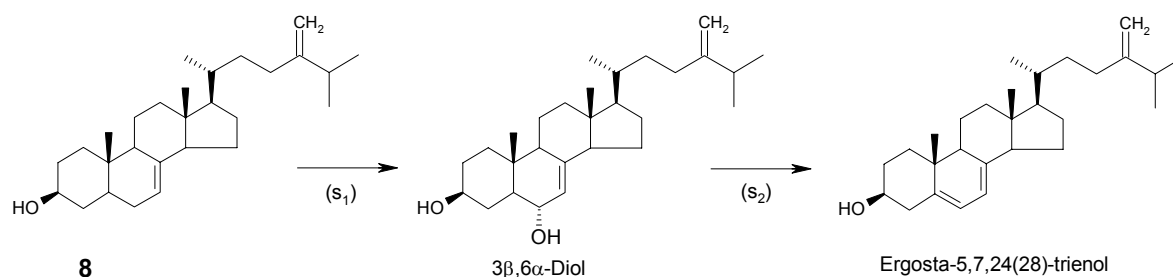


Abbildung 13: Sterol-C-5-Desaturase-Reaktion

### 1.2.2.9 Cytochrom $P_{450}$ -Sterol-C-22-Desaturase

Die Cytochrom  $P_{450}$ -Sterol-C-22-Desaturase ist eine Oxidoreduktase und führt die zweite Doppelbindung der Seitenkette in Konjugation zur  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung ein ((t) in Abbildung 6).

Reaktionsprodukt ist das Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol (**9**). Dabei werden Sauerstoff und NADPH verbraucht. Über den Reaktionsmechanismus ist nur wenig bekannt. Das Enzym konnte in den Microsomen lokalisiert werden.<sup>31</sup>

### 1.2.2.10 $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Der finale Schritt in der Biosynthese von Ergosterol (**10**) ist die Reduktion der  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung ( $u_{1+2}$ ). Da bei Säugetieren keine C-24-Methylierung stattfindet, kommt dieses Enzym nur bei Pilzen und Pflanzen vor.

Diese Oxidoreduktase wurde im Endoplasmatischen Reticulum und der Microsomenfraktion gefunden. Die stereoselektive Reduktion zum Ergosterol erfolgt unter Verbrauch von NADPH und erzeugt eine 24 $\beta$ -Methylgruppe (Abbildung 14).

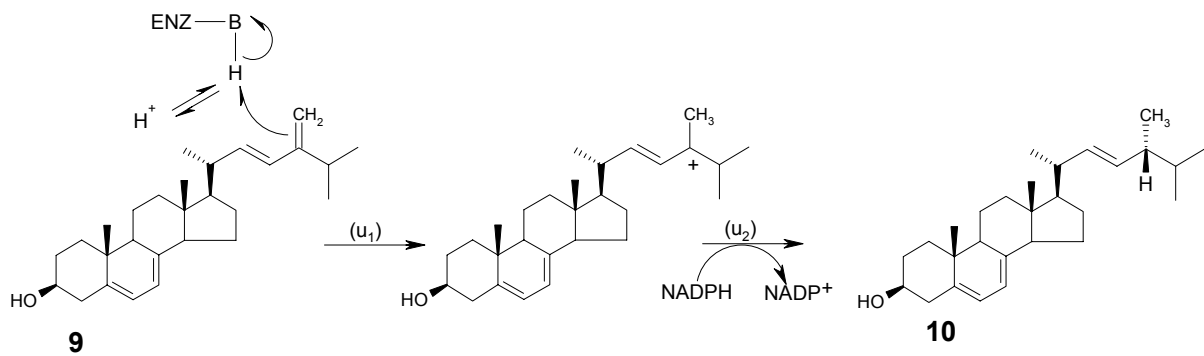
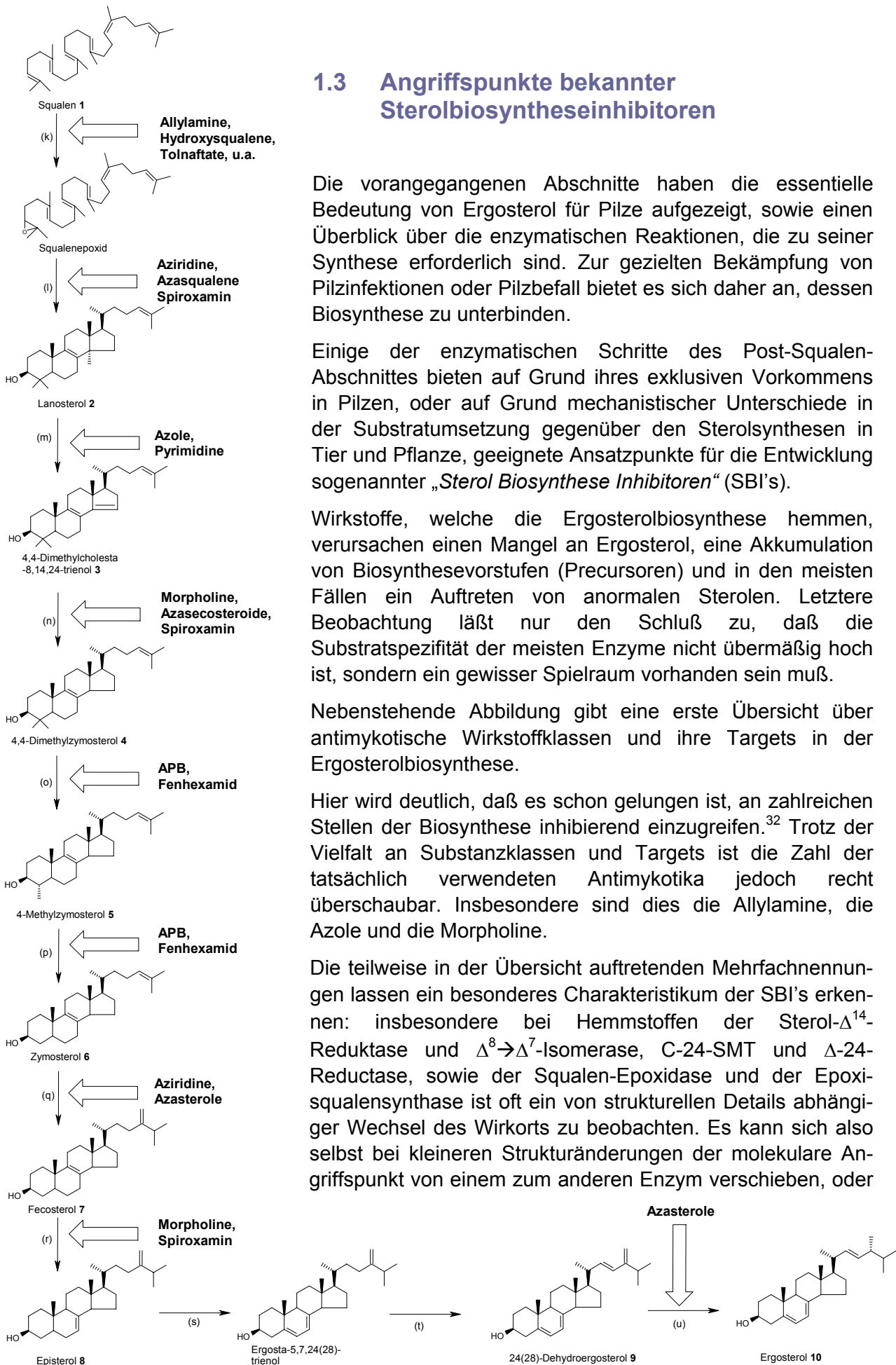


Abbildung 14:  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Reaktion



**Abbildung 15: Angriffspunkte von Sterolbiosynthese-Inhibitoren (SBI's)**

Dieses Buch ist erhältlich im Verlag Dr. Hut, München, [www.dr.hut-verlag.de](http://www.dr.hut-verlag.de) (ISBN 3-934767-59-1)

sich gar auf zwei Enzyme gleichzeitig erstrecken, was angesichts der relativen Ähnlichkeit der Sterole, die als Substrate der Enzyme der Ergosterolbiosynthese dienen, auch verständlich ist.<sup>33</sup>

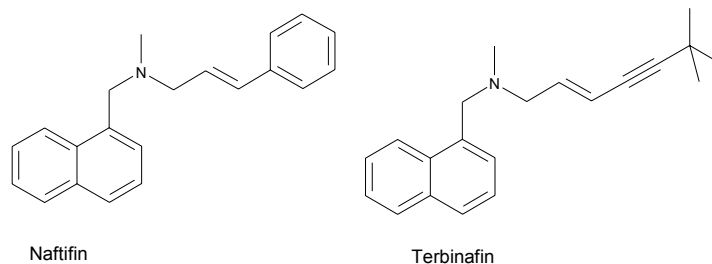
Nachfolgend werden die in Abbildung 15 genannten Wirkstoffklassen genauer beleuchtet, Vertreter daraus vorgestellt, sowie ihr Einfluß auf die von ihnen inhibierten Enzyme („*Mode of action*“) und die dabei auftretenden Veränderungen im Sterolmuster diskutiert.

### 1.3.1 Allylamine und weitere Inhibitoren der Squalenepoxidase

Die Allylamine mit ihren bekanntesten Vertretern *Terbinafin* und *Naftifin* sind als Inhibitoren der Squalenepoxidase (vgl. 1.2.2.1) bekannt (Abbildung 16).

Als solche greifen sie an der frühesten Position des Post-Squalen-Abschnittes in die Sterolbiosynthese ein, verhindern die Bildung des „Ur-Sterols“ Lanosterol und bewirken eine Akkumulation von Squalen. Der letztendlich resultierende Mangel an Ergosterol erklärt ihre fungistatische Wirkung, die vor allem bei Dermatophyten und schwächer bei Hefen ausgeprägt ist. In höheren Dosierungen ist ein fungizider Effekt zu beobachten, da große Mengen an toxischem Squalen anfallen.<sup>34</sup>

Obwohl die Squalenepoxidierung auch bei der Cholesterol-Biosynthese bei Säugern abläuft, wirken die Allylamine recht selektiv gegen Pilze. Terbinafin hemmt die Squalenepoxidase der Säugerzelle erst in der 10.000-fachen höheren Konzentration als die von Pilzen. Bei Naftifin ist die Selektivität nicht ganz so stark ausgeprägt.<sup>35</sup>



**Abbildung 16: Allylamine**

Da Allylamine offensichtlich keine Substratanaloga des Squalens darstellen, wird als ein möglicher Wirkungsmechanismus der Allylamine eine Interaktion mit der Bindungsseite zum Flavin-Cofaktor oder mit einer Lipid-bindenden Domäne der Squalenepoxidase diskutiert, die zu einer Konformationsänderung und damit zu einer reversiblen, nicht-kompetitiven Blockade des Enzyms führen soll.<sup>36</sup>

Weitere Squalenepoxidasehemmer, wie die Hydroxysqualene<sup>6</sup> und Squalenoide, sowie die Thiocarbamate (z.B. Tolnaftat) oder das Benzothiophen SDZ 87-469 mit einer 8-16fach besseren Wirksamkeit als Terbinafin sind entweder „research tools“ geblieben oder inzwischen als Wirkstoffe obsolet<sup>35, 37</sup> (Abbildung 17).



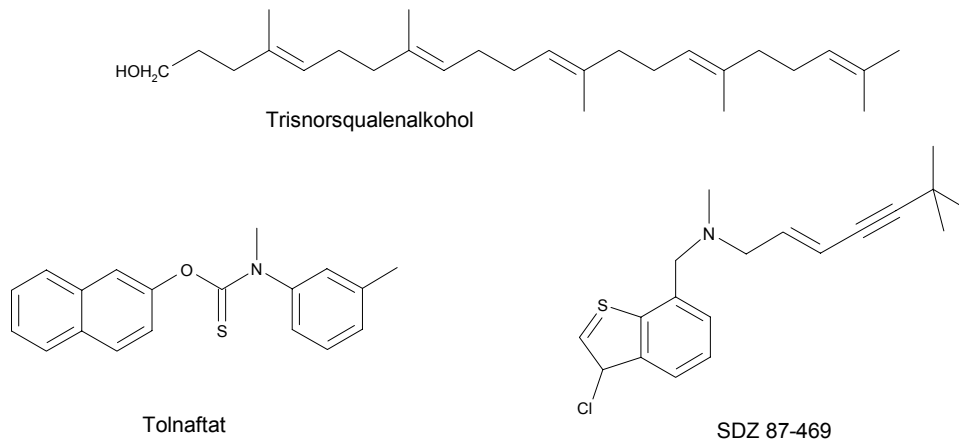


Abbildung 17: Weitere Inhibitoren der Squalenepoxidase

### 1.3.2 Aziridine und Azasqualenoide

Squalenepoxidcyclase-Inhibitoren (vgl. 1.2.2.2) wie 2,3-Dihydro-2,3-epiminosqualen oder das 2-Aza-2,3-dihydrosqualen-N-oxid, sind seit langem als potente Substanzen bekannt – allerdings wirken sie nicht spezifisch auf Pilze und werden daher nur vollständigheitshalber erwähnt<sup>6,32</sup> (Abbildung 18).

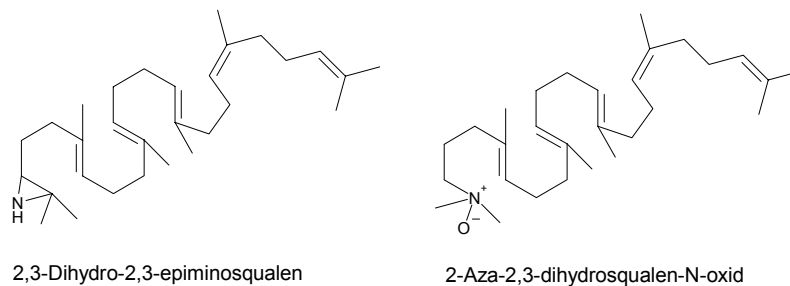


Abbildung 18: Inhibitoren der Squalenepoxidcyclase

### 1.3.3 Azole und weitere Inhibitoren der Cyt. P-450<sub>14DM</sub>

Die große Gruppe der Azole stellt zahlenmäßig die meisten Vertreter der auf dem Markt befindlichen antimykotischen Wirkstoffe.<sup>35</sup> Der Überbegriff „Azole“ vereint die Stoffklassen der Imidazole und Triazole. Derzeit sind 14 Vertreter der Azol-Antimykotika auf dem Markt. Darunter sind die Stoffe Clotrimazol, Ketoconazol oder Fluconazol, welche als „Referenzantimykotika“ in dem in Kapitel 4 beschriebenen Assay zum Einsatz kommen.

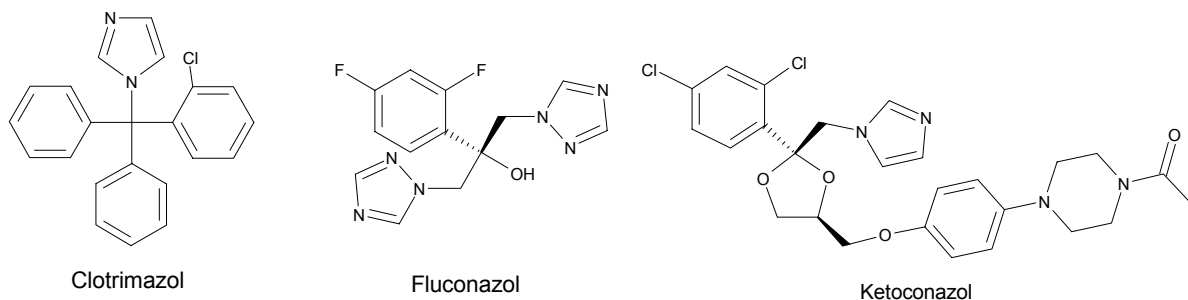


Abbildung 19: Imidazol- und Triazol-Antimykotika

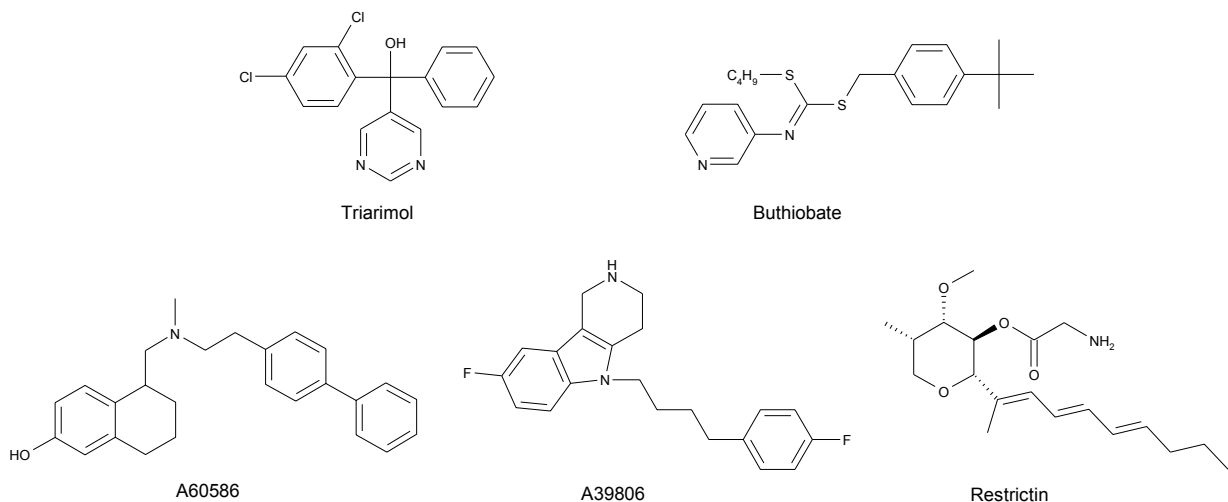
Die fungistatische, in hohen Dosen auch fungizide Wirkung der Azole kommt zustande durch die hohe Affinität des Stickstoff-Heterocyclus zum Häm-Eisen von Cytochrom P450

(CYP51A1). Da dieses essentiell für die Funktion der C-14-Demethylase ist (vgl. 1.2.2.3), bewirkt eine Inhibierung der Ergosterolbiosynthese auf dieser Stufe eine Akkumulation von Lanosterol und ein Auftreten von anormalen 14-Methylsterolen, wie z.B. 14-Methylfecosterol oder 4,14-Dimethylzymosterol bei *S. cerevisiae*. Nachdem in Folge einer Inkubation mit Azol-Antimykotika keine an C-14 oxidierten Sterole gefunden werden, spricht dies dafür, daß die Inhibierung bereits den ersten Oxidationsschritt zum 14-Hydroxysterol betrifft (vgl. Abbildung 8, Rkt. (m<sub>1</sub>)).<sup>37</sup>

In der Literatur werden diese „demethylation-inhibiting fungicides“ auch *DMI's* genannt. Die Wechselwirkungen des Stickstoff-Heterocyclus mit dem Häm-Eisen sind gepaart mit Interaktionen der lipophilen Teilstrukturen des Wirkstoffes mit der lipophilen Tasche des Enzyms.<sup>6</sup> Nur so ist zu erklären, warum es Unterschiede in der Inhibitionsintensität gegenüber Pilzen verglichen mit Pflanzen oder Säugetieren gibt, welche dieses Enzym ebenfalls besitzen.

Neben den Triazolonen und Imidazolonen sind auch Pyridine und Pyrimidine als *DMI's* beschrieben worden.<sup>38, 39</sup> Nur wenige Substanzen sind bisher bekannt, die einen nicht-aromatischen Stickstoff tragen und die Cyt. P-450<sub>14DM</sub> inhibieren.<sup>6,40</sup> Nachfolgend sind Vertreter der genannten Gruppen gezeigt (Abbildung 20).

Auffällig ist die Struktur des Tetrahydronaphtalins A60586. Obwohl es große Ähnlichkeit zu den Allylaminen hat, handelt es sich nicht um einen Squalenepoxidase-Inhibitor, was im Einklang mit der Ansicht steht, daß die allylständige Doppelbindung dafür notwendig ist. A60586 und A39806 wurden erfolgreich an Fluconazol-resistenten Stämmen von *Candida albicans*, sowie an *Aspergillus niger* getestet. Der erste natürliche CYP51A1-Inhibitor konnte aus *Aspergillus* und *Penicillium*-Arten isoliert werden und trägt den Namen Restrictin, allerdings hatten Ausweitungen der Untersuchungen um diese Leitstruktur einen voläuigen Rückschlag erlitten, da sich die Synthese des Restrictins als zu aufwendig herausgestellt hatte.<sup>37</sup>



**Abbildung 20: Nicht-Azol *DMI's***

Bislang sind Versuche gescheitert, das Enzymsystem zu kristallisieren und seine räumliche Struktur zu analysieren, um schließlich optimale Inhibitoren per Molecular Modelling zu finden. Seine Natur als membranständiges Protein hat bislang verhindert, daß das Enzym isoliert und kristallisiert werden konnte, ohne dabei seine tatsächliche Tertiärstruktur einzubüßen.<sup>37</sup> Allerdings konnten CYP51A1-Fractionen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* angereichert werden und Ji et al. konnten 2000 über ein computergeneriertes 3D-Modell der Cyt. P-450<sub>14DM</sub> von *C. albicans* berichten, welches sie unter Berücksichtigung der veränderten Primärstruktur auf der Basis von vier prokaryotischen Cytochrom-P450-haltigen Enzymen abge-

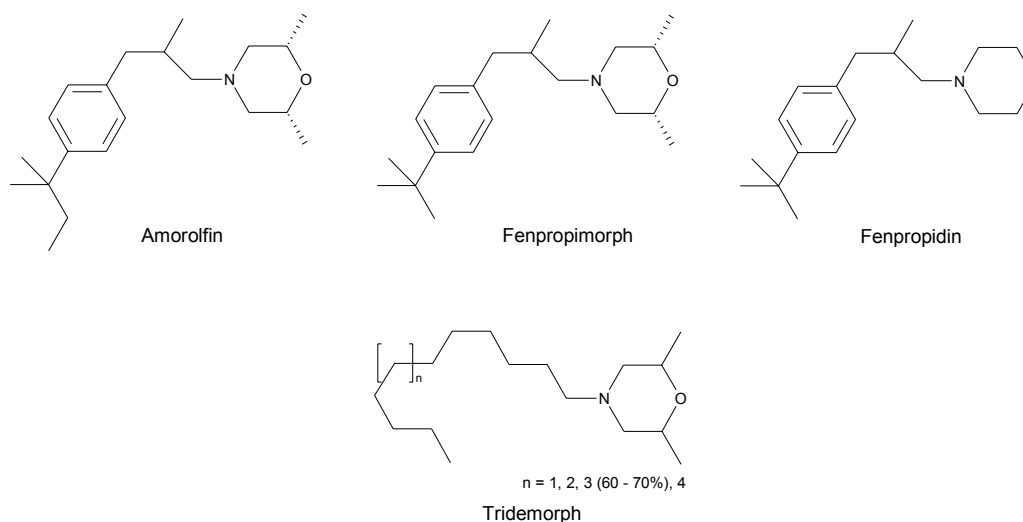
leitet hatten, welche als nicht-membranständig durch Röntgenstrukturanalyse in ihrer Struktur bekannt waren.<sup>41</sup>

### 1.3.4 Morpholine

Die Morpholine sind neben den Allylaminen und den Azolen die dritte pharmazeutisch relevante Stoffklasse, welche inhibierend in die Ergosterolbiosynthese eingreift. Dabei ist Amorolfin derzeit das einzige medizinisch genutzte Antimykotikum, während eine Vielzahl anderer Morpholine, wie Fenpropidin, Fenpropimorph oder Tridemorph in der Landwirtschaft gegen den echten Mehltau oder in Kombination mit Azol-Fungiziden gegen Braunrost, Zwergrost oder andere Pflanzenpathogene eingesetzt werden (Abbildung 21).<sup>42</sup>

Die Bezeichnung „Morpholine“ ist streng genommen nicht für alle dieser Klasse zugeordneten Wirkstoffe zutreffend: das bereits erwähnte Fenpropidin enthält an Stelle des Morpholinringes einen Piperidinring, ist ansonsten aber strukturell mit dem „echten“ Morpholin Fenpropimorph identisch und dem Amorolfin nahe verwandt. Diese drei Wirkstoffe werden zu der Untergruppe der 3-Phenylpropylamin-Fungizide gerechnet.

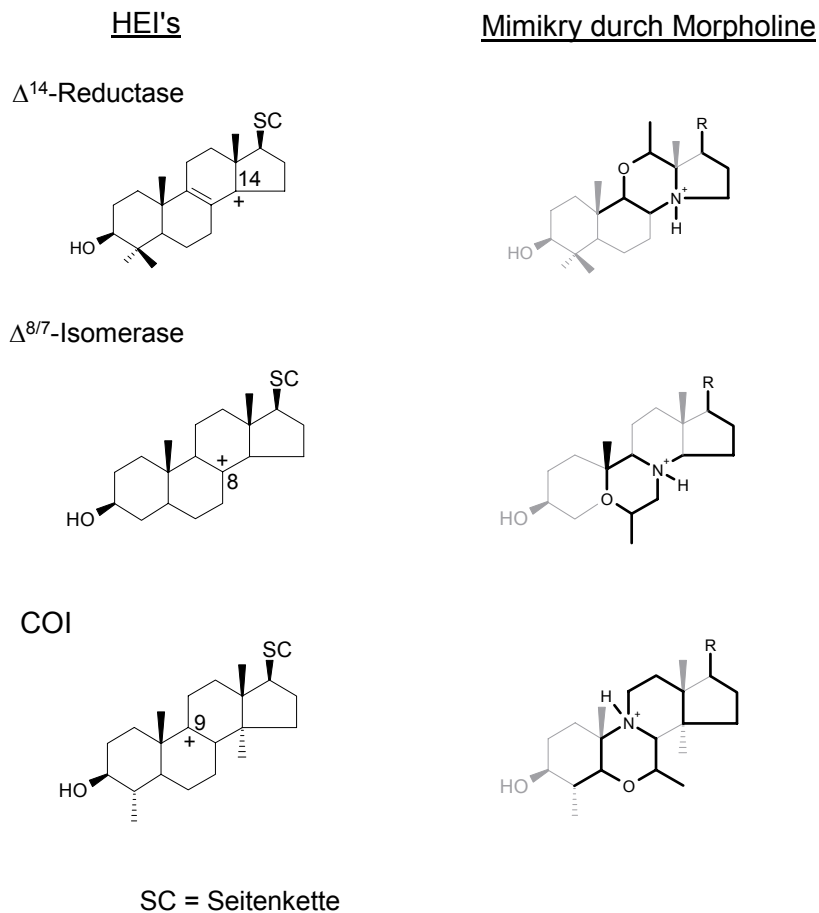
Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß bislang nicht herausgefunden werden konnte, warum sich die Wirkungsbereiche von Amorolfin und Fenpropimorph trotz *fast* identischer Struktur so deutlich unterscheiden. Während Amorolfin besser wirksam gegen humanpathogene als gegen pflanzenpathogene Pilze ist, verhält es sich bei Fenpropimorph genau umgekehrt.<sup>37</sup>



**Abbildung 21: Morpholin-Antimykotika**

Die Besonderheit der Morpholin-Antimykotika liegt im Wirkmechanismus begründet. Wie bereits erwähnt, postuliert man bei den Reaktionen der Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase,  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und der im Pflanzenreich vorkommenden Cycloeucaleenol-Obtusifoliol-Isomerase (COI) carbokationische Übergangszustände, die *High-Energy-Intermediates* (vgl. 1.2.2.4 und 1.2.2.7). Betrachtet man diese C-8-, C-9- und C-14-HEI's, so ist festzustellen, daß die auftretenden positiven Ladungen alle in benachbarten Bereichen auftreten, nämlich entlang des Ringes C des Sterolgrundkörpers.

Morpholin-Antimykotika sind unter physiologischen Bedingungen am Stickstoff protoniert und damit sowohl strukturell als auch elektronisch in der Lage, die genannten HEI's zu imitieren (Mimikry) (Abbildung 22).<sup>42</sup>



**Abbildung 22: Strukturelle und elektronische Mimikry der HEI's durch Morpholin-Antimykotika**

Potentiell sind die Morpholine damit in der Lage, an mehreren enzymatischen Reaktionen als Inhibitoren zu wirken. Nachdem die COI ein Enzym der Phytosterolsynthese ist, bleiben noch zwei Positionen in der Ergosterolbiosynthese, die durch Morpholine inhibiert werden können, namentlich die Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase und die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase. Tatsächlich aber gibt es auch innerhalb der Morpholin-Antimykotika Präferenzen bezüglich der Affinitäten zu den genannten Enzymen.

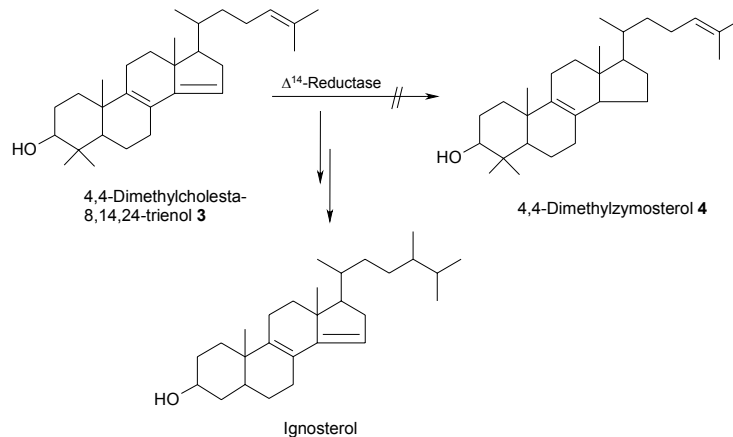
Amorolfin und Fenpropimorph verursachen nach Inhibierungsversuchen in Hefen und Pilzen sowohl eine Akkumulation von  $\Delta^8$ -Sterolen, als auch von  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen, was den Schluß zuläßt, daß sowohl die Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase als auch die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase inhibiert werden. Enzymassays bestätigten die Vermutung, daß der primäre Wirkort von Fenpropimorph die Isomerase ( $IC_{50} = 0,013 \mu\text{M}$ , zellfreier Extrakt von *S. cerevisiae*) ist und erst bei höherer Dosierung auch die Reduktase ( $IC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$ , dto.) inhibiert wird. Die Ergebnisse führten auch zu dem Schluß, daß der fungistatische Effekt von Fenpropimorph hauptsächlich auf der Verminderung an Ergosterol und weniger auf der Akkumulation von  $\Delta^8$ -oder  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen beruht.<sup>43</sup>

Bei Tridemorph wurde eine sehr viel stärkere Inhibitionswirkung auf die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase gefunden ( $IC_{50\text{-Isomerase}} = 0,033 \mu\text{M}$  vs.  $IC_{50\text{-Reduktase}} = 98,0 \mu\text{M}$ , zellfreier Extrakt von *S. cerevisiae*), was durch das vermehrte Auffinden von  $\Delta^8$ -Sterolen bei Inhibierungsversuchen belegt wurde.<sup>43</sup>

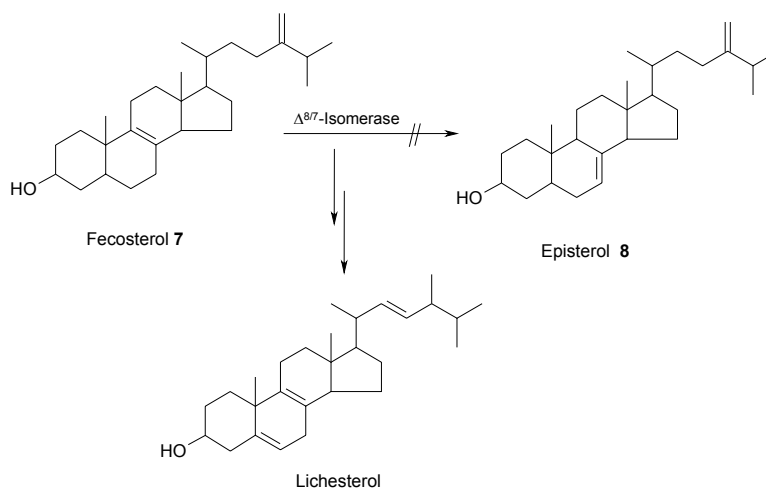
Fenpropidin zeigt ähnliche Präferenzen wie Fenpropimorph, jedoch war der Anteil an gefundenen  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen im Allgemeinen deutlich höher. Auch hier konnten Assays am zellfreien Extrakt von *S. cerevisiae* belegen, daß eine vergleichsweise bessere Inhibitionswirkung an der Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase vorliegt ( $IC_{50\text{-Isomerase}} = 0,30 \mu\text{M}$  vs.  $IC_{50\text{-Reduktase}} = 1,8 \mu\text{M}$ ).<sup>43</sup>

Die genannten Beobachtungen wurden auch an anderen Organismen wie *Ustilago maydis*<sup>♦</sup>, *Nectria haematococca*<sup>♦</sup>, *Botrytis cinerea*<sup>♦</sup> oder *Candida albicans* gemacht, wobei es graduelle Unterschiede im Inhibitionsverhalten der genannten Wirkstoffe zwischen den untersuchten Spezies gab.<sup>44, 45</sup> Generalisiert jedoch gelten die oben gemachten Angaben.

Die auf Grund von Morpholin-Inhibition in Hefen gefundenen Sterole sind im Wesentlichen Fecosterol (**7**), Lichesterol und Ignosterol (Abbildung 23 und Abbildung 24), sowie einige andere mehr. Die beiden Letztgenannten sind sogenannte anormale Sterole, da sie keine Ergosterol-Precursoren darstellen, sondern in Folge einer (durch Ausfall eines oder mehrerer enzymatischer Schritte) unvollständigen Biosynthese aufgebaut werden.



**Abbildung 23: Bildung von Ignosterol nach Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibition**



**Abbildung 24: Bildung von Lichesterol nach  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibition**

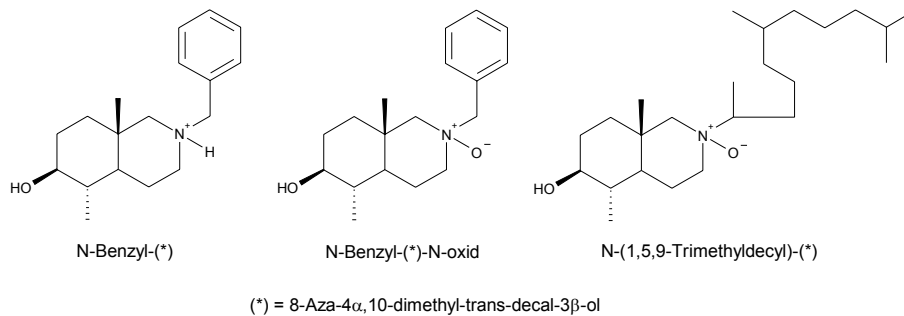
### 1.3.5 Weitere Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase

Neben der großen Gruppe der Morpholine sind auch weitere Stoffklassen gefunden worden, welche dieselben Zielenzyme hemmen.

Basierend auf dem postulierten Wirkungsmechanismus der Mimikry der High Energy Intermediates hat die Gruppe um Benveniste eine Reihe von Substanzen synthetisiert, welche sich vom 8-Aza-4 $\alpha$ ,10-dimethyl-*trans*-decal-3 $\beta$ -ol (in Analogie zur Sterolnummerierung) ableiten.<sup>46, 47</sup> Diese imitieren die Ringe A und B des Sterolgrundgerüsts und tragen bei physiologischem pH eine positive Ladung am Stickstoffatom der „C-8-Position“ des Sterolgerüsts. Weiterhin besitzen diese Substanzen relativ große N-Substituenten, welche derart positioniert sind, daß sie die Ringe C und D, sowie die Seitenkette mehr oder weniger imitieren. In Inhibi-

♦ Phytopathogene Pilze

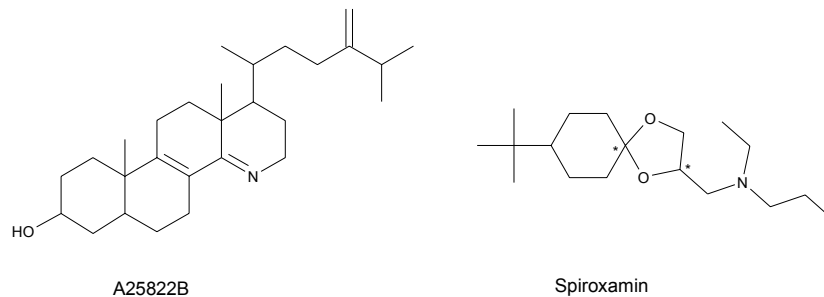
tionsversuchen an Mais-Embryonen konnten einige davon als potente  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase- bzw. Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase- bzw. COI-Inhibitoren charakterisiert werden (*v.l.n.r. in dieser Reihenfolge*, Abbildung 25).



**Abbildung 25: Azasecosteroide von Benveniste et al**

Die Erkenntnisse von *Benveniste* sind im Kontext zu dieser Arbeit von besonderem Interesse, denn viele der (mit dem später beschriebenen eigenen Testsystem) untersuchten Substanzen unserer Arbeitsgruppe verfolgten einen komplementären Weg: „Belassen“ der Ringe C und D, sowie der Seitenkette unter Einführung eines Stickstoffes an der „C-8-Position“ und Imitieren der Ringe A und B durch geeignete Substituenten am Bicyclus.

Das 15-Azasterol A25822B wurde als Substratanalogon von Ergosta-8,14,24(28)-trienol erfolgreich als Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor an *S. cerevisiae* getestet (Abbildung 26).<sup>6</sup>



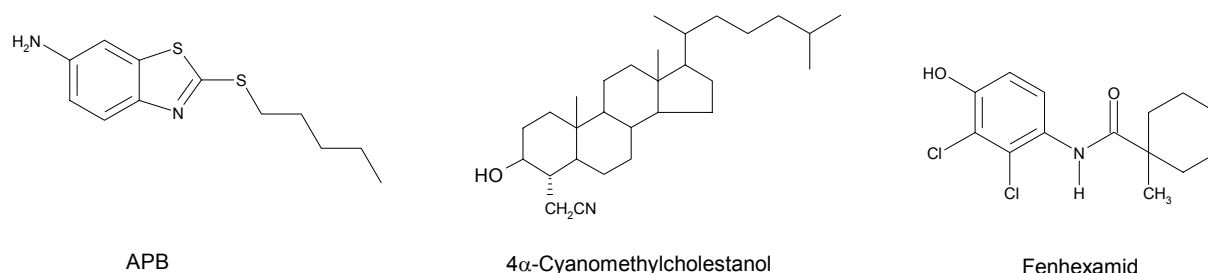
**Abbildung 26: A-25822B und Spiroxamin**

Wie bereits erwähnt, sind minimale Strukturänderungen manchmal mit Änderungen des molekularen Angriffspunkts in der Ergosterolbiosynthese verbunden. Das von der Firma BAYER für den landwirtschaftlichen Einsatz entwickelte Spiroxamin ist in dieser Hinsicht ein „Wunderkind“. In Folge des Vorhandenseins von zwei Stereozentren wurde jedes der vier Stereoisomere auf seine antimykotische Aktivität hin untersucht. Jedes der Isomere wurde vorwiegend als Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor an den Stämmen *Pyricularia oryzae*, *Yarrowia lipolytica* und *Ustilago avenae* charakterisiert. Allerdings waren zwei Isomere zusätzlich Inhibitoren der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase, das dritte inhibierte außerdem die Squalenepoxidase und das vierte die Squalenepoxidcyclase (Abbildung 26).<sup>33</sup>

### 1.3.6 Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes

Da bereits darauf hingewiesen wurde, daß C-4-methylierte Sterole zur Erfüllung der „bulk“-Funktion in der Zellmembran nicht geeignet sind (s. Seite 4), scheint eine Akkumulation solcher Sterole durch Inhibierung der C-4-Demethylase im Zusammenspiel mit einem einhergehenden Ergosterolmangel eine durchaus erfolgversprechende Möglichkeit bei der Suche nach neuen Angriffspunkten in der Ergosterolbiosynthese zu sein (vgl. 1.2.2.5). Dieser Ansatz

hat bislang nur wenig Resultate folgen lassen. In der Tat sind derzeit nur wenige Substanzen bekannt, welche als Inhibitoren der C-4-Demethylase identifiziert sind: 6-Amino-2-n-pentylthiobenzothiazol (APB), eine Reihe von 4 $\alpha$ -Derivaten des Cholestanols, sowie das als 3-Keto-Reduktase-Inhibitor proklamierte Fenhexamid (Abbildung 27).<sup>37, 48, 49</sup>



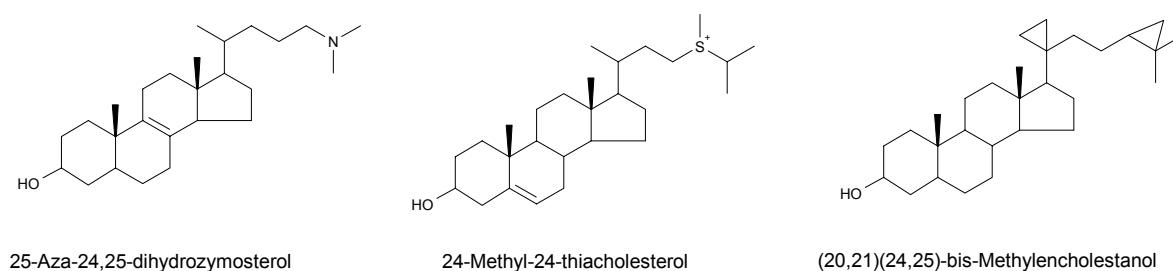
**Abbildung 27: Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes**

Alle bislang gefundenen Verbindungen sind über das „Laborstadium“ nicht hinausgekommen. In Anbetracht der Tatsache, daß der Demethylase-Komplex drei Enzyme als potentielle Angriffsziele bietet, ist es verwunderlich, daß es bis dato keine medizinisch oder landwirtschaftlich genutzten Wirkstoffe gibt.<sup>6</sup>

### 1.3.7 Inhibitoren der C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Die C-24-Methylierung der Sterolseitenkette (vgl. 1.2.2.6) ist ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal zwischen der Sterolbiosynthese von Pilz und Säugetier. Durch Einbringung einer positiven Ladung in die Seitenkette, z.B. durch N-, S- oder As-Substitution, oder durch Konstruktion von Substratanaloga konnten wirksame Inhibitoren geschaffen werden.<sup>27</sup>

Ähnlich wie auch bei den Morpholinen setzt man hier auf das Prinzip der Mimikry von High Energy Intermediates. Wie in 1.2.2.6 gezeigt, postuliert man an C-24 und C-25 carbokationische Zwischenstufen, die man durch Synthese geeigneter „Transition-State-Analogues“ zu imitieren versucht und welche eine höhere Bindungsaffinität zum Enzym aufweisen.<sup>32</sup>



**Abbildung 28: Inhibitoren der C-24-SMT und  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase**

Bedauerlicherweise konnte bereits 1979 festgestellt werden, daß 25-Azasterole und verwandte SMT-Inhibitoren schädlich für die menschliche und tierische Physiologie sind. Aus diesem Grund sind nie Substanzen mit diesem Wirkort auf den Markt gekommen.<sup>32</sup> Nichtsdestotrotz waren die ersten Resultate durchaus vielversprechend und es besteht weiter Interesse an einer kommerziellen Ausnutzung SMT-inhibierender Substanzen.

Nachdem Zymosterol in Hefen als Substrat für die Transmethylierung dient, wird es nach Inhibition der SMT auch oft als Akkumulationsprodukt gefunden. Ferner finden sich – je nach Spezies – Cholesta-7,24-dienol, Cholesta-5,7,24-trienol oder Cholesta-5,7,22,24-tetraenol in unterschiedlichen Mengenverhältnissen.<sup>50</sup>

Die in Abbildung 28 gezeigten Verbindungen und weitere Derivate haben sich auch als Inhibitoren der  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase erwiesen. Eine exakte Charakterisierung des Inhibitionserfolges an der  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase ist jedoch schwierig, wenn eine Substanz bereits ein potenter SMT-Inhibitor ist und damit kein Substrat mehr für die Reduktase zur Verfügung steht.



## 2 Themenstellung

Wie im vorangegangenen Kapitel skizziert, bietet die Ergosterolbiosynthese eine sehr geeignete Ansatzstelle für die Entwicklung neuer antimykotischer Wirkstoffe. Der erfolgreiche Einsatz von Allylamin-, Azol-, und Morpholin-Antimykotika als Ergosterolbiosyntheseinhibitoren hat dieses Konzept bestätigt. Es wurde aber auch deutlich, daß der Weg zum optimalen Antimykotikum noch nicht zu Ende gegangen ist, sondern innerhalb dieses Konzepts noch Forschungsbedarf besteht. Angesichts der steigenden Resistenzbildung gegenüber Antimykotika und der wachsenden Zahl an immunschwachen und somit besonders mykoseanfälligen Patienten, z.B. Senioren, HIV- oder mit Immunsuppressiva behandelten Patienten, ist es nötig, neue Wirkstoffe zu entwickeln, diese aber vor allem auch als solche zu *erkennen* und hinsichtlich ihres Angriffsortes *richtig einzuordnen*.

Die vorliegende Arbeit widmet sich diesem letzten Aspekt der Wirkstofffindung.

### 2.1 „Das Ziel“

Ausgehend von einer internen Arbeitsvorschrift aus der Agrochemie (s. 4.1.2) sollte ein verbessertes Testsystem entwickelt und installiert werden, welches, unter Zuhilfenahme mikrobiologischer und instrumentell-analytischer Methoden, in der Lage ist,

1. neue, potentielle Antimykotika auf ihr Ergosterolbiosynthese-Inhibitionspotential zu untersuchen,
2. eine Abschätzung der Wirkstärke im Vergleich mit anderen Substanzen zu ermöglichen,
3. eine exakte Zuordnung des molekularen Angriffspunkts in der Ergosterolbiosynthese zu erlauben, dabei auch erste Aussagen über mögliche neu gefundene Angriffspunkte zuzulassen,
4. und dabei einen guten Probendurchsatz und standardisierte Arbeitsabläufe im Sinne einer robusten Routineanalytik zu erreichen,

um

1. eine Vorselektion für weitergehende Testungen (Wirkung gegen andere opportunistische Organismen, Cytotoxizitäts-Tests, etc.) zu treffen, und
2. Syntheseplanungen für zukünftige potentielle Wirkstoffe zu optimieren, und
3. den Grundstock für eine Strukturdatenbank zu legen, die im Sinne von Molecular Modelling rechnergestütztes Wirkstoffdesign ermöglicht.

### 2.2 „Die Strategie“

Die Realisierung der gesteckten Ziele erfordert die Verknüpfung von grundlegenden mikrobiologischen Techniken mit analytischem Know-how über Sterolanalytik und Sterolextraktion aus biologischen Matrices.

Als Grundprinzip des zu realisierenden Testsystems bot sich folgende Vorgehensweise an:

1. Kultivierung eines geeigneten Testkeimes unter Zugabe sublethaler Dosen an zu testendem Wirkstoff gegenüber einer Blindkontrolle ohne Wirkstoff.

2. Bestimmung der in einem festgelegten Zeitraum gewachsenen Biomasse und Definition eines Parameters ( $EC_{50}$ ), welcher einen Vergleich des Einflusses auf das Wachstum zwischen verschiedenen Testsubstanzen oder Referenzen zuläßt.
3. Extraktion der Sterolfraction aus dem Testkeim und Untersuchung derselben auf charakteristische Veränderungen im Sterolmuster.
4. Bestimmung des potentiellen Wirkortes auf Grund des gefundenen Sterolmusters im Abgleich mit literaturbekannten *SBI*'s.

Ein erster Schritt sollte die Beschaffung von Ergosterol und seinen Biosynthesestufen sein. Unter Zuhilfenahme geeigneter instrumentell-analytischer Methoden sollten diese Sterole eindeutig charakterisiert werden, so daß sie später in der Sterolfraction des Testkeims in kleinsten Mengen und im Gemisch noch identifiziert werden können.

Parallel dazu sollten Kulturbedingungen und Anzuchtmethoden für den Testkeim optimiert werden, sowie Methoden für die Aufarbeitung und Sterolextraktion gefunden werden.

Es sollte der Einfluß von Referenzantimykotika auf das Wachstumsverhalten des Testkeimes und dessen Sterolproduktion untersucht werden. Das Testsystem wird „geeicht“.

Schließlich sollten neue Substanzen auf ihre Wirkung auf den Testkeim untersucht werden, sowie gegebenenfalls neu entstandene Sterole charakterisiert werden, um so eine Aussage zum potentiellen Zielenzym machen zu können.

### 2.3 „Der Weg“

In Vorarbeit zur Entwicklung des beschriebenen Testsystems war die Auseinandersetzung mit der analytischen Seite, sowie die Beschaffung von Ergosterolbiosynthesestufen erforderlich. Da die gewünschten Precursoren nicht kommerziell erhältlich sind, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese durch Isolierung aus einer geeigneten Quelle zu erhalten. Durch günstige Umstände konnte der Kontakt zur Hefeindustrie hergestellt werden, und die Bereitstellung größerer Mengen an Hefefett ermöglichte schließlich die Isolierung mehrerer Precursoren, welche das analytische Fundament für die weitere Vorgehensweise darstellt.

In **Kapitel 3** steht daher die instrumentell-analytische Seite dieser Arbeit im Vordergrund. Dort wird beschrieben, wie die Isolierung von Sterolen aus Hefefett mittels präparativer HPLC durchgeführt wurde. Es wird berichtet, wie die aus Hefefett und *Yarrowia lipolytica* isolierten Substanzen mit Hilfe von HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS/MS und NMR in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. Dabei wurden vor allem mit der LC-MS/MS-Analytik neue Wege beschritten, weshalb diesem Aspekt auch ein vorangestellter Überblick über die theoretischen Grundlagen der LC-MS/MS-Technik gewidmet ist. Aber auch in den HPLC- und GC-Techniken wurden mit überarbeiteten Methoden Fortschritte in der Sterolanalytik erzielt.

**Kapitel 4** beschreibt die mikrobiologischen Aspekte des entwickelten Testsystems, diskutiert was es leisten kann (und was es nicht leisten kann) und stellt eine in Punkto Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Probanddurchsatz optimierte, bislang nicht beschriebene Extraktionsmethode für Sterole aus der biologischen Matrix „Hefe“ vor, die Festphasenextraktion. Es wird weiterhin über die Untersuchung der Sterolfraction aus dem Testkeim *Yarrowia lipolytica* berichtet, sowie die Ergebnisse von Inhibierungsversuchen mit 9 bekannten antimykotischen Wirkstoffen aus Medizin und Landwirtschaft vorgestellt, welche als Vertreter für die wichtigsten Inhibitionstypen der Ergosterolbiosynthese getestet wurden. Dabei konnten literaturbekannte Veränderungen des Sterolmusters hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf die bislang nur wenig beschriebene Hefe *Y. lipolytica* überprüft werden, bevor schließlich neue Testsub-

stanzen untersucht wurden. Hierbei konnten auf Grund der in Kapitel 3 gewonnenen Erkenntnisse und Daten auch neue anormale Sterole identifiziert werden und die getesteten Substanzen konnten nach molekularen Angriffspunkten klassifiziert und in ihrer Wirkstärke eingeordnet werden. Zu guter Letzt wird auf die gefundenen Auswirkungen von strukturellen Variationen der Testsubstanzen auf Angriffspunkt und Wirkstärke eingegangen.

### 3 Analytik von freien Sterolen

#### Vorbemerkung:

In diesem Kapitel wird auf die Charakterisierung der Sterole, welche aus Hefefett isoliert werden konnten, eingegangen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist dieses Kapitel nach den Methoden (HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS/MS, NMR), die der Strukturaufklärung der Sterole dienlich waren, gegliedert. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen war meistens nur durch Kombination dieser Methoden möglich und ist daher nicht „am Stück“ darstellbar. Deshalb wird das Identifizierungsergebnis mit Beginn der Fraktionierung des Hefefetts vorgezogen, obwohl die während der Strukturaufklärungsphase zusammengetragenen Details erst in den entsprechenden Abschnitten besprochen werden.

Ebenso werden die im Verlauf der in Kapitel 4 beschriebenen Testmethode durch Inhibition der Ergosterolbiosynthese von *Y. lipolytica* akkumulierten und dabei erstmals aufgetretenen Sterole in die passenden Abschnitte dieses Kapitels vorgezogen. Dies betrifft die Sterole Fecosterol (**7**), 24(28)-Dehydroergosterol (**9**), Lichesterol (**12**), Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**), Ignoosterol (**14**), Cholesta-5,7,24-trienol (**15**), Ergosta-8-enol (**16**) und Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**), sowie das von der Schering AG zur Verfügung gestellte 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**).

Alle in dieser Arbeit charakterisierten Substanzen (Squalen und Sterole) werden nachstehend gezeigt.

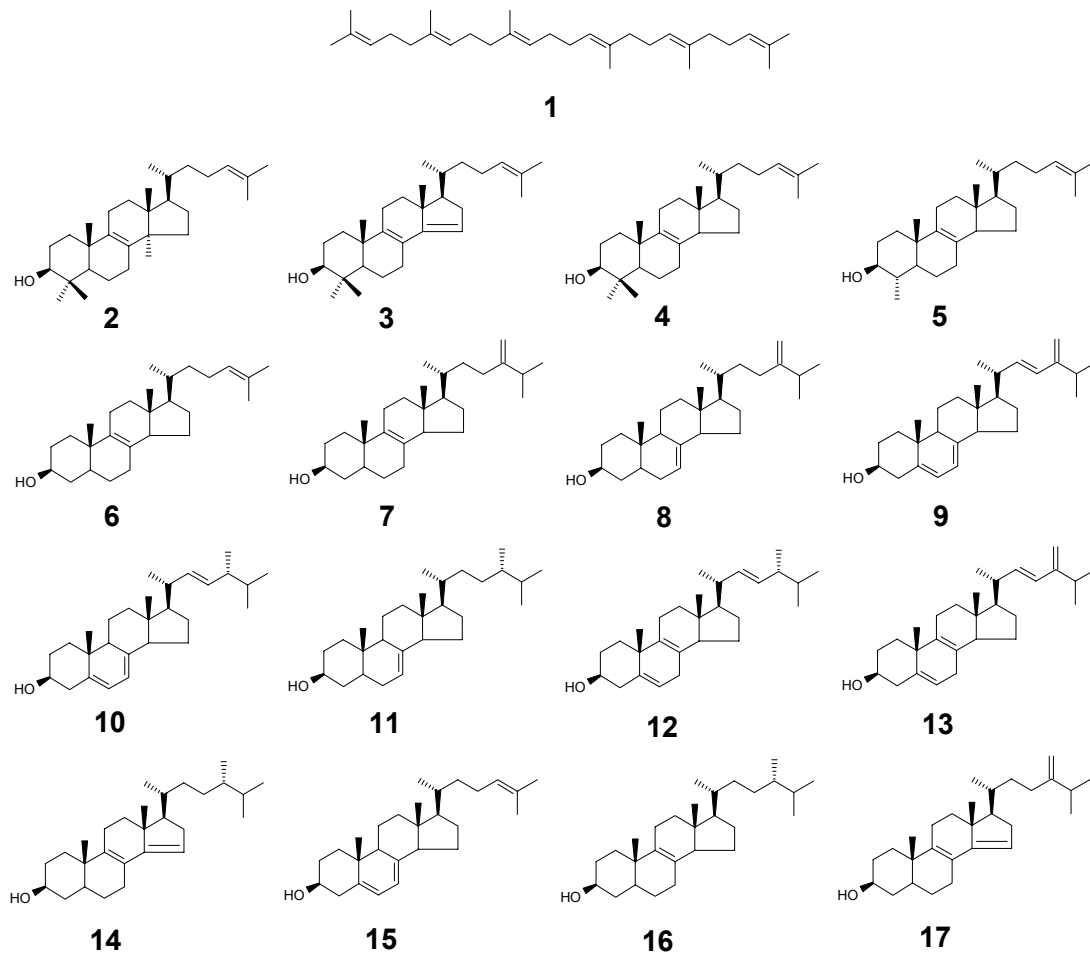


Abbildung 29: Gesamtübersicht aller charakterisierten Substanzen

### 3.1 Bisherige Extraktionsmethoden von Sterolen aus Hefen

Sterole kommen in der Natur sowohl in freier Form vor, also als Alkohole, als auch in gebundener Form als Sterol-Fettsäureester oder Sterolglycoside. Sterol-Fettsäureester sind sauer oder alkalisch hydrolysierbar, Sterolglycoside lassen sich durch saure Hydrolyse in die freien Sterole überführen.

Freie Sterole sind als lipophile Neutralstoffe Bestandteil des „Unverseifbaren Anteils“ in der Fettfraktion. In der Literatur werden sie oft im Anschluß an einen Verseifungsschritt mit alkoholischer Alkalihydroxidlösung von den „verseifbaren“ Acyllipiden (Triacylglyceride, Phospholipide und Glycolipide) abgetrennt. Dies geschieht im Allgemeinen durch flüssig-flüssig-Extraktion gegen organische Lösungsmittel, wie z.B. Diethylether, Chloroform oder Hexan.<sup>51</sup> Die organische Phase, welche die Sterole, Tocopherole, Carotinoide etc. enthält, wird anschließend chromatographisch aufgetrennt.

Als Extraktionsmethoden für Sterole aus Hefezellen haben sich drei Verfahren durchgesetzt, die geeigneten Parameter variieren in der Literatur zum Teil erheblich (übersetzte Originalschriften):<sup>52</sup>

#### 1. Alkalische Verseifung

*Die Zellen werden mit Säure vorbehandelt (acid labilization). Diese Behandlung ist nicht notwendig, aber erhöht die Gesamtsterolausbeute.<sup>53</sup> Dabei werden die Zellen in 20 ml 0,1 N HCl aufgenommen und 20 min. mit Wasserdampf behandelt. Anschließend werden sie mit destilliertem Wasser gewaschen. Bis zu 2 g Naßgewicht an Zellen werden in 60% KOH in Wasser, 3 ml Methanol und 2 ml 0,5% Pyrogallol in Methanol unter Siedesteinchen-Zugabe 1-2 h bei 60-80 °C rückfließend erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung mit 10 ml Hexan extrahiert. Die Phasen können durch einminütige Zentrifugation bei 500 g getrennt werden. Die obere Hexanschicht wird abgezogen und in ein sauberes Reagenzglas überführt und die Zellen weitere zwei Mal mit Hexan extrahiert. Auftretende Emulsionen können durch Zugabe von 0,5 ml Methanol gebrochen werden.*

#### 2. Chloroform-Methanol Extraktion

*Die Zellen werden in destilliertem Wasser aufgenommen (1 ml/g Zell-Naßgewicht) und unter CO<sub>2</sub>-Kühlung mit Gaspertlen in einem Homogenisator aufgebrochen. Es werden 4 ml Methanol pro 1,6 ml Zellsuspension zugegeben und gevortext.*

*Zum Überstand werden 2 ml Chloroform gegeben, gevortext und dabei 2 ml Salzlösung (0,9% NaCl) zugegeben. Die Phasen werden durch Zentrifugation (5 min, 500 g) getrennt. Die obere Schicht wird entfernt und die Chloroformschicht zweimal unter vortexen mit 2 ml 2 M KCl gewaschen. Wieder werden die Phasen unter Zentrifugation getrennt und die obere Schicht entfernt. Bei Auftreten einer Emulsion ist eine Entmischung abzuwarten (1-3 h bei 37 °C), evtl. unter Zugabe von 0,5 ml Methanol.*

#### 3. DMSO-Hexan Extraktion

*Bis zu 2 g Naßzellgewicht werden pelletiert und gefroren. Das Zellpellet wird lyophilisiert und pulverisiert. Das Pulver wird mit DMSO durchtränkt und 1 h mit Wasserdampf behandelt. Nach dem Abkühlen werden 10 ml Hexan zugegeben und die Lösung gevortext. Es werden 10 ml Methanol-Wasser (1:4 v/v) zugegeben und gevortext. Die Suspension wird 5 min. bei 500 g zentrifugiert, die Hexanfraktion in ein sauberes Reagenzglas überführt und das Pellet noch zwei Mal mit Hexan extrahiert.*

Obwohl alle drei Methoden effizient sind, hat sich die alkalische Verseifung als Methode der Wahl etabliert, denn sie ist die schnellste und erlaubt daher den höchsten Probendurchsatz. Allerdings erlaubt sie nur die Untersuchung des Gesamtsterolanteils. Wenn die Bestimmung

sowohl von freien, als auch veresterten Sterolen nötig ist, muß auf eine der beiden anderen Methoden zurückgegriffen werden.

### 3.2 Hefefett

Da die zu Referenzzwecken für die geplante Testmethode benötigten Ergosterolbiosynthesevorstufen kommerziell nicht erhältlich waren, mußte der Bedarf an solchen Precursoren durch Isolierung aus einer geeigneten Quelle gedeckt werden. Dabei konnte auf die „altbewährte“ Methode der Extraktion aus kultivierten Hefen nicht ohne weiters zurückgegriffen werden, da zu diesem Zeitpunkt die räumliche und apparative Ausstattung eine Kultivierung nicht zuließ. Überdies wären bei einem ungefähren Gesamtsterolanteil von 1% am Trockengewicht (und davon überwiegend Ergosterol), große Mengen an Hefe-Biomasse nötig gewesen, um Precursoren in ausreichender Quantität isolieren zu können.

Als ideale Alternative bot sich Hefefett als „Sterolquelle“ an. Das hier verwendete Hefefett wurde von der Deutsche Hefewerke GmbH & Co, Hamburg, aus *S.cerevisiae* mit einem Gemisch von Hexan-Methanol (80:20 v/v) aus Hefezellwänden gewonnen und freundlicherweise in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt. Untersuchungen der Deutschen Hefewerke ergaben einen unverseifbaren Anteil von 10% und einen Gesamtsterolanteil von 4,4%. Der Restproteingehalt beträgt 10%, das Fettsäureprofil weist 80% Monoensäuren auf, darunter vor allem Palmitoleinsäure und Ölsäure.<sup>18</sup> Das Hefefett ist tiefbraun, zähflüssig und riecht scharf nach „Maggi“.

### 3.3 Isolierung von Sterolen aus Hefefett mit präparativer HPLC

Wie in 3.1 aus den erwähnten Extraktionsmethoden ersichtlich, erweist sich bei der flüssigflüssig-Extraktion oft genug die emulgierende Eigenschaft der Sterole und der nach der Verseifung vorliegenden freien Fettsäuren als problematisch. Sie reichern sich an der Phasengrenze zwischen wäßriger und organischer Phase an, eine auftretende Schaumbildung erschwert eine rasche Phasentrennung und ein Verlust an Ausbeute ist die Folge. Da diese Beobachtung auch bei den ersten Extraktionsversuchen aus Hefefett nach der Methode „Alkalische Verseifung“ gemacht wurde, wurde ein anderer Weg eingeschlagen, um die Sterolfraction des Hefefetts schonend und vollständig zu gewinnen und vom Restfett abzutrennen. Dies war nicht zuletzt auch deswegen nötig, da die geplante nachgeschaltete Auftrennung mittels HPLC eine direkte Aufgabe des viskosen Hefefetts verbot.

Eine einfache Lösung brachte die bekannte Tatsache, daß sich Fettsäuren in Aceton fraktioniert „ausfrieren“ lassen.<sup>54</sup> Dieser Effekt konnte im Hefefett auch auf unverseifte Fette angewendet werden. Vorversuche mit Ergosterol zeigten, daß sich Sterole in kaltem Aceton gut lösen.

Zur Herstellung dieses HPLC-tauglichen Rohextraktes wurde Hefefett vollständig in Aceton gelöst und in einer auf 0 °C gekühlten Zentrifuge längere Zeit zentrifugiert. Dabei ausfrierendes Fett konnte auf diese Weise vom Acetonextrakt abgetrennt werden. Die im fettabgereicherten Extrakt verbleibenden Sterole waren damit für eine chromatographische Trennung zugänglich.

Der Rohextrakt wurde mit 100% Methanol als mobile Phase in einem ersten präparativen HPLC-Lauf in sechs Hauptfraktionen unterteilt, wobei erst ab ca. 13 min gesammelt wurde. Die Fraktionen 1-6 wurden gaschromatographisch untersucht. Eine Überprüfung mit GC-MS ergab, daß sich in Fraktion 1 und 6 keine nennenswerten Mengen an Sterolen befinden. Statt dessen konnte in Fraktion 1 in Übereinstimmung mit einer MS-Spektrendatenbank das Vorhandensein von Ölsäure und Palmitoleinsäure und ihrer Methyl- und Ethylester, sowie

weiterer gesättigter und ungesättigter Fettsäuren bzw. Fettsäureester bestätigt werden. Fraktion 5 enthält Squalen (**1**) in hoher Reinheit und wurde nicht weiter aufgereinigt.

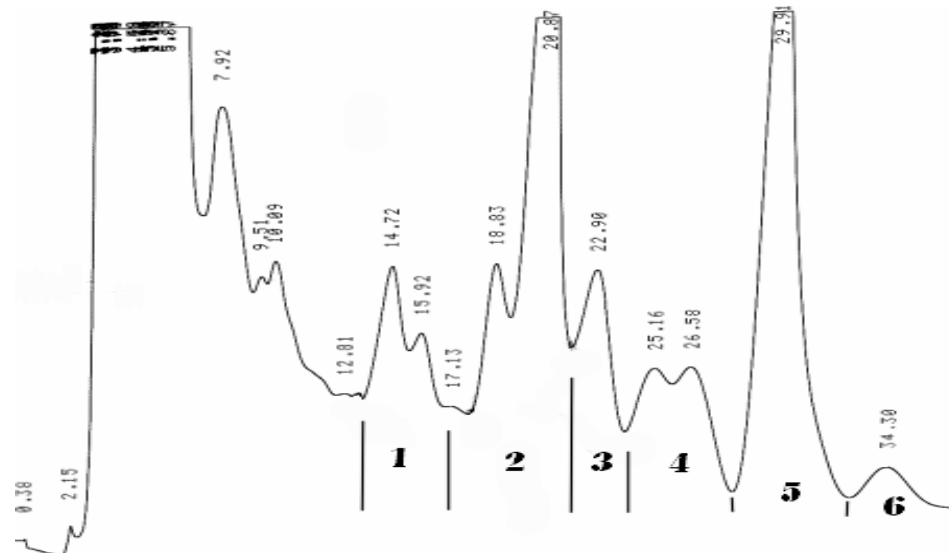


Abbildung 30: Fraktionierung von Hefefett mit HPLC

Die Fraktionen 2, 3 und 4 wurden nach dem Einrotieren wieder auf die HPLC gegeben. Eine erneute Auftrennung mit der präparativen HPLC unter Änderung der Solventzusammensetzung auf Methanol/Acetonitril im Verhältnis 70/30, brachte eine enorme Steigerung der Trennleistung.

Die HPLC von Fraktion 2 ergab folgendes Chromatogramm, es wurden die Fraktionen 2a, 2b, 2c und 2d gewonnen:

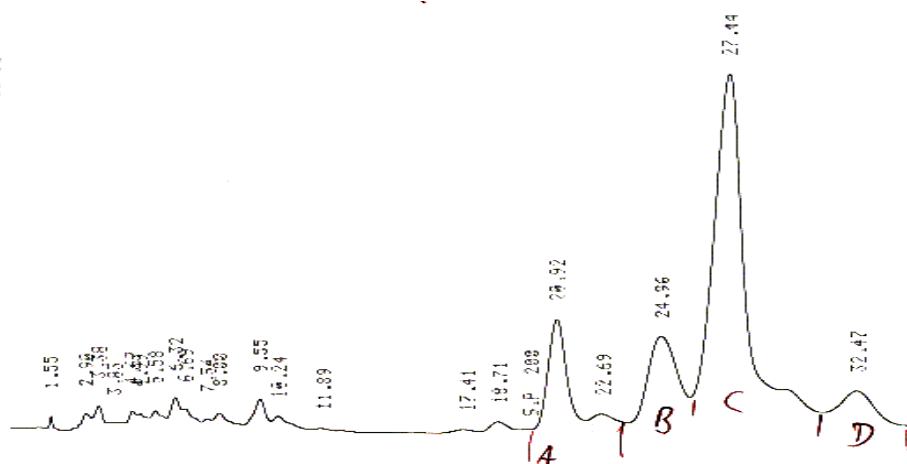


Abbildung 31: Fraktionierung von Fraktion 2

Nachfolgend wurden die Fraktionen 2a-d im GC-MS untersucht. Neben den Sterolpeaks sind deren Molmassen angegeben.

Fraktion 2a enthält keine nennenswerten Mengen an Sterol. Fraktion 2b enthält neben Zymosterol (**6**) (384 links) ein weiteres Sterol mit  $M_R = 384$ , das noch nicht identifiziert ist. Fraktion 2c besteht überwiegend aus Ergosterol (**10**) (396), dem Hauptsterol, sowie einem



Dienol der Masse 398, welches als Episterol (**8**) identifiziert werden konnte. Fraktion 2d zeigte kein Vorhandensein von Sterolen und war auch sonst nicht auswertbar.

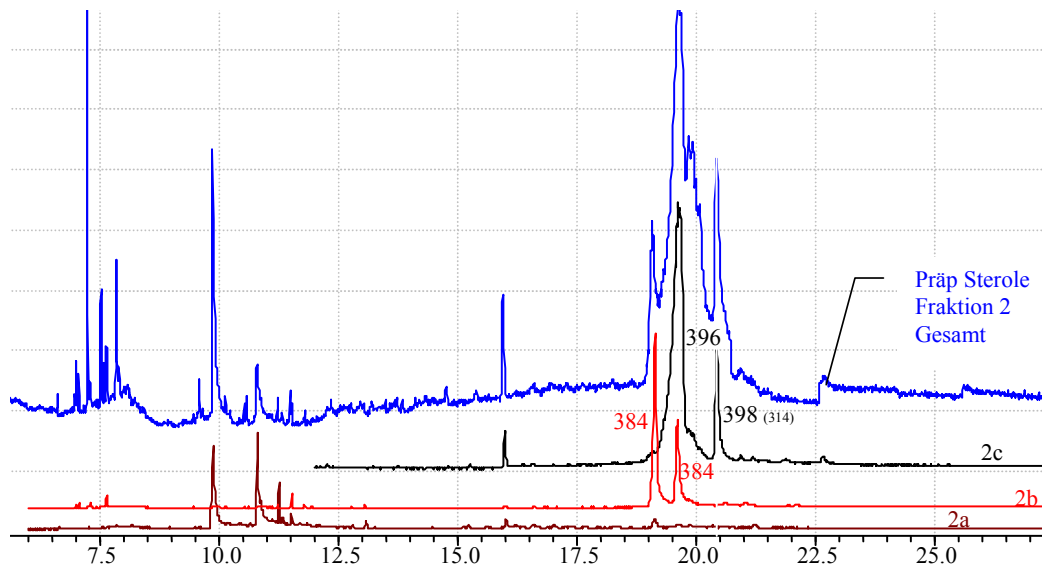


Abbildung 32: Bildmontage: Zusammensetzung der Fraktion 2 im GC-MS

Fraktion 3 konnte ebenfalls durch HPLC-Trennung mit dem 70/30-Mix in Unterfraktionen geteilt werden. Es ergaben sich die Unterfraktionen 3a-e.

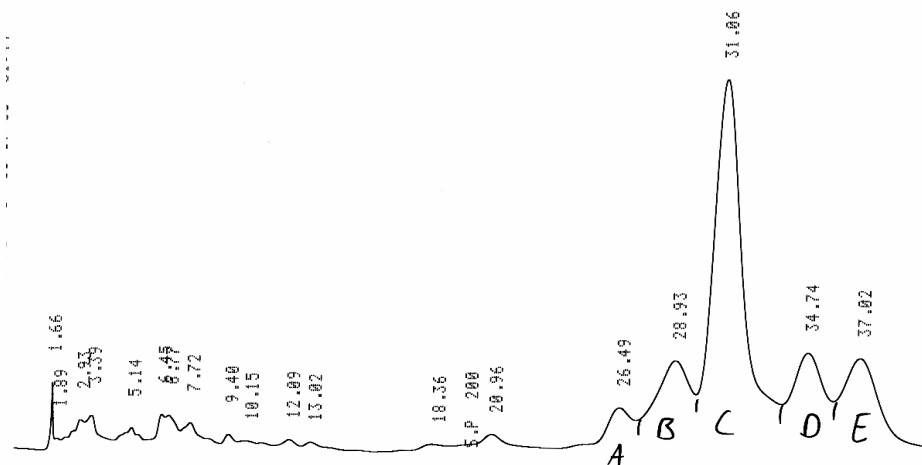


Abbildung 33: Fraktionierung von Fraktion 3

Das Sterol mit  $M_R = 396$  in Fraktion 3a ist Ergosterol (**10**), ein Überbleibsel aus Fraktion 2. Das Sterol mit  $M_R = 398$  in Fraktion 3b konnte dem 4-Methylzymosterol (**5**) zugeordnet werden. Bislang nicht sicher zugeordnet werden konnte das Signal in Fraktion 3c, welches ein Sterol mit  $M_R = 398$  zeigt (evtl. Ergosta-7,22-dienol), während das Hauptsignal in Fraktion 3c mit der Molekülmasse 426 als Lanosterol (**2**) identifiziert werden konnte. Dieses Signal findet auch in 3d und 3e eine Fortsetzung. Eine weitere Auswertung der Fraktionen 3d und 3e war nicht möglich.



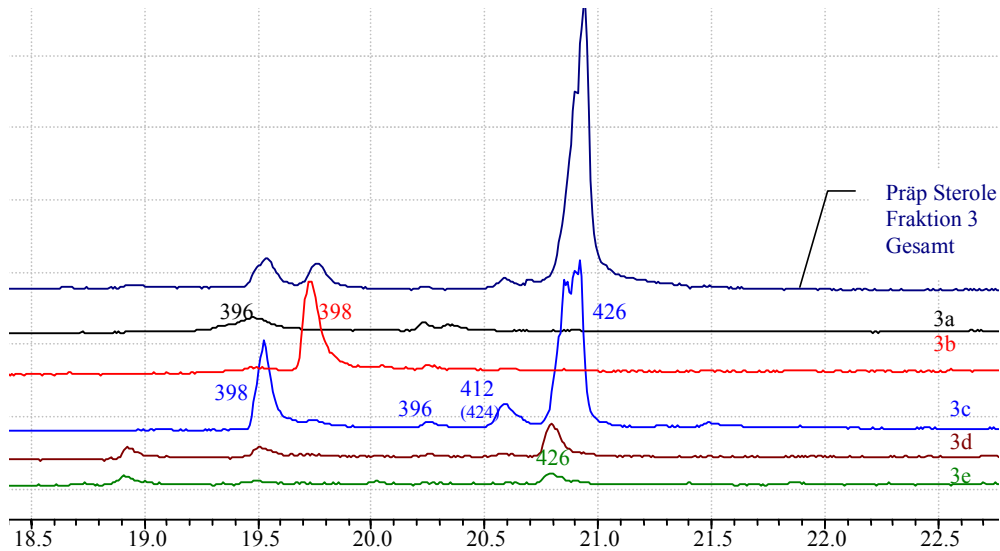


Abbildung 34: Bildmontage: Zusammensetzung der Fraktion 3 im GC-MS

Fraktion 4 wurde in die Unterfraktionen 4a-d aufgeteilt:

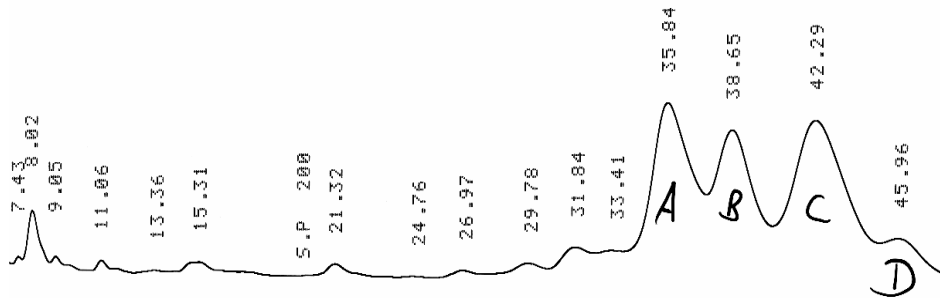


Abbildung 35: Fraktionierung von Fraktion 4

In Fraktion 4a findet sich neben dem Hauptsignal eines Steroles mit  $M_R = 412$ , das 4,4-Dimethylzymosterol (**4**) darstellt, ein Signal von Cholesterol ( $M_R = 386$ ). Das Signal in Fraktion 4b ist Fungisterol (**11**). Das Sterol mit  $M_R = 394$  in Fraktion 4c konnte nicht identifiziert werden. Fraktion 4d brachte kein auswertbares GC-MS-Chromatogramm und wird daher auch nicht abgebildet.

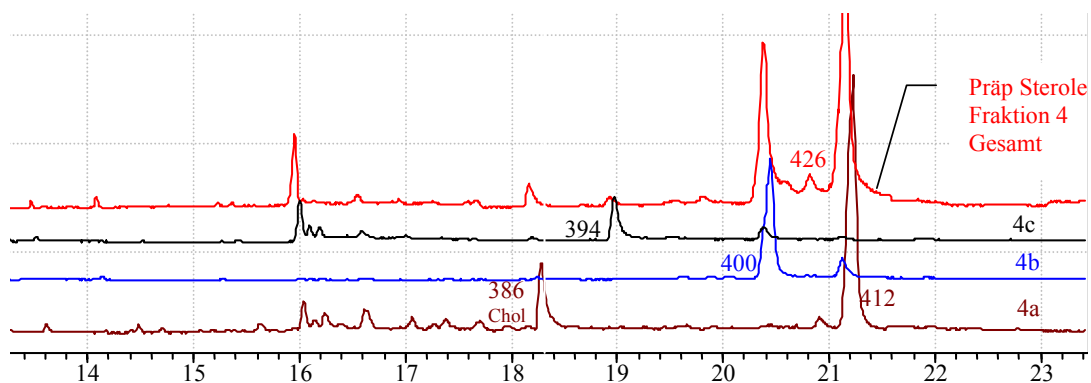


Abbildung 36: Bildmontage: Zusammensetzung der Fraktion 4 im GC-MS

Die auswertbaren Fraktionen werden in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt.

Fraktion	Hauptkomponente(n)
2b	Zymosterol ( <b>6</b> )
2c	Ergosterol ( <b>10</b> ), Episterol ( <b>8</b> )
3b	4-Methylzymosterol ( <b>5</b> )
3c	Lanosterol ( <b>2</b> )
4a	4,4-Dimethylzymosterol ( <b>4</b> )
4b	Fungisterol ( <b>11</b> )

**Tabelle 2: Sterolfaktionen aus Hefefett**

Nach der erfolgreichen Anreicherung der Sterole in den genannten Fraktionen wurde eine Umkristallisationsprozedur durchgeführt. Eigene Versuche brachten in Vorversuchen das Ergebnis, daß sich Sterole in wenig kaltem Methanol nur schlecht lösen. Daher wurden die einrotierten Fraktionen in möglichst wenig Methanol unter Erwärmen und Ultraschallbehandlung gelöst und zwei Tage ins Eisfach gestellt. Die als farblose Nadeln oder Plättchen gewonnenen Sterole wurden mit NMR analysiert, bzw. gaschromatographisch (GC-MS) oder flüssigchromatographisch (HPLC-MS und HPLC-DAD) vermessen.

Im Falle von Fraktion 2c mußte ein weiterer chromatographischer Schritt nach der Auskristallisation eines Anteils der Hauptkomponente Ergosterol (**10**) nachgeschaltet werden, um Episterol (**8**) isolieren zu können. Dabei wurde wieder mit Methanol/Acetonitril im Gemisch (70/30) gearbeitet.

### 3.4 Sterolanalytik mit HPLC-DAD

Für die vorliegende Arbeit stand ein HPLC-System zur Verfügung, welches mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) ausgestattet ist. Im Unterschied zur Detektion mit einem UV-Detektor ist hierbei die Erfassung des gesamten Absorptionsspektrums eines Analyten möglich. Dies ist ein sehr wichtiges Hilfsmittel zur Erkennung und Zuordnung von konjugierten Doppelbindungssystemen in einem unbekanntem Sterol. Ein weiterer hilfreicher Parameter bei der qualitativen Charakterisierung war die Bestimmung der Retentionszeit. Voraussetzung dafür war aber, daß im Vorfeld eine Trennmethode gefunden wurde, welche eine optimale Trennung von Sterolmischungen erlaubt und im Verlaufe der Arbeit nicht mehr verändert zu werden brauchte, da sonst die bisherigen ermittelten Retentionszeiten keine Gültigkeit mehr gehabt hätten.

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Methoden<sup>55,14,56</sup> wurde ein *reversed-phase*-System gewählt und sowohl Zusammensetzung der mobilen Phase variiert, als auch verschiedene Säulenmaterialien ausprobiert.

Gute Resultate wurden bereits bei Verwendung einer MERCK-LiChrospher<sup>®</sup> RP-18, 250x4 mm, 5µm mit einer Laufmittelzusammensetzung Methanol/Wasser (98:2 v/v) bei einem Fluß von 1 ml/min erreicht. Allerdings kamen hierbei Gesamtlaufzeiten von über 30 min zustande, bis stark retardierende Substanzen wie Lanosterol oder Squalen eluierten.

Durch Übertragung der genannten Trennbedingungen auf eine Säule mit höherem Kohlenstoffanteil und kleinerem Partikeldurchmesser (3 µm), konnte mit der Maisch ReproSil<sup>®</sup> ODS-3, 125x4 mm, 3 µm eine weitere Verbesserung der Signalschärfe durch Erhöhung der effektiven Trennbodenzahl bei kürzerer Gesamtlaufzeit erreicht werden. Eine vollständige Substitution des Methanolanteils im Laufmittel gegen Acetonitril bewirkte, daß die Elution von Sterolen vollständig ausblieb. Eine teilweise Substitution auf eine Zusammensetzung von Methanol/Acetonitril/Wasser (70:28:2 v/v) jedoch brachte eine enorme Selektivitätssteigerung bei unwesentlicher Verlängerung der Gesamtlaufzeit. Dieser Effekt wurde bereits in 3.3 angesprochen, allerdings wurde dort auf den 2%igen Wasseranteil verzichtet, um die isolierten Fraktionen besser am Rotavapor einrotieren zu können.

Wie eingangs erwähnt, war die Dioden-Array-Detektion ein wichtiges Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung von Sterolen, da man hierbei die Lichtabsorption des Analyten über einen maximalen Bereich von  $\lambda = 190 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$  erfassen und damit sein Absorptionsprofil abbilden kann. Die überwiegende Zahl an Ergosterolbiosynthese-Vorstufen weist eine oder mehrere isolierte Doppelbindungen im Ringgerüst oder in der Seitenkette auf, deren Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 203 \text{ nm}$  liegt, nahe der Eigenabsorption der gebräuchlichen Laufmittel Wasser, Methanol, Ethanol oder Acetonitril. Aus diesem Grund sind Messungen bei dieser Wellenlänge nur unter isokratischen Bedingungen möglich; eine Gradiententrennung bewirkt bei der genannten Wellenlänge eine starke Basisliniendrift, die oft die zu untersuchenden Analyten „verschlucken“ würde.

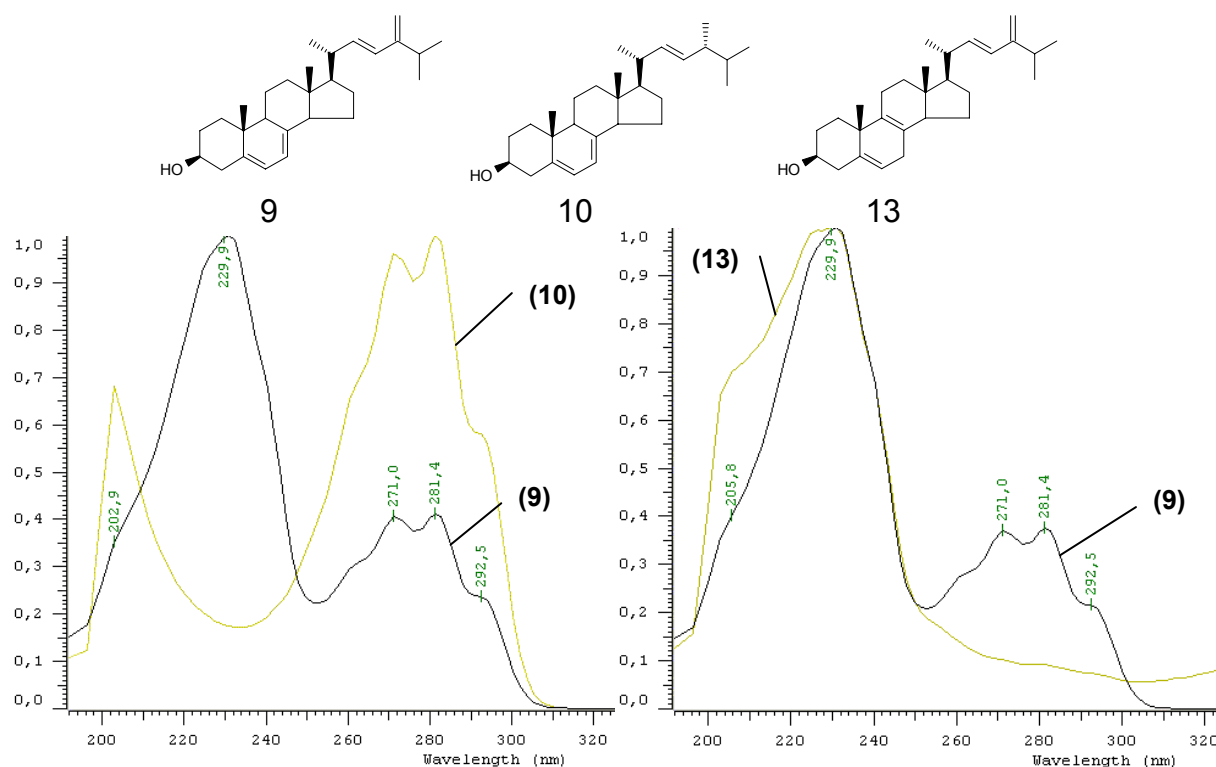
Einige der Ergosterolprecursoren und auch das Ergosterol weisen konjugierte Diensysteme auf welche eine bathochrome Verschiebung der Lichtabsorption zur Folge haben. Die resultierenden Verschiebungen können sich zurückführen lassen auf konjugierte Diensysteme, die sich innerhalb eines Ringes im Sterol befinden (z.B.  $\Delta^{5,7}$ ), oder sich über zwei Ringe hinwegziehen (z.B.  $\Delta^{8,14}$ ), oder aber in der Seitenkette lokalisiert sind (z.B.  $\Delta^{22,24(28)}$ ). Die jeweils zu beobachtenden Absorptionmaxima sind deutlich voneinander unterscheidbar und charakteristisch für die Lage der konjugierten Doppelbindungen im Sterol. Die literaturbekannten  $\lambda_{\text{max}}$ -Werte für die in dieser Arbeit relevanten Sterole sind in Tabelle 3 aufgeführt.<sup>57</sup>

Position des konjugierten Diensystems	$\lambda_{\max}$ [nm]
$\Delta^{5,7}$	282 (271, 293)*
$\Delta^{8,14}$	248
$\Delta^{22,24(28)}$	230

**Tabelle 3: Charakteristische UV-Absorptionsmaxima von Diensystemen in Sterolen**

Von herausragender Bedeutung war die HPLC-DAD-Analyse bei der Identifizierung von 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) zu Beginn der Untersuchungen am Testkeim *Y. lipolytica*. Im Vergleich mit dem oft in der Literatur<sup>58</sup> beschriebenen UV-Spektrum von Ergosterol (**10**) lassen sich klar die strukturellen Unterschiede ableiten (Abbildung 37 links).

Beiden Sterolen gemeinsam ist zunächst das konjugierte  $\Delta^{5,7}$ - $\pi$ -System im Ring B, was sich durch identische Absorptionsmaxima im Bereich von 270 nm bis 295 nm zeigt. Während aber das Ergosterol eine isolierte Doppelbindung ( $\Delta^{22}$ ) aufweist, welche bei 203 nm ihr Maximum hat, kann dies beim 24(28)-Dehydroergosterol nicht beobachtet werden; das bis dato „unbekannte“ Sterol trägt also keine isolierten Doppelbindungen. Statt dessen zeigt sich ein Maximum bei 230 nm, welches typisch für ein  $\Delta^{22,24(28)}$ -Diensystem ist. In Verbindung mit der im GC-MS und LC-MS ermittelten Molekülmasse von 394 g/mol war damit die Identität bereits vor der „Absicherung“ durch NMR aufgeklärt.



**Abbildung 37: links: Identifizierung von 24(28)-Dehydroergosterol (9) im Vergleich zu Ergosterol (10); rechts: Verlust des konjugierten  $\Delta^{5,7}$ - $\pi$ -Systems im Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (13) und Auftreten von Monoenabsorption**

In ähnlicher Art und Weise konnte die Identität von Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**), welches sich in Folge von Inhibitionsexperimenten in *Y. lipolytica* anreichert, zumindest ansatzweise durch HPLC-DAD bestätigt werden (Abbildung 37 rechts).

Von seinem  $\Delta^7$ -Isomeren **9** ist **13** flüssigchromatographisch praktisch nicht zu trennen, allerdings gelingt dies gaschromatographisch im GC-MS, wobei sich annähernd gleiche Massen-

\* Werte in Klammern sind  $\lambda_{\max}$  für „Schultern“ im Spektrum

spektren ergeben. Im DAD-Spektrum zeigt sich, daß **13** die linke Flanke und **9** die rechte Flanke des nicht aufgelösten HPLC-Peaks einnimmt. Beim Vergleich der beiden Peakseiten kann zum einen die Identität des 24(28)-Dehydroergosterol festgestellt werden, aber auch, daß das noch aufzuklärende Sterol **13** dasselbe Diensystem in der Seitenkette besitzt, aber auch das Vorhandensein von isolierten Doppelbindungen zeigt. Die letztendliche Aufklärung der exakten Position der beiden isolierten Doppelbindungen erfolgt schließlich über einen Analogieschluß zu dem sich analog verhaltenden Paar Ergosterol (**10**) / Lichesterol (**12**). Letztere lassen sich über HPLC ebenfalls nicht trennen, zeigen zueinander sehr ähnliche Massenspektren und weisen im gaschromatographischen Lauf die gleiche Retentionszeitdifferenz.

Ebenfalls über sein eindeutiges UV-Spektrum konnte Ignosterol (**14**) identifiziert werden. Das Spektrum zeigt nur ein Maximum bei 248 nm und in Verbindung mit der Masse von 398 g/mol kann es als Ergostadienol mit einem  $\Delta^{8,14}$ -Diensystem identifiziert werden. Nachdem es auch nur nach Inhibition mit  $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitoren in *Y. lipolytica* akkumuliert (vgl. Abbildung 23), ist die Identität damit als gesichert anzusehen. Im Fall des Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**) mit Absorptionsmaxima bei 203 nm und 248 nm, sowie  $M_R = 396$ , kann von einem Ergostatrienol ausgegangen werden, wobei ein  $\Delta^{8,14}$ -Diensystem und eine auf diese Weise nicht lokalisierbare isolierte Doppelbindung vorliegt. Diese Aufklärung war nur über NMR möglich (Abbildung 38).

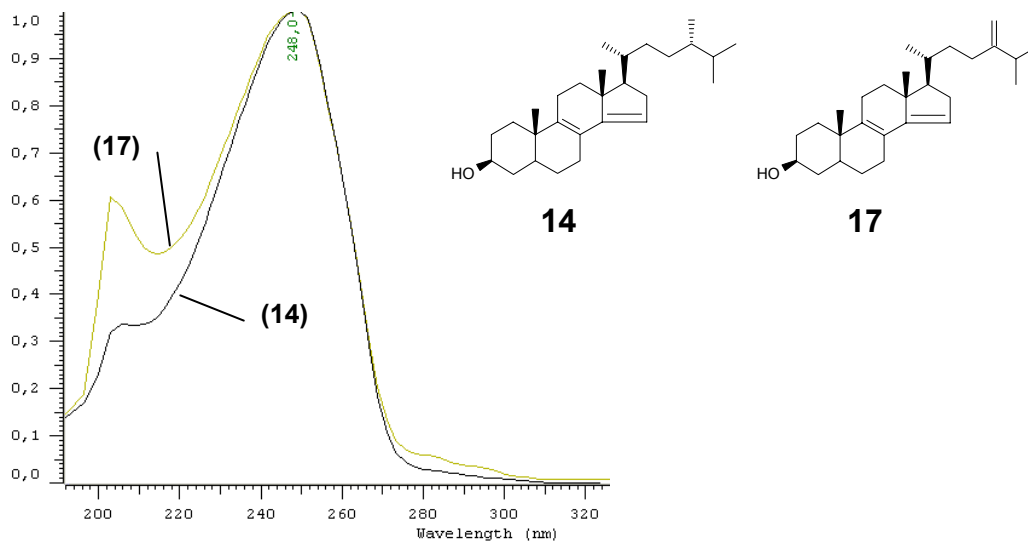


Abbildung 38: UV-Spektrum von Ignosterol (**14**) und Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**)

### 3.5 Sterolanalytik mit GC-MS

Die Analytik von Sterolen mittels gaschromatographisch gekoppelter Massenspektrometrie stellt in der vorliegenden Arbeit das Hauptstandbein bei der Strukturaufklärung unbekannter Sterole dar. Im Hinblick auf die geplante Testung potentieller Antimykotika (s. Kapitel 4) hat sich dieses System als besonders geeignet erwiesen, denn es bietet neben einer hohen Empfindlichkeit und einer guten chromatographischen Auflösung strukturnaher Sterole zwei wichtige strukturaufklärende Parameter: Retentionszeiten in hoher Reproduzierbarkeit und Generierung eines „MS-Fingerprints“, welcher in einer Spektrendatenbank abgelegt werden kann und damit eine rasche Identifizierung von Sterolen im Gemisch und in geringen Mengen zulässt.

Das zur Verfügung stehende GC-MS-System ist mit einem automatischen Probengeber versehen, was der Forderung nach einer Routinemethode mit gutem Probendurchsatz entgegenkommt.

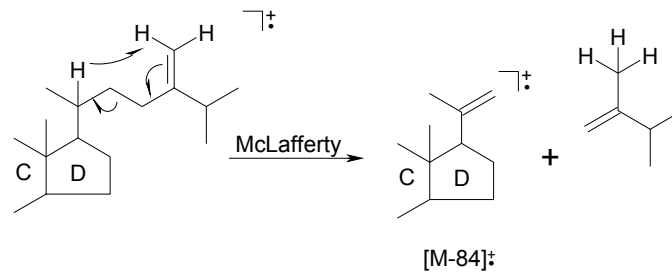
Zu Beginn der Entwicklung der Trennmethode wurde die in der Literatur oft durchgeführte Derivatisierung freier Sterole vor der gaschromatographischen Untersuchung auf seine Notwendigkeit hin geprüft. Es zeigte sich, daß ein Derivatisierungsschritt bei dem entwickelten Temperaturprogramm (s. Experimenteller Teil) nicht erforderlich war. Folglich wurden alle Untersuchungen mit freien Sterolen durchgeführt. Glücklicher Nebeneffekt dabei war, daß die Proben in dieser Form auch für die HPLC-Untersuchungen direkt verwendet werden konnten.

#### 3.5.1 Interpretation von EI-Massenspektren freier Sterole

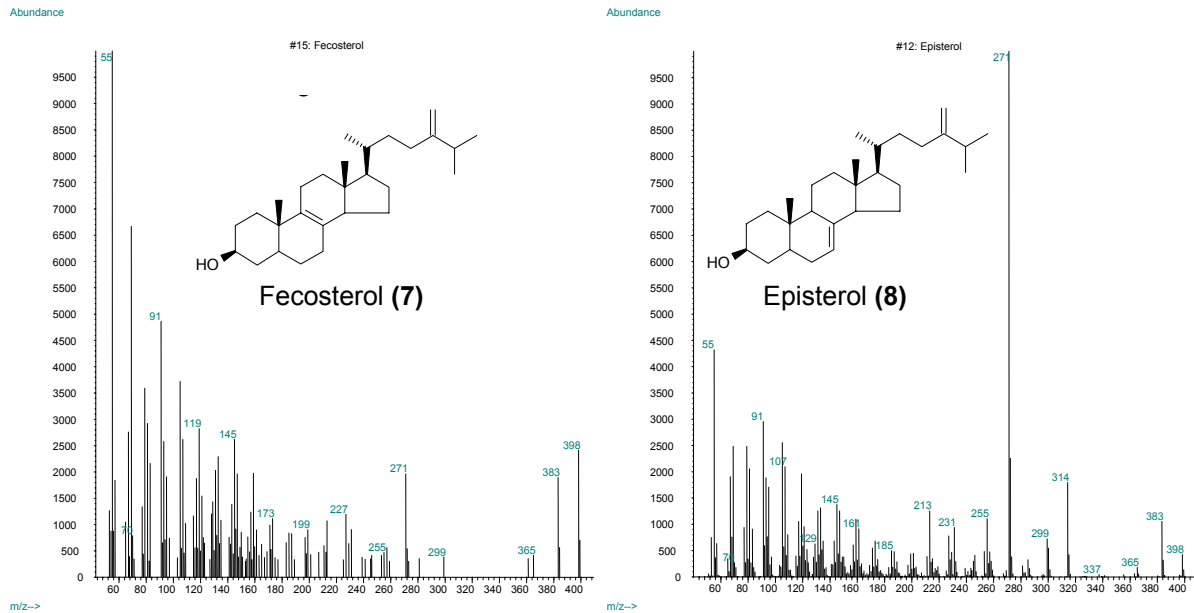
Die massenspektrometrische Detektion der Sterole wurde im EI-Modus (*Electron Impact*) durchgeführt, wobei bei einer standardisierten Ionisierungsenergie von 70 eV eine typische Fragmentierung der Analyten stattfindet, aber auch deren Molekulargewicht noch klar bestimmt werden kann.

Neben dem Molekülion  $[M]^+$  ist bei freien Sterolen oft ein Ion bei  $[M-18]^+$  zu beobachten. Es resultiert aus dem Verlust der  $3\beta$ -Hydroxylgruppe in Form von Wasser. Alternativ ist in vielen Fällen nach Verlust einer Methylgruppe ein  $[M-15]^+$ -Ion zu sehen. Letzteres war bei den gefundenen Sterolen aus Hefefett und auch bei den während der „Testungsphase“ neu gefundenen Sterolen der Fall. Typischerweise zeigen alle Sterole Fragmentierungen, welche sich auf den Verlust der Seitenkette zurückführen lassen. Die resultierenden Signale lassen sich auf die Fragmentierungen  $[M-SC]^+$ ,  $[M-SC-2H]^+$ ,  $[M-SC-H_2O]^+$  und/oder  $[M-SC-H_2O-2H]^+$  zurückführen, wobei „SC“ die Seitenkette symbolisiert. Eine Erklärung für den Verlust von „2H“ konnte in der Literatur nicht gefunden werden, obwohl dieses Phänomen literaturbekannt<sup>59</sup> ist.

Bei der Voraussage, nach welchem der genannten Fragmentierungsmuster ein Sterol seine Seitenkette „verliert“, darf man sich nicht auf die strukturellen Eigenschaften der Seitenkette verlassen; die Lage der Doppelbindung(en) im Ringsystem übt einen enormen Einfluß auf die Fragmentierungen der Seitenkette und auch auf die Intensität dieser Fragmente aus. Ein exzellentes Beispiel dafür geben die Massenspektren von Fecosterol (**7**) und seinem Isomeren Episterol (**8**) im direkten Vergleich (Abbildung 40). Episterol zeigt hierbei ein stabiles Ion bei  $m/z$  271, welches einer  $[M-SC-2H]^+$ -Fragmentierung zugeordnet werden kann. Dieses stellt hier auch den Basispeak (100%) dar. Das ebenfalls bei Episterol zu beobachtende  $m/z$  314 Radikalkation resultiert aus dem Verlust eines Neutralteilchens nach einer McLafferty-Umlagerung in der Sterolseitenkette (Abbildung 39). Dieses  $[M-84]^+$ -Ion ist bei Fecosterol stark unterdrückt - es findet sich nur in geringer Intensität ein  $[M-84-Me]^+$ -Ion bei  $m/z$  299.



**Abbildung 39:** Bildung eines [M-84]<sup>+</sup>-Ions bei  $\Delta^{24(28)}$ -Sterolen nach McLafferty-Umlagerung



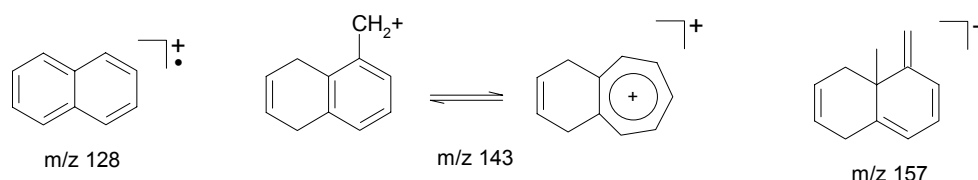
**Abbildung 40:** Einfluß der Position der Doppelbindung im Sterolgrundkörper auf die Seitenkettenfragmentierung

Die Unvorhersehbarkeit, ob ein Sterol ein [M-SC]<sup>+</sup>-Ion oder ein [M-SC-2H]<sup>+</sup>-Ion bildet, erschwert die Aussage, ob sich in der Seitenkette eines unbekanntes Sterols Doppelbindungen befinden, oder ob sie gesättigt ist. Allerdings neigen Sterole, wie 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) oder Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**) mit einer  $\Delta^{22,24(28)}$  doppelt ungesättigten Seitenkette zur Bildung eines stabilen Ions mit m/z 123, was der kompletten Seitenkette entspricht und sich im Signalsatz auch deutlich heraushebt. Den Nachweis für das Vorliegen eines solchen Diensystems muß allerdings das UV-Spektrum bzw. das NMR-Experiment erbringen.

Besonders bei  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterolen wie Ergosterol (**10**), Lichesterol (**12**), 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) und seinem Isomeren Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**), sowie dem Cholesta-5,7,24-trienol (**15**) sind fast keine [M-15]<sup>+</sup>-Fragmente zu beobachten; statt dessen findet sich hier ein [M-15-18]<sup>+</sup>-Ion, welches also die bevorzugte Elimination von Wasser und Methylgruppe in einem Schritt dokumentiert. Dieses [M-Me-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-Fragment ist dann auch dominanter als das Molekülion und stellt meist auch den Basispeak dar. Die eben genannten Sterole zeigen auch ein [M-59]<sup>+</sup>-Fragment, welches nach Verlust von C-1 bis C-3 in Form von C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O als typisch für  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterole anzusehen ist.<sup>59</sup>

Charakteristisch für  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterole ist auch das Auftreten von Ionen mit m/z 128, 143 und 157. Es werden folgende Fragmente postuliert (Abbildung 41).<sup>59</sup>



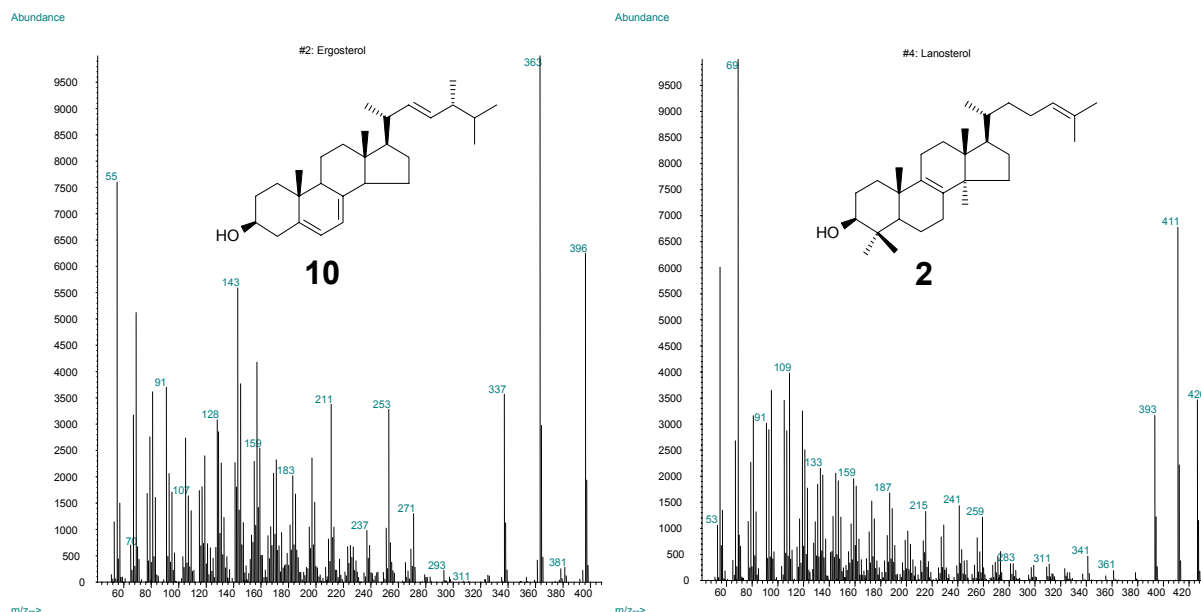


**Abbildung 41: Charakteristische EI-MS Fragmente von  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterolen**

Die erwähnten Ionen ( $m/z$  128, 143, 157) konnten auch bei den  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen **3**, **14** und **17** beobachtet werden, allerdings ist deren Auftreten in diesem Zusammenhang bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Bislang noch nicht literaturbeschrieben ist die aus der Gesamtbetrachtung der charakterisierten Sterole gefundene „Faustregel“, um Sterole mit Seitenkettenmethylierung an C-24 (= Ergostan-Grundgerüst) von Cholestan- oder Lanostangrundkörpern zu unterscheiden. Vergleicht man im Massenspektrum die relativen Intensitäten „I“ der Ionen  $m/z$  55 und 69, so liegt im Falle von  $I_{55}:I_{69} > 1$  ein an C-24 methyliertes Sterol vor, andernfalls ein nicht-methyliertes. Da in der Literatur üblicherweise höhere Massen zur Identifizierung von Sterolen herangezogen werden, wurde dieser Auffälligkeit möglicherweise bislang keine Aufmerksamkeit geschenkt.

Die „Faustregel“ hielt einer nachträglichen Überprüfung anhand von in der NIST-Spektrendatenbank der Firma Shimadzu gelisteten Sterole stand. Ein Beispiel ist in Abbildung 42 gegeben.

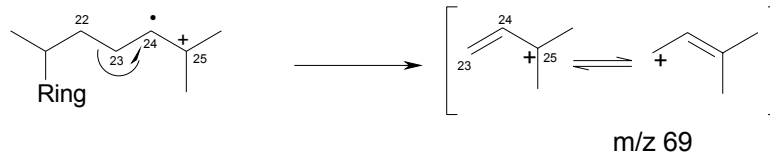


**Abbildung 42: Vergleich der Intensitäten von  $m/z$  55 und 69 als Indiz für C24-Methylierung (links: Ergosterol (10), rechts: Lanosterol (2))**

Lanosterol (**2**) zeigt bei  $m/z$  426 (35%) ein deutliches Molekülion. Typisch für dieses Sterol ist ein  $[M-15]^+$ -Fragment mit der etwa doppelt so hohen Intensität (67%) und einem deutlichen  $[M-Me-H_2O]^+$ -Fragment (32%). Es ist – wie bei allen anderen Sterolen – nicht bekannt, welche der möglichen Methylgruppen für das  $[M-15]^+$ -Fragment verantwortlich ist, jedoch scheinen die C-19- oder C-30-Methylgruppe auf Grund ihrer Lage in Allylstellung zur  $\Delta^8$ -Doppelbindung prädestiniert. Basispeak im Spektrum ist  $m/z$  69. Dieses Ion ist unspezifisch bei allen alicyclischen Verbindungen zu finden und entsteht u.a. nach Allylsplattung zwischen



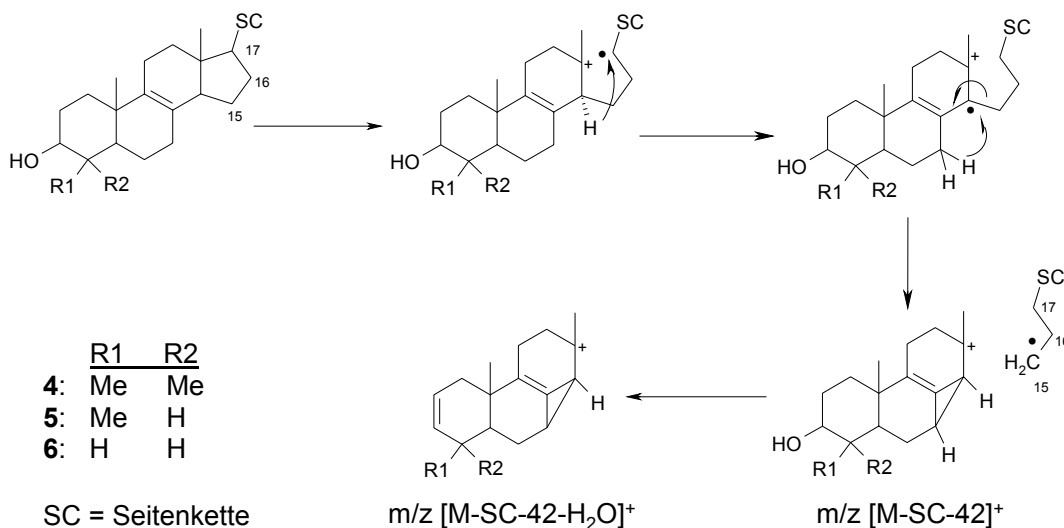
C-22 und C-23 und stellt auch in allen später diskutierten, an C-24 unverzweigten Sterolen den Basispeak oder zumindest ein prominentes Signal dar.



**Abbildung 43: Bildung des charakteristischen  $m/z$  69 – „Isoprenyl“-Fragments von an C-24 unverzweigten Sterolen**

Im EI-MS des 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**) ist der Molekülpeak zugleich der Basispeak. Sowohl Methylabspaltung aus dem Molekülpeak, als auch anschließende  $H_2O$ -Eliminierung sind zu beobachten. Das bei  $m/z$  325 (49%) zu beobachtende Fragment könnte von einem Verlust des C-22 bis C-27 Fragments [M-83-2H] herrühren, allerdings konnten bei anderen  $\Delta^{24}$ -Sterolen keine Entsprechungen gefunden werden. Auch die hervorstechenden Signale bei  $m/z$  313, 298, 283 und 246 entziehen sich leider einer plausiblen Zuordnung. Wie bereits erwähnt konnten typische Signale ( $m/z$  128, 143, 157), die bei allen  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen anzutreffen sind, gefunden werden (vgl. Abbildung 41). Das „Isoprenyl“-Fragment  $m/z$  69 (vgl. Abbildung 43) liefert mit einer Intensität von 88% das nach dem Basepeak größte Signal.

4,4-Dimethylzymosterol (**4**), 4-Methylzymosterol (**5**) und Zymosterol (**6**) zeigen annähernd homologe Massenspektren in den höheren Massenbereichen ( $m/z > 200$ ), wobei die Intensitäten geringfügig variieren. Gegenüber den Molekülonen  $[M]^+$  mit Intensitäten zwischen 38% und 55% und von **4** über **5** nach **6** zunehmenden Intensitäten der  $[M-Me]^+$ -Signale, reichen die  $[M-Me-H_2O]^+$ -Peaks nicht über 10% Intensität hinaus. **4**, **5** und **6** zeigen einen Seitenkettenverlust nach dem Muster „M-SC-2H“. In einem  $[M-SC-42]^+$ -Fragment dokumentiert sich die Abspaltung von C-15, C-16, C-17 und der Seitenkette. Die gebildeten Fragmentionen sind bei  $m/z$  259 (14%) bzw. 245 (15%) bzw. 231 (17%) zu beobachten. Anschließende  $H_2O$ -Eliminierung bildet die entsprechenden  $[M-SC-42-H_2O]^+$ -Ionen. Ein möglicher Mechanismus wird in Abbildung 44 vorgestellt.



**Abbildung 44: Vorgeschlagener Mechanismus für den Verlust der Sterolseitenkette und C15, C16 und C17 des D-Ringes bei  $\Delta^8$ -Sterolen (in Anlehnung an Lit. 59)**

Das  $[M-SC-42]^+$ -Bruchstück wird auch in weiteren  $\Delta^7$ - und  $\Delta^8$ -Sterolen beobachtet (Fecosterol (**7**), Episterol (**8**), Fungisterol (**11**) und Ergosta-8-enol (**16**)) und steht häufig in Konkurrenz mit  $[M-SC-26-H_2O]^+$ , was für eine Seitenkettenabspaltung mitsamt C-16 und C-17, sowie  $H_2O$ -Eliminierung steht.<sup>44</sup> Basispeak ist in allen drei Fällen das Isoprenylfragment  $m/z$  69.

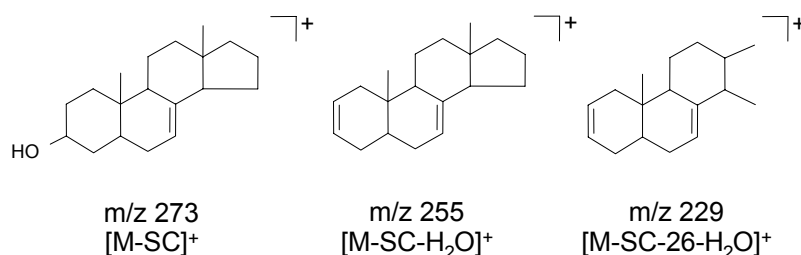
Fecosterol (**7**) zeigt ein Fragmentierungsmuster, das sich von dem von Zymosterol (**6**) in drei Punkten unterscheidet. Zunächst liegt der Molekülpeak  $m/z$  398 (24%) um 14 amu höher (durch die C-24-Methylierung), dies resultiert auch in einem entsprechenden  $[M-Me]^+$ -Signal bei  $m/z$  383 (19%). Im mittleren Massenbereich läßt sich das Signal bei  $m/z$  227 auf ein  $[M-SC-26-H_2O-2H]^+$ -Fragment zurückführen, zudem verliert das im Zymosterol mit 30% deutliche  $[M-SC-42-H_2O]^+$ -Ion bei  $m/z$  213 beim Fecosterol an Intensität (11%). Schließlich läßt sich im unteren Massenbereich der bereits angesprochene „Intensitätswechsel“ zwischen  $m/z$  55 und 69 beobachten. Das  $m/z$  55 Signal stellt auch den Basispeak. Es handelt sich um ein  $C_4H_7^+$ -Fragment, welches unspezifisch bei alicyclischen und olefinischen Verbindungen auftritt, wie auch andere Signale der Reihe  $C_nH_{2n-1}$ , wozu auch  $m/z$  69 oder 83 zu zählen sind.<sup>60</sup>

Auffällige Fragmentensignale von Episterol (**8**) wurden bereits an anderer Stelle (s. S. 40) diskutiert.

24(28)-Dehydroergosterol (**9**) und Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**) zeigen wie auch Ergosterol (**10**), Lichosterol (**12**) und Cholesta-5,7,24-trienol (**15**) die bereits besprochenen intensiven  $[M-Me-H_2O]^+$ - Bruchstücke, während bei **9** und **13** das  $[M-59]^+$ -Fragment gegenüber **10**, **12** und **15** nur schwach ausgeprägt ist. Neben der Tendenz aller fünf Sterole, die Seitenkette nach  $[M-SC-2H]^+$ -Fragmentierung abzuspalten, fällt auf, daß dessen Folgefragment  $[M-SC-2H-H_2O]^+$  bevorzugt ist. Die Tendenz, die Seitenkette mitsamt C-15 bis C-17 unter Wasserverlust abzuspalten ( $[M-SC-42-H_2O]^+$ ), steht dazu in unterschiedlichem Grad in Konkurrenz. Das bei diesen  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterolen charakteristische Auftreten von Ionen mit  $m/z$  128, 143 und 157 wurde bereits erwähnt.

Im unteren Massenbereich fallen bei den beiden Tetraenolen **9** und **13** verstärkt Signale der Reihe  $C_nH_{2n-3}$  auf. Diese sind typisch für polyolefinische Strukturen und treten daher bei diesen Sterolen mit größerer Signalintensität auf, als bei den Trienolen. So ist zu erklären, warum bei **9** und **13** die Signale bei  $m/z$  67 bzw. 81 gegenüber  $m/z$  69 bzw. 83 stärker gewichtet sind.

Fungisterol (**11**) und Ergosta-8-enol (**16**) zeigen in weiten Teilen identische Signale von gleicher Intensität, allerdings ist bei **11** das  $[M-SC-H_2O]^+$ -Ion mit  $m/z$  255 deutlich intensiver und stellt sogar den Basispeak, während bei **16** das  $[M-Me-H_2O]^+$ -Signal stärker profiliert ist. Die nachfolgende Abbildung zeigt einige typische Fragmente von **11** und **16**.



**Abbildung 45:** Bei  $\Delta^7$ - und  $\Delta^8$ -Sterolen zu beobachtende Fragmentierungen<sup>59</sup>

Ignosterol (**14**) zeigt eine bei allen  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen zu beobachtende Dominanz von Signalen im höheren Massenbereich. Der Molekülpeak von  $m/z$  398 entspricht dem Basispeak. Die  $[M-Me]^+$ - und  $[M-Me-H_2O]^+$ -Fragmentierungen sind ebenfalls prominent. Es werden die bereits genannten Signale bei  $m/z$  128, 143 und 157 beobachtet.

Cholesta-5,7,24-trienol (**15**) zeigt ein mit dem Ergosterol identisches UV-Spektrum und ein ähnliches Massenspektrum. Jedoch sind in diesem Fall  $[M]^+$ ,  $[M-Me]^+$ ,  $[M-Me-H_2O]^+$  und  $[M-59]^+$ , um den Betrag von 15 amu niedriger, da hier eine Cholestansseitenkette vorliegt. Dies

bestätigt auch das m/z 55:69-Verhältnis. Die Lokalisierung der Seitenkettendoppelbindung in  $\Delta^{24}$ -Position erfolgte über  $^1\text{H-NMR}$ .

Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**) zeigt auffällig viele prominente Ionen.  $[\text{M}]^+$  und  $[\text{M-Me}]^+$  sind mit m/z 396 (84%) bzw. m/z 381 (76%) sehr intensiv. Das nach Wasserabspaltung resultierende  $[\text{M-Me-H}_2\text{O}]^+$ -Ion ist dagegen relativ schwach. Ein Signal bei m/z 353 (58%) deutet auf den Verlust der terminalen Isopropylgruppe hin, wenngleich  $\alpha$ -Spaltung in Nachbarschaft zu einer Olefinbindung (hier:  $\Delta^{24(28)}$ ) allgemein unüblich ist. Ein Signal bei m/z 335 (18%) könnte das Folgefragment nach Wasserverlust darstellen. Im Gegensatz zu anderen  $\Delta^{24(28)}$ -Sterolen, erfolgt die nach McLafferty-Umlagerung resultierende teilweise Fragmentierung der Seitenkette nicht vom Molekülion aus; in diesem Fall kann  $[\text{M-Me}]^+$  als dessen Ausgangspunkt angesehen werden. Das entstehende Fragment bei m/z 297 stellt auch den Basispeak dar. Neben einem  $[\text{M-SC}]^+$ -Ion bei m/z 271 (26%) kann auch ein weiteres Signal bei m/z 270 (42%) beobachtet werden. Die geradzahlige Fragmentmasse spricht für ein Radikalkation, welches nach einem  $[\text{M-SC-2H}]$ -Mechanismus gebildet wurde und offensichtlich den Stabilisierungsversuchen der vergleichsweise hoch ungesättigten Partialstruktur der Ringe C und D zuzurechnen ist. Von diesem Fragment leiten sich dann die Folgefragmente m/z 255 (60%) und 237 (38%) ab, welche den Verlust von Methyl bzw. Methyl + Wasser dokumentieren. Weiterhin werden die bereits genannten Signale bei m/z 128, 143 und 157 beobachtet.

Tabelle 4 faßt die besprochenen, zuordenbaren Signale aller untersuchten Sterole zusammen:

Sterol:	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Fragmentierung</b>								
[M] <sup>+</sup>	426 (35)	410 (100)	412 (38)	398 (55)	384 (47)	398 (24)	398 (4)	394 (71)
[M-Me] <sup>+</sup>	411 (67)	395 (50)	397 (20)	383 (45)	369 (47)	383 (19)	383 (11)	379 (3)
[M-Me-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	393 (32)	377 (14)	379 (8)	365 (9)	351 (7)	365 (4)	365 (2)	361 (100)
[M-59] <sup>+</sup>								335 (8)
[M-84] <sup>+</sup>							314 (17)	
[M-84-Me] <sup>+</sup>						299 (6)	299 (7)	
[M-SC] <sup>+</sup>								
[M-SC-2H] <sup>+</sup>			299 (8)	285 (13)	271 (17)	271 (20)	271 (100)	269 (30)
[M-SC-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>							255 (11)	253 (28)
[M-SC-H <sub>2</sub> O-2H] <sup>+</sup>								251 (48)
[M-SC-42] <sup>+</sup>			259 (14)	245 (15)	231 (17)	231 (10)	231 (9)	
[M-SC-26-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>			257 (10)	243 (15)	229 (19)			
[M-SC-26-H <sub>2</sub> O-2H] <sup>+</sup>						227 (12)	227 (8)	
[M-SC-42-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>			241 (17)	227 (28)	213 (30)	213 (11)	213 (13)	211 (38)
[M-SC-52] <sup>+</sup>	259 (12)							
[M-SC-52-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	241 (15)							
m/z = 157		157 (23)						157 (38)
m/z = 143		143 (29)						143 (66)
m/z = 128		128 (21)						128 (37)

Sterol:	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>Fragmentierung</b>								
[M] <sup>+</sup>	396 (62)	400 (90)	396 (36)	394 (48)	398 (100)	382 (45)	400 (100)	396 (84)
[M-Me] <sup>+</sup>		385 (31)		379 (1)	383 (87)	367 (5)	385 (43)	381 (76)
[M-Me-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	363 (100)	367 (5)	363 (100)	361 (100)	365 (29)	349 (80)		363 (10)
[M-59] <sup>+</sup>	337 (36)		337 (10)	335 (1)		323 (30)		
[M-84] <sup>+</sup>								312 (5)
[M-84-Me] <sup>+</sup>					299 (5)			297 (100)
[M-SC] <sup>+</sup>	271 (12)	273 (28)	271 (20)	269 (11)	271 (26)		273 (22)	
[M-SC-2H] <sup>+</sup>						269 (5)		
[M-SC-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	253 (33)	255 (100)	253 (29)	253 (17)			255 (20)	
[M-SC-H <sub>2</sub> O-2H] <sup>+</sup>				251 (12)		251 (12)		
[M-SC-42] <sup>+</sup>		231 (28)					231 (15)	
[M-SC-26-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		229 (22)					229 (26)	
[M-SC-26-H <sub>2</sub> O-2H] <sup>+</sup>								
[M-SC-42-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	211 (34)	213 (37)	211 (23)	211 (18)		211 (24)	213 (32)	211 (19)
[M-SC-52] <sup>+</sup>								
[M-SC-52-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>								
m/z = 157	157 (42)		157 (28)	157 (24)	157 (16)	157 (32)		157 (30)
m/z = 143	143 (56)		143 (33)	143 (39)	143 (22)	143 (55)		143 (44)
m/z = 128	128 (32)		128 (18)	128 (30)	128 (13)	128 (27)		128 (38)

**Tabelle 4:** EI-MS Fragmenttabelle der identifizierten Sterole, Angaben in Klammern: prozentuale Intensität (Erläuterungen im Text)

### 3.5.2 Massenspektrometrische Untersuchung von Squalen

Squalen (**1**) zeigt als Polyolefin im Massenbereich von  $m/z < 80$  Signale der Monoen-Reihe  $C_nH_{2n-1}$  mit  $m/z$  55 (8%) und 69 (100%). Im höherliegenden Massenbereich dominieren Fragmente der Polyen-Reihe  $C_nH_{2n-3}$  mit  $m/z$  81 (50%) und 95 (13%). Darüber hinaus nehmen die Intensitäten stark ab. Das Molekülion bei  $m/z$  410 zeigt eine Intensität von 0,2%. Die Identität konnte nach Datenbankabgleich gesichert werden, zumal auch Retentionsverhalten und UV-Spektrum ( $\lambda_{max} = 203$  nm), sowie spätere Inhibitionsversuche mit Squalenepoxidase-Inhibitoren unter Anreicherung von Squalen, die Zuordnung untermauerten.

### 3.5.3 Einfluß der Struktur auf die Retention bei gaschromatographischer Trennung

Die zur Trennung von Sterolgemischen eingesetzte Methode beruht auf der Trennung an einer unpolaren DB-5 Kapillarsäule mit einem Temperaturgradienten, der bei 55 °C einsetzt und im Verlaufe von 25 min. eine Endtemperatur von 300 °C erreicht. In Vorversuchen bei isothermer Arbeitsweise konnte festgestellt werden, daß freie Sterole ab Temperaturen von > 255 °C „GC-gängig“ sind. Allerdings wurde dabei auch beobachtet, daß die Signale bei iso-

thermer Trennung stark verbreitert sind und somit auch keine akzeptablen Trennergebnisse erzielt werden können.

Der Grund dafür liegt in der explosionsartigen Verdampfung des Lösungsmittels, in welchem die Analyten gelöst und dann injiziert werden. Das sich beim Verdampfungsprozeß ausdehnende Gasvolumen beträgt bei üblichen Lösungsmitteln (Ethanol, Ethylacetat,...) das bis zu 400-fache (!) des Flüssigvolumens. Bei hohen Säulentemperaturen bewirkt diese rasche Ausdehnung entlang der Kapillarsäule eine Verstreuung der Analyten über einen größeren Bereich. In der Folge ist ein breites und daher flaches Analytsignal zu beobachten. Durch Injektion der Probe bei einer Säulentemperatur, welche etwa 10 °C unterhalb der Siedepunktes des Lösungsmittels liegt, kann dieser unerwünschte Effekt vermieden werden und die Analyten „liegen“ konzentriert in einem engen Bereich der Säule, bevor sie im nachfolgenden Temperaturprogramm in der Reihenfolge ihrer Siedepunkte verdampfen. Gleichzeitig bewirkt dieser „fraktionierte Start“ eine Vortrennung des Analysengemisches.

Im Vergleich zweier  $\Delta^{5,x}$  Sterole, welche sich nur bezüglich der  $\Delta^7$  bzw.  $\Delta^8$ -Doppelbindung strukturell unterscheiden, wie z.B. Ergosterol (**10**) und Lichesterol (**12**), finden sich fast identische Massenspektren. Eine Unterscheidung ist wie bereits erwähnt nur bei genauerer Betrachtung der Intensitäten der Fragmente zu treffen. Allerdings konnte hier auch die Beobachtung gemacht werden, daß solche Isomerenpaare (**10/12** bzw. **9/13**) gut gaschromatographisch getrennt werden, wobei das  $\Delta^{5,8}$ -Sterol bei der angewandten Methode um ca. 0,40 min vor seinem  $\Delta^{5,7}$ - Isomer eluiert.

Eine ähnliche Beobachtung kann auch beim Vergleich von Fecosterol (**7**) und Episterol (**8**) gemacht werden. Hier eluiert das  $\Delta^8$ -Sterol Fecosterol 0,55 min früher. Als unmöglich hat sich dagegen die gaschromatographische Trennung von Fecosterol und Ignosterol (**14**) erwiesen, die bei identischer Retentionzeit eluieren. Da beide Sterole auch die gleichen Molekülmassen besitzen, ist über GC-MS nicht eindeutig bestimmbar, ob Peakreinheit vorliegt. In diesem Fall bietet sich der Einsatz von HPLC-DAD oder HPLC-MS an, da flüssigchromatographisch eine Trennung möglich ist.

Hinsichtlich des Einflusses einer zusätzlichen  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung auf die Retention bei ansonsten strukturgleichen Sterolen bietet sich der Vergleich zwischen 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) und Ergosterol (**10**) an. Die Einführung der  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung bewirkt eine Erhöhung der Retentionszeit um ca. 0,40 min. Analog gilt das für das Paar Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**) und Ergosta-5,8,22,-trienol (Lichesterol) (**12**), mit dem Resultat, daß **10** und **13** bei gleichzeitigem Vorkommen in der Probe coeluieren, da sich die jeweiligen *shift*-Effekte von  $\Delta^{7 \rightarrow 8}$  Isomerisierung („-0,40 min“) und zusätzlicher  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung („+0,40 min“) genau aufheben (vgl. Abbildung 63).

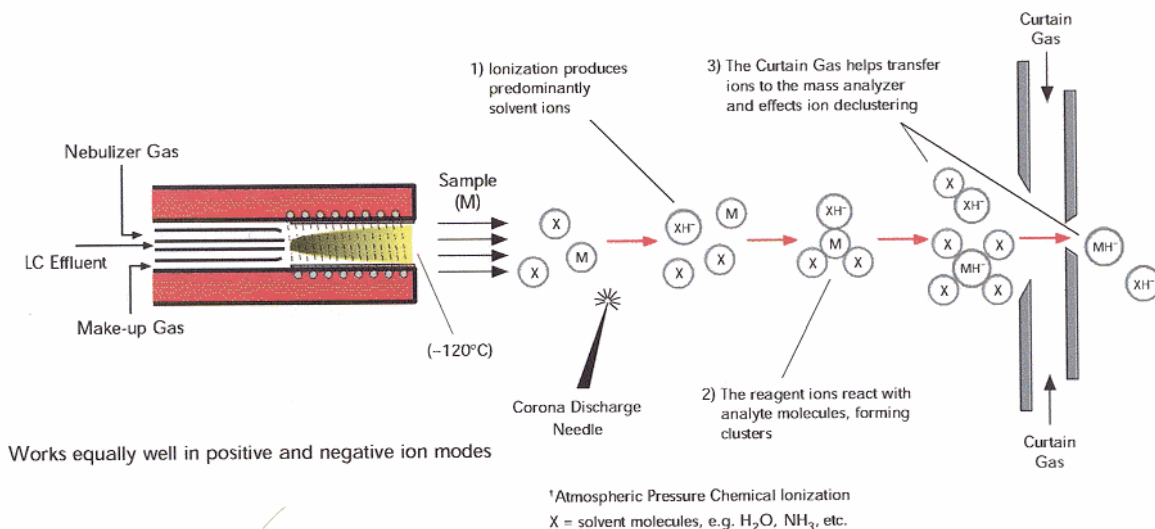
Der Einfluß von C-4-Methylierung auf die Retentionszeit läßt sich an der homologen Reihe Zymosterol (**6**) ( $t_R = 20,2$  min) 4-Methylzymosterol (**5**) ( $t_R = 21,0$  min) und 4,4-Dimethylzymosterol (**4**) ( $t_R = 22,5$  min) demonstrieren. Die Einfügung einer  $\Delta^{14}$ -Doppelbindung zum 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**) ( $t_R = 22,3$  min), bewirkt gegenüber **4** nur eine geringe Retentionszeitverkürzung. Im Vergleich dazu fällt gegenüber **4** eine zusätzliche Methylierung in C-14-Position (Lanosterol (**2**) ( $t_R = 22,2$  min)) nur unwesentlich mehr ins Gewicht.

### 3.6 LC-MS/MS Grundlagen

Wie bei der GC kann auch bei der HPLC ein Massenspektrometer als empfindlicher und selektiver Detektor verwendet werden. Die Kopplung zwischen HPLC und MS ist jedoch erheblich aufwendiger und schwieriger als eine GC-MS-Kopplung. Die Probleme liegen in den relativ großen Flüssigkeitsströmen der HPLC. Nach dem Verdampfen entstehen entsprechend große Dampfvolumina. Würde man den Dampf direkt und vollständig in das MS einbringen, so würde das dort anliegende Hochvakuum zusammenbrechen. Ein weiteres Problem liegt in der häufig geringeren Flüchtigkeit von Substanzen, die in der HPLC getrennt werden. Da diese nicht immer in die Gasphase gebracht und dann ionisiert werden können (z.B. Proteine, Zucker,...) mußten beim Design der Ionenquelle neue Wege beschritten werden.

Als Kopplungsverfahren haben sich heute die APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) und die AP-ESI (*AP Electro Spray Ionization*) durchgesetzt. Bei beiden Varianten erfolgt – im Unterschied zur ElectronImpact-Ionisation beim GC-MS – die Ionisation des Analyten unter Normaldruck. Die ionisierten Analyten werden durch einen Stickstoffvorhang (*curtain-gas*) und mehrere Linsensysteme in den Hochvakuumteil des Gerätes gebracht.

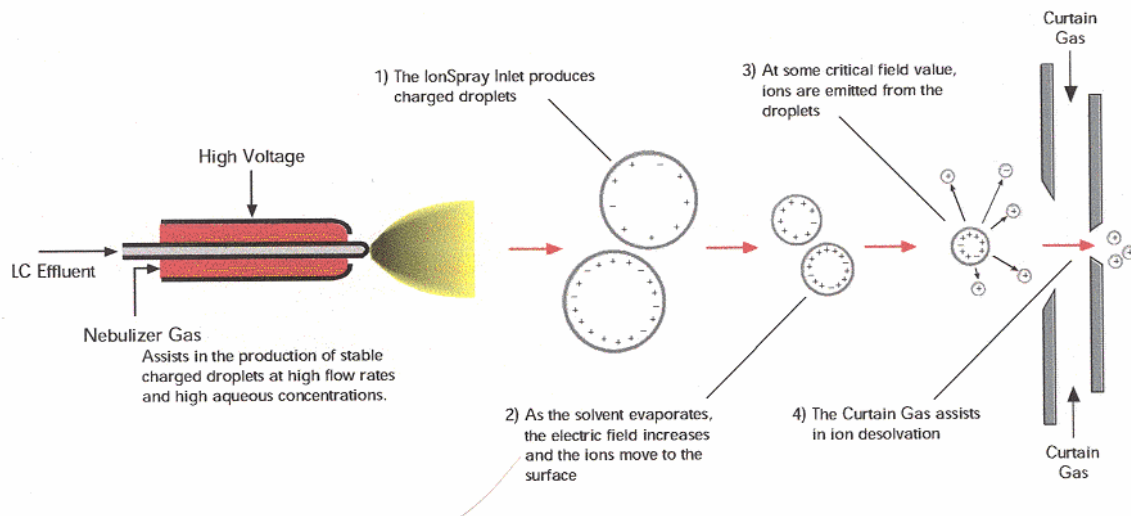
Bei APCI werden die Analyten und das Eluens nach kurzem Erhitzen versprüht und die Ionisierung des Analyten erfolgt erst im Anschluß durch Sekundärionisation des als „Reaktandgas“ wirkenden Eluens, während dieses weiter aktiv durch das entgegenströmende „Curtain-gas“ getrocknet wird (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Erzeugung von Molekülionen in einer APCI-Quelle<sup>61</sup>**

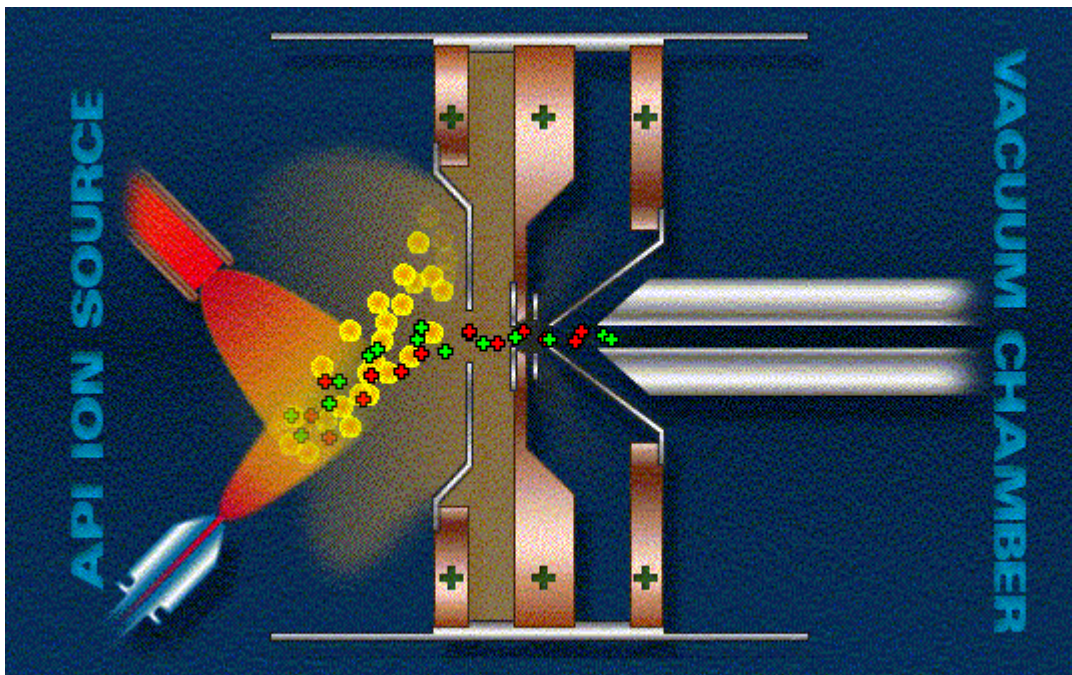
Bei ESI werden das Eluens und der Analyt einem elektrischen Feld ausgesetzt und erst dann versprüht. Die geladenen Tröpfchen verringern im Gegenstrom des „Curtaingases“ durch Verdunstung des Eluens ihre Größe, was eine Erhöhung der Ladungsdichte bewirkt. An einem kritischen Punkt ist die Ladungsdichte so hoch, daß der kleine Tropfen „gesprengt“ wird und geladene Analytionen entläßt (Abbildung 47).





**Abbildung 47: Erzeugung von Molekülionen in einer ESI-Quelle<sup>61</sup>**

Da sowohl APCI als auch ESI unter Normaldruck erfolgen, die Quardropoleinheit aber unter Hochvakuum arbeitet, müssen die in der Ionenquelle generierten Analytionen durch eine „Druckschleuse“ transportiert werden, das Curtaingas. Dieses besteht aus  $N_2$  und wird zwischen der Curtainplate (der Abgrenzung zur Ionenquellenseite) und dem Orifice (der Abgrenzung zur Vakuumseite) in dem Maße zur Normaldruckseite ausgeblasen, daß das Vakuum keine (kontaminierte) Außenluft einsaugen kann. Die ungeladenen und zu leichten Lösungsmittelmoleküle aus der Probe oder dem HPLC-Laufmittel können diesen  $N_2$ -Vorhang nicht passieren. Die ionisierten Analyten hingegen werden auf Grund ihrer Ladung und des entgegengesetzten elektrischen Potentials der inneren Linsen durch den  $N_2$ -Vorhang gezogen und dort beschleunigt (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Schematische Darstellung des Ionentransfers von der Normaldruckseite in das Hochvakuum<sup>61</sup>**

APCI und ESI sind sehr schonend und dadurch auch thermolabilen Substanzen zuträglich. Letzteres trifft vor allem bei der ESI zu, da die Ionisation bei Raumtemperatur erfolgt.

Beide Ionisierungsmethoden erfordern allerdings ein gewisses Mindestmaß an Polarität bzw. funktionellen Gruppen beim Analyten. Je höher funktionalisiert der Analyt ist, desto weniger drastisch können die Ionisierungsparameter gewählt werden. Gegenüber der EI-Ionisierung, die häufig bei GC-MS Anwendung findet, und in der Lage ist, praktisch alles zu ionisieren, können APCI und ESI Moleküle wie z.B. Naphtalin oder Toluol nicht „knacken“.

ESI produziert mitunter „multi-charged“ Ionen. Dieser Effekt wird ausgenutzt um Proteine oder Polysaccharide zu analysieren, die ein vielfach höheres Molekulargewicht aufweisen, als das Gerät bei einfacher Ionisierung des Analyten messen könnte. Beispielsweise darf ein 17-fach geladenes Protein bei einem geräteseitigen Meßbereich von 10-1500 amu bis zu 25,5 kD schwer sein.

Zur eigentlichen Bestimmung der Molekülmassen und der Molekülfragmente stehen die Massenfilter Quadrupol, Iontrap (Ionenfalle) und TOF (Time of Flight) zur Verfügung. Einige Hersteller bieten auch Hybridsysteme an (SingleQuad-TOF).

Die häufigsten Varianten sind SingleQuad-, Iontrap- oder TripleQuad-Geräte.

Während die SingleQuadrupol-Geräte als robuster und nachweisempfindlicher gelten und daher bevorzugt in der Qualitätskontrolle zum Einsatz kommen, dienen Iontrap-Detektoren in der Forschung oft der Strukturaufklärung neuer Substanzen, da sie die Möglichkeit bieten  $MS^n$  – Spektren zu generieren ( $n = 2-11$ ).

TripleQuad-Geräte vereinen die Vorteile der Quadrupoltechnologie mit der Möglichkeit immerhin  $MS^2$  durchzuführen, was eine enorme Selektivitätssteigerung gegenüber einem SingleQuad mit sich bringt. Der vordergründige Widerspruch, daß ein *TripleQuad*-MS mit drei massenselektiven Filtern nicht  $MS^3$ , sondern „nur“  $MS^2$  schafft, erklärt sich mit der Tatsache, daß der mittlere Quadrupol (Q2) keinen Massenfilter, sondern eine Kollisionszelle darstellt. Das Massensfiltersystem des in dieser Arbeit verwendeten API2000-TripleQuad-MS der Firma Applied Biosystems ist nachfolgend schematisch dargestellt (Abbildung 49).

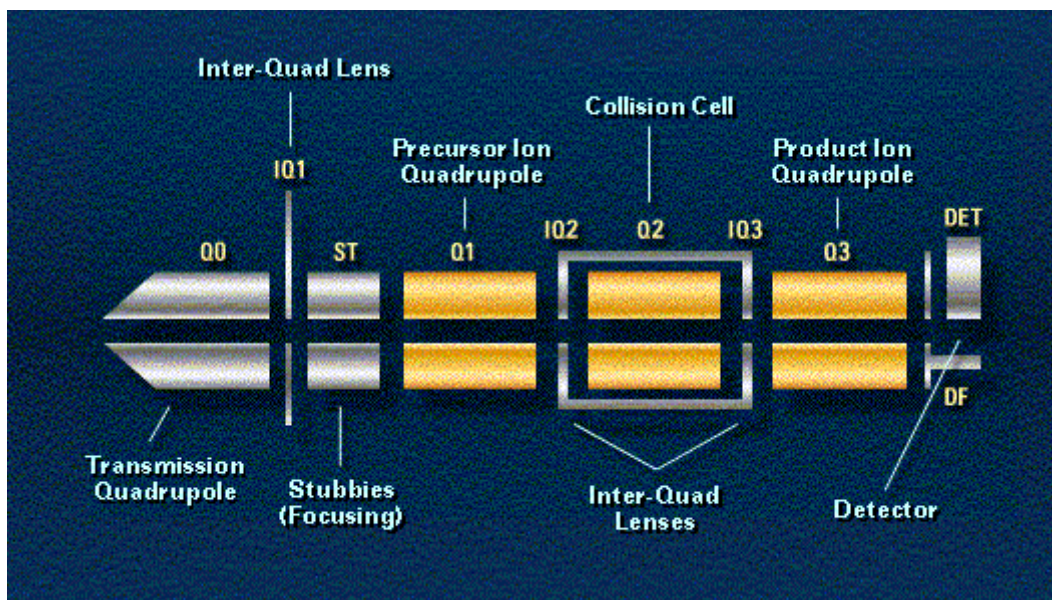


Abbildung 49: Das Massensfiltersystem eines TripleQuad-MS (API2000)<sup>61</sup>

In obiger Abbildung ist der Hochvakuumteil mit dem Massensfiltersystem und der Detektoreinheit, sowie (links von Q1) fokussierende Linsen zu sehen. Auch zwischen den Quadrupolen sind Linsensysteme, die der Fokussierung dienen (Inter-Quad Lenses). Je nach Erfordernis kann das Gerät im  $MS$ -Modus, d.h. mit aktiviertem Q1 und auf „Durchlaß“ gestellten



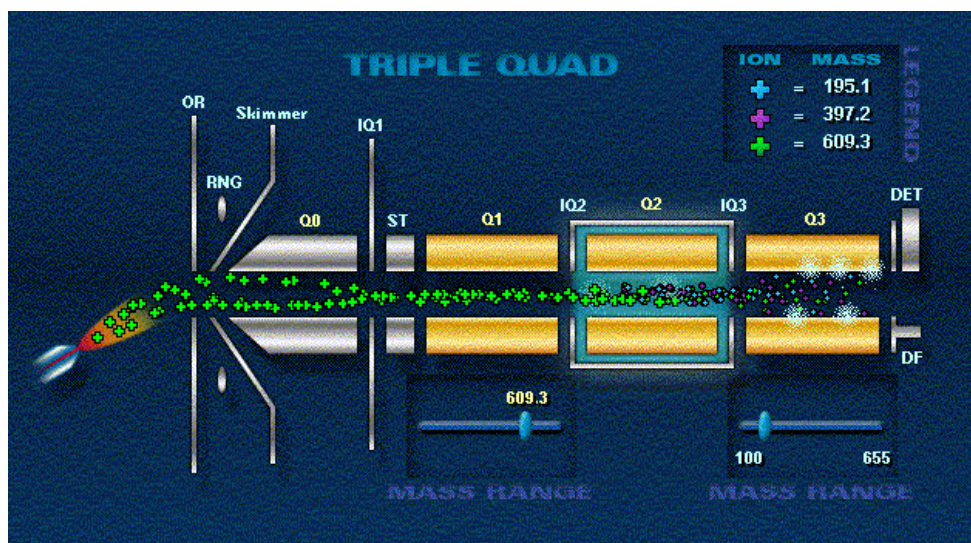
Q2 und Q3, oder aber im MS/MS-Modus, d.h. mit aktivierten Q1, Q2 und Q3 betrieben werden. Für die Quadrupole Q1 und Q3 besteht – wie üblich – die Wahl zwischen Scan-Modus oder SIM-Modus (Single Ion Monitoring). Nachdem diese Modi für jeden Quadrupol unabhängig gewählt werden können, resultieren im MS/MS-Modus vier Kombinationsmöglichkeiten, welche jeweils für bestimmte analytische Aufgaben geeignet sind. Nimmt man die zwei Alternativen des MS-Modus hinzu, so ergeben sich die sechs Grundmodi eines TripleQuad-Gerätes.

Modus	Q1- Status	Q3 - Status
Scan	Sweep	Through
SIM (Single Ion Monitoring)	Fix	Through
Product-Ion	Fix	Sweep
Precursor-Ion	Sweep	Fix
Neutral Loss Scan	Sweep	Sweep
MRM (Multi Reaction Monitoring)	Fix	Fix

**Tabelle 5: Verfügbare Modi eines TripleQuad-Massenspektrometers**

Die verschiedenen Modi sollen kurz erläutert werden:

- **Scan:** Massenfilter Q1 deckt einen gewählten Massenbereich ab und erzeugt zu jedem Zeitpunkt des chromatographischen Laufes ein Massenspektrum.
- **SIM:** Q1 ist auf eine oder mehrere definierte Massen beschränkt und ist für andere Massen „blind“. Aus der langen Meßzeit für die gesuchten Signale und dem Ausblenden von Untergrund resultiert hohe Empfindlichkeit durch hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis.
- **Product-Ion:** Q1 selektiert aus der Probe alle Ionen, welche eine definierte Masse aufweisen. Nur diese gelangen in die mit Kollisionsgas ( $N_2$ ) gefüllte Kollisionszelle Q2, werden fragmentiert und die daraus resultierenden Fragmente in Q3 gescannt. Somit sind alle durch Q3 abgebildeten Signale Tochterionen des in Q1 selektierten Ions. Vorteil: Analyten müssen nicht chromatographisch getrennt werden, um von ihnen saubere Massenspektren zu erhalten, solange die einzelnen Komponenten nicht dieselbe Masse haben.



**Abbildung 50: Product-Ion-Scan<sup>61</sup>**

- **Precursor-Ion:** Wird genutzt, um in der Probe alle strukturell verwandten Analyten zu identifizieren, die dasselbe (charakteristische) Fragment nach Fragmentierung in Q2 aufweisen. Dabei ist Q3 fest auf das bzw. die gesuchte(n) Fragment(e) eingestellt, während Q1 alle Analyten des in Frage kommenden Massenbereiches passieren läßt und im Erfolgsfall die Masse des Analyten vor der Fragmentierung angibt.
- **Neutral Loss:** Analyten, welche derselben Substanzklasse angehören und typischerweise während der Fragmentierung in Q2 das gleiche Neutralteilchen „verlieren“ können identifiziert werden, indem Q1 und Q3 *parallel* im Abstand der Neutralteilchenmasse einen Massenbereich scannen.
- **MRM:** Q1 und Q3 sind festgesetzt. Extrem selektiv, der gesuchte Analyt muß einen definierten Massenübergang erzeugen, um registriert zu werden. Extrem nachweisempfindlich, da praktisch alles Untergrundrauschen ausgefiltert wird. Setzt Kenntnis des intensivsten und charakteristischsten Massenübergangs durch ein vorheriges Product-ion-Experiment voraus.

Unabhängig von der Wahl der Massensfilter-Kombination erfolgt die eigentliche Registrierung der Molekülionen bzw. der Fragmente durch einen Elektronenvervielfacher.

### 3.7 Sterolanalytik mit LC-MS/MS

Der in dieser Arbeit überwiegende Vorteil eines LC-MS-Systems liegt in der Massendetektion nach flüssigchromatographischer Trennung. Bis zur Anwendung dieser Technik konnten für die Strukturaufklärung von Sterolen wichtige Informationen nicht geklärt werden:

1. Welches UV-Spektrum aus dem HPLC-DAD-Chromatogramm ist welchem MS-Spektrum aus der GC-MS zuzuordnen?
2. Gibt es in der HPLC Coelutionen von Sterolen, welche über den DAD nicht erkannt werden?
3. Gibt es in der GC-MS Coelutionen von Sterolen gleicher Massen?

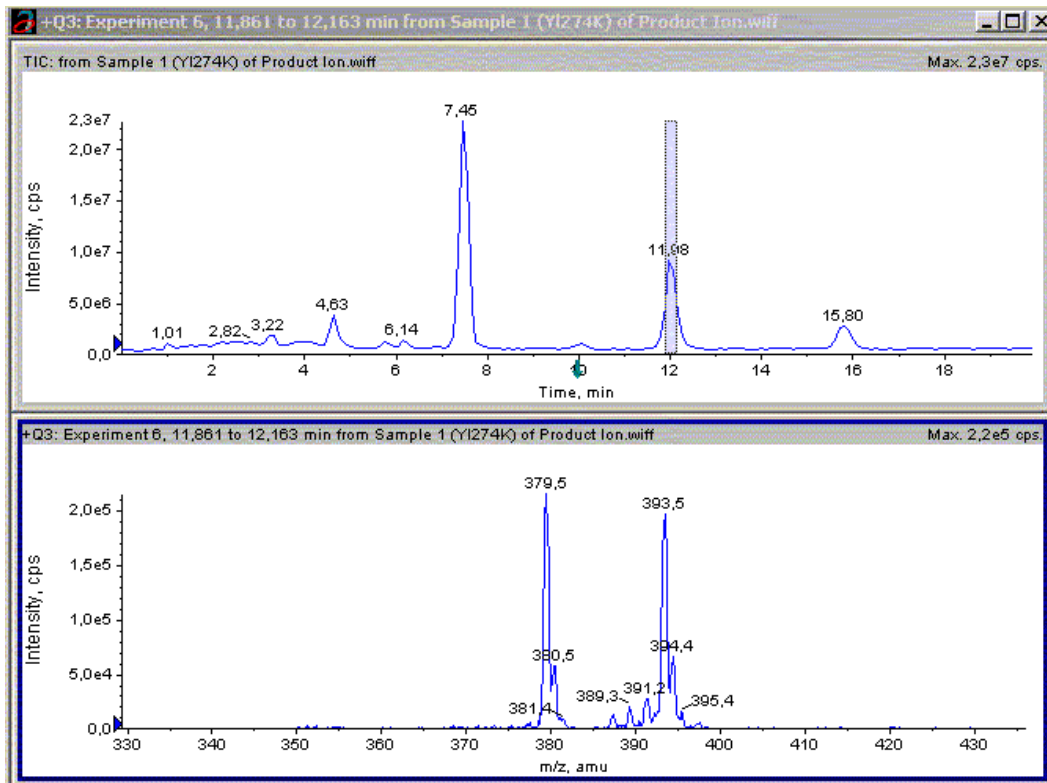
Es wird deutlich, daß mit Hilfe der LC-MS *theoretisch* ein Brückenschlag möglich ist, welcher die aus HPLC-DAD und GC-MS gewonnenen Informationen sicher zu ein und derselben Substanz zuordnen kann. Bislang war die klare Zuordnung nicht möglich, wenn man - wie bei den in Kapitel 4 ausschließlich vorliegenden – Sterolmischungen untersucht, da natürlich die unterschiedliche Elutionsreihenfolge bei GC und HPLC infolge anderer Trennmechanismen keine Zuordnung erlaubte.

Bei der Umsetzung dieses theoretischen Ansatzes wurde schnell klar, daß die strukturellen Vorgaben von *underivatisierten* freien Sterolen nahe an der Grenze der „Mindestfunktionalisierung“ sind, die von den sanften Ionisierungsmethoden APCI und ESI gefordert sind. Daher war es auch nicht verwunderlich, daß sich diesbezüglich kaum verwertbare Literatur auffinden ließ.

Die Entwicklung einer zur Klärung der genannten Fragen geeigneten Ionisierungsmethode erfolgte unter der Vorgabe, daß die in der HPLC verwendeten Trennbedingungen nicht verändert werden sollen. Damit sollte sichergestellt werden, daß die in der HPLC-DAD-Analytik beobachteten Retentionszeiten vergleichbar bleiben.

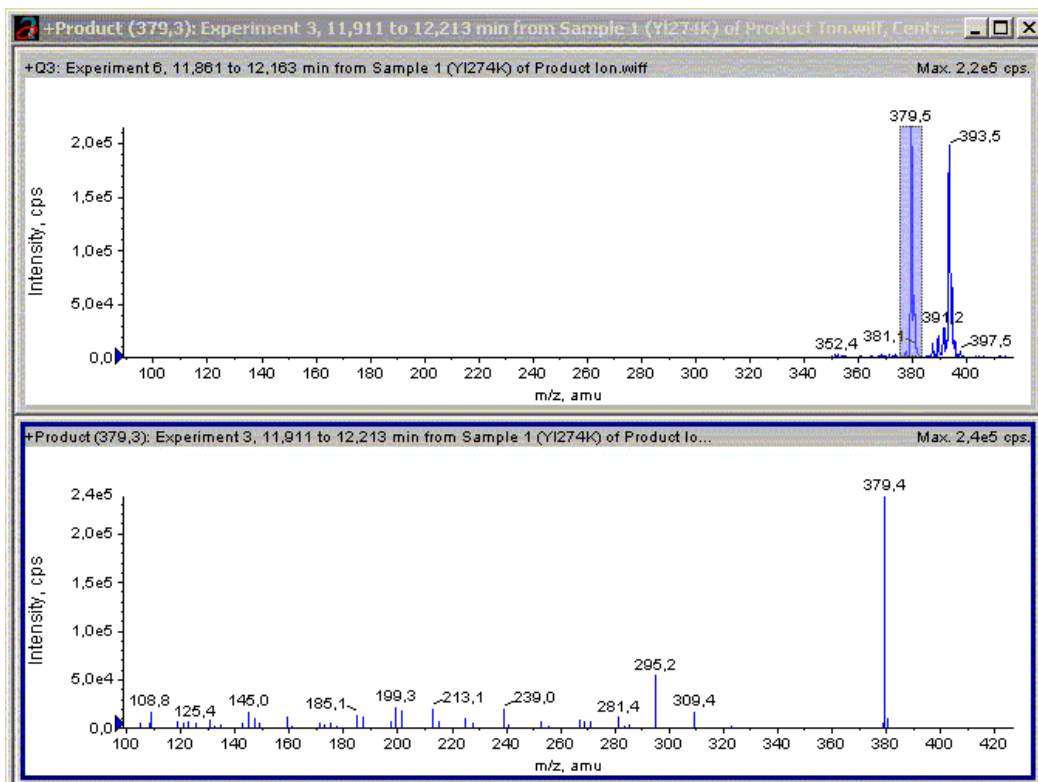
Nach erfolglosen Versuchen einer Ionisierung unter ESI-Bedingungen konnte nach Wechsel auf die APCI-Quelle eine für alle getesteten Sterole erfolgreiche Ionisierung bewerkstelligt werden. Dieser Wechsel hatte zudem den Vorteil, daß bei APCI die bei der HPLC-Methode verwendete Flußrate von 1 ml/min beibehalten werden konnte, ebenso wie die verwendete Säule. Im Vergleich dazu liegt die übliche Flußrate bei ESI bei < 0,5 ml/min und dies hätte auch einen Wechsel auf eine engere Säule erfordert.

Auch unter APCI im positiven Modus (APCI+) waren die freien Sterole nur unter drastischen Ionisierungsbedingungen analysierbar. Dabei mußte die Ionenquellentemperatur auf den Höchstwert von 500 °C gesetzt werden. Keines der untersuchten Sterole zeigte das normalerweise zu erwartende  $[M+1]^+$ -Molekülion. Statt dessen war durchweg das  $[M+1-H_2O]^+$ -Ion zu beobachten, welches in Folge der hohen Ionenquellentemperatur nach Dehydratisierung gebildet wurde. Im Allgemeinen wurden – selbst bei anlegen einer höheren Ionisierungsspannung – keine Fragmente beobachtet. Einige Sterole, wie z.B. Ergosterol oder 24(28)-Dehydroergosterol zeigten zudem jedoch ein  $[M+1-4]^+$ -Signal, welches möglicherweise ein Artefakt darstellt, oder einen Verlust von „4H“ dokumentiert, dessen Mechanismus aber unbekannt ist (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** oben: Chromatographische Trennung von 24(28)-Dehydroergosterol ( $t_R=7,45$  min), Ergosterol ( $t_R=11,98$  min) und Cholesterol (IS) ( $t_R=15,80$  min)  
unten: Auftreten von  $[M+1-H_2O]^+$  und  $[M+1-4]^+$  bei Ergosterol ( $M_R = 396$ )

Bei Anwendung eines Product-Ion Experiments auf das bei Ergosterol gebildete  $[M+1-H_2O]^+$ -Ion konnte es in Q2 weiter fragmentiert werden und man erhielt das APCI-Massenspektrum (Abbildung 52).

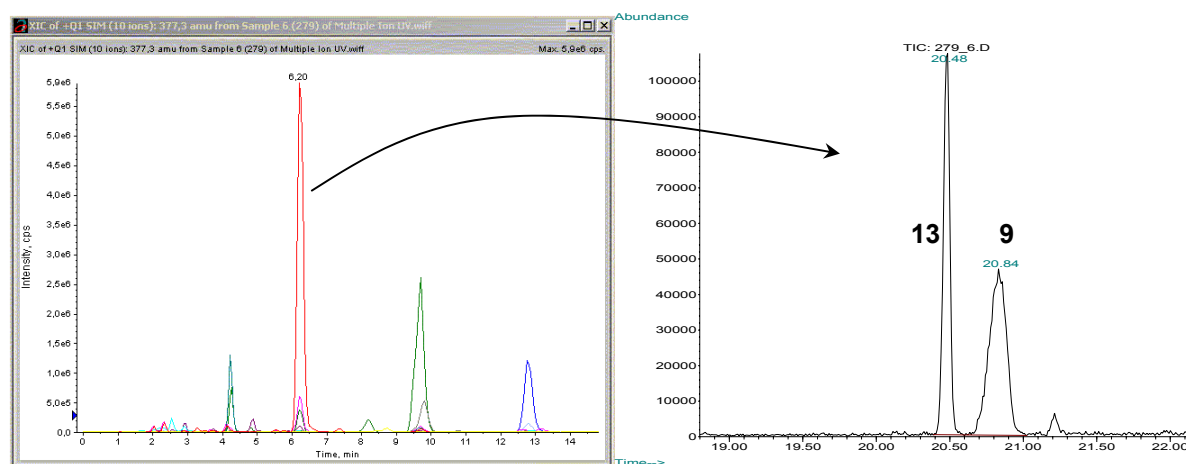


**Abbildung 52:** Product-Ion Experiment mit Ergosterol

Die unter APCI+-Bedingungen erhaltenen Massenspektren unterscheiden sich sehr stark von den EI-Massenspektren aus der GC-MS. Da praktisch keine Übereinstimmungen mit letzteren gefunden werden konnten und auch weil die Etablierung einer Strukturdatenbank von Seiten der Software bislang noch nicht unterstützt wird, wurde dieser Aspekt der LC-MS/MS nicht weiterverfolgt.

Von weitaus größerer analytischer Relevanz war die Beschränkung auf den Ion-Scan Modus, welcher ausreichend Informationen lieferte, um „versteckte“ Coelutionen in HPLC und GC aufzuspüren und – vor allem – UV-spektroskopisch erhaltene Daten aus der HPLC-DAD mit den in der GC-MS erhaltenen Informationen abzugleichen.

So konnte erst mit Hilfe der LC-MS aufgedeckt werden, daß die Isomerenpaare Ergosterol (**10**) und Lichesterol (**12**), sowie 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) und Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**) bei der flüssigchromatographischen Analytik jeweils coeluierten. Auffällig wurde dieser Befund, nachdem *Yarrowia lipolytica* in Gegenwart  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitoren kultiviert wurde (vgl. Kapitel 4), wobei u.a. Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol in großer Menge akkumuliert wird, während die Menge an 24(28)-Dehydroergosterol abnimmt. Dies konnte durch GC-MS klar belegt werden. Dieser Befund konnte zunächst über LC-MS nicht nachvollzogen werden, da hier die Intensität des Dehydroergosterolpeaks weder auffällig abnahm, noch ein neuer Peak der selben Masse ( $m/z$  379) im Chromatogramm auftauchte. Ein Auffangen des vermeintlichen Dehydroergosterolpeaks aus dem LC-MS-Lauf und anschließende Injektion in das GC-MS brachten zu Tage, daß in der LC-MS eine Coelution gleicher Massen vorlag; gaschromatographisch waren beide Sterole gut zu trennen.



**Abbildung 53: Aufdecken der Coelution von 9 und 13 im LC-MS (links) nach Isolierung und Injektion in den GC-MS (rechts)**

Umgekehrt verhält es sich mit den Sterolen Fecosterol (**7**) und Igosterol (**14**), welche beide in Inkubationsversuchen von *Y. lipolytica* mit Morpholin-Antymykotika akkumulieren. Sie sind in Folge gleicher Summenformel von gleichem Molekulargewicht ( $M = 398$  g/mol) und gaschromatographisch erscheinen sie als *ein* Signal, können aber flüssigchromatographisch getrennt werden (vgl. Abbildung 54).

Da diese Sterole abhängig vom eingesetzten Morpholin ( $\Delta^{14}$ -Reduktase- und/oder  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibition) in unterschiedlicher Intensität gebildet werden, ist eine getrennte Detektion entscheidend bei der Zuordnung, ob der eingesetzte Wirkstoff Präferenzen bezüglich eines der genannten Zielenzyme hat. Auf diesen Sachverhalt wird in Kapitel 4 detaillierter eingegangen.



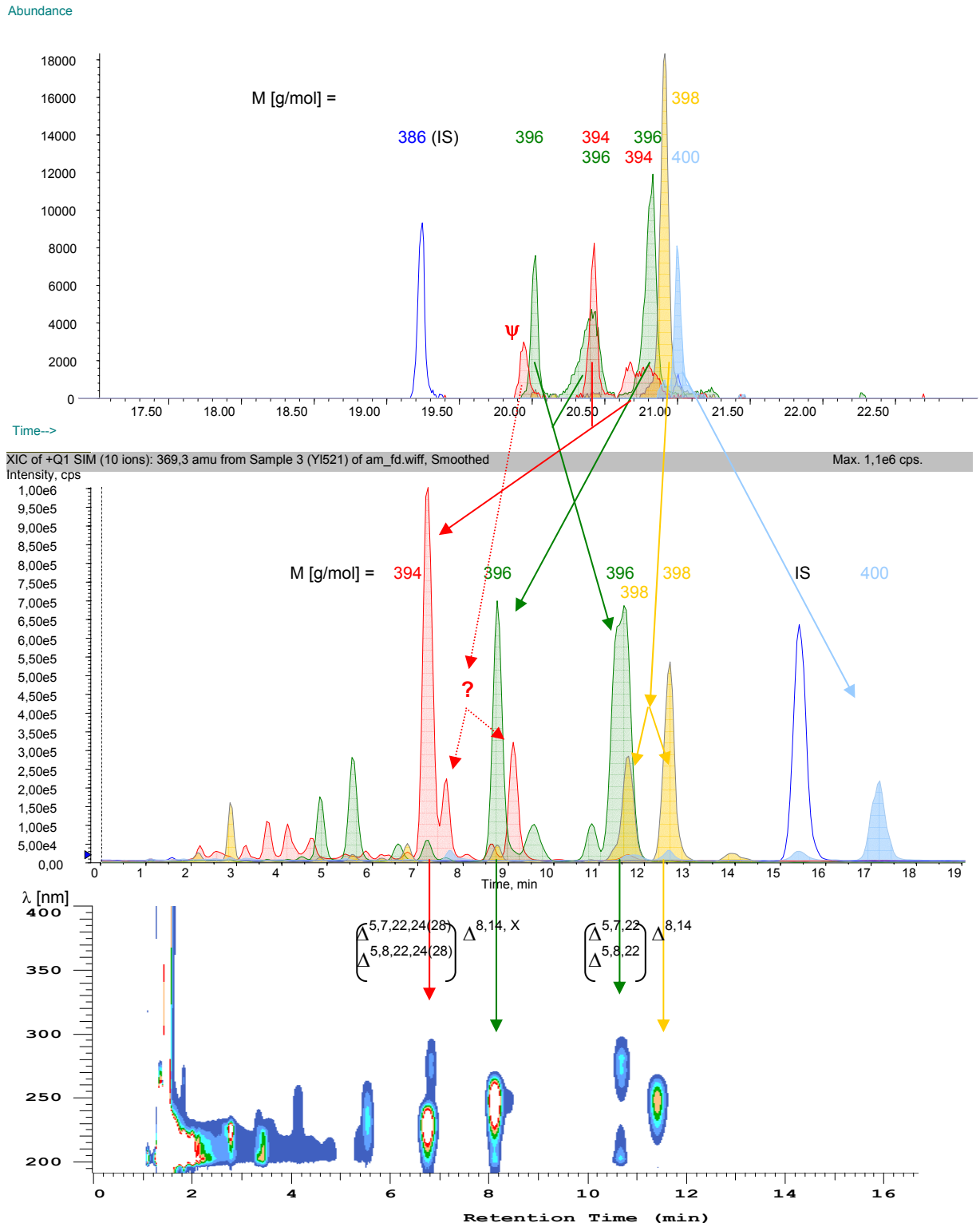
Am Beispiel eines Inkubationsversuches von *Y. lipolytica* mit Amorolfin wird beispielhaft dargestellt, wie mit Hilfe der LC-MS der bereits angesprochene „Brückenschlag“ zwischen GC-MS und HPLC-DAD erfolgt (Abbildung 54).

Dabei konnten – aufbauend auf vorherige Erkenntnisse – neue akkumulierte Sterole mit großer Sicherheit vom GC-MS-Chromatogramm anhand der ermittelten Molekülmassen auf die entsprechenden LC-MS-Signale übertragen werden. In den Fällen, wo dies nicht eindeutig möglich war, z.B. weil das LC-MS-Chromatogramm mehrere denkbare Zuordnungen zuließ, mußte auf eine weitere Untersuchung verzichtet werden. Dies wird in Abbildung 54 beispielhaft an dem mit  $\psi$  gekennzeichneten Sterol der Masse 394 gezeigt, welches nicht identifiziert werden konnte.

Die Abbildung zeigt auch – zusammenfassend zu dem bereits Erwähnten – die im Verlauf dieser Arbeit beobachteten Coelutionen, sowohl HPLC- (mit **9** und **13** bzw. **10** und **12**) als auch GC-seitig (**7** und **14**).

Das LC-MS-Chromatogramm konnte direkt mit den Erkenntnissen aus der HPLC-DAD korreliert werden, da bis auf den Detektor, identische Parameter verwendet wurden. Bei kleinen Signalen spät eluierender Substanzen ist aus technischen Gründen leider die Empfindlichkeit zur Detektion bei 203 nm nicht mehr gegeben, weshalb der Standard Cholesterol (IS) und Ergosta-8-enol (**16**, M = 400 g/mol) im DAD (fast) nicht detektierbar waren.

Im Falle des neu gebildeten Sterols mit der Masse 396, welches nach Zuordnung ein  $\Delta^{8,14,X}$ -triensystem enthält, mußte nach Herstellung größerer Mengen Amorolfin-Inkubationsmischung und HPLC-Trennung ein  $^1\text{H-NMR}$ -Experiment Aufschluß über die Position der isolierten Doppelbindung geben. Schließlich konnte es als Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**) identifiziert werden.



**Abbildung 54: Zuordnung charakteristischer UV-Absorptionsmaxima (HPLC-DAD, unten) zum Molekulargewicht unbekannter Sterole (GC-MS, oben) über Verknüpfung mit LC-MS (mitte) bei Sterolmischungen (am Beispiel eines Inkubationsansatzes von *Y. lipolytica* mit Amorolfin; Graphiken eingefärbt).**

### 3.8 Sterolanalytik mit NMR

Infolge der durch Retentionseigenschaften und Spektren gewonnenen Erkenntnisse aus der GC-MS, LC-MS und HPLC-DAD waren Grund- oder Partialstruktur neuer Sterole oft vor dem NMR-Experiment bekannt. Zwei weitere Gründe trugen ebenfalls dazu bei, daß NMR nur zur Strukturabsicherung bzw. zur Lokalisierung von Doppelbindungen herangezogen wurde, weswegen dieser Abschnitt nur in aller Kürze angesprochen wird.

Zum einen erfordert NMR einen verhältnismäßig großen Reinsubstanzbedarf, der nur über entsprechende Anreicherung und mehrfache, aufwendige Isolationsprozesse zu bewerkstelligen ist, während die chromatographischen Methoden empfindlicher sind und mit Mischungen arbeiten können. Zum anderen sind Sterole dank ihrer aliphatischen und kaum funktionalisierten Struktur auch bei genauer Kenntnis des Analyten einer vollständigen Signalzuordnung fast nicht zugänglich, weil sich die große Mehrheit der Signale im Hochfeldbereich anfindet.

Daher wurde bei der Bewertung erhaltener  $^1\text{H}$ -NMR bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren hauptsächlich der olefinische Bereich herangezogen und mit literaturbekannten Daten abgeglichen.<sup>62,63</sup>



## 4 Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren

Wie in der Themenstellung geschildert, bestand die eigentliche Aufgabe in der Etablierung einer Routinemethode, die es erlaubt, neue potentielle Antimykotika<sup>♦</sup> dahingehend zu charakterisieren, ob sie eine Inhibition der Ergosterolbiosynthese bei Pilzen bewirken und wenn ja, den molekularen Angriffspunkt (das Zielenzym) innerhalb der Biosynthese zu bestimmen. Ferner war von Interesse, strukturverwandte Wirkstoffe untereinander in ihrer Wirkstärke zu klassifizieren, um damit zukünftige Varianten der getesteten Wirkstoffe zielgerichteter optimieren zu können. Schließlich sollte die Methode einfach und standardisiert durchzuführen und in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen zu bewältigen sein.

### 4.1 Allgemeine Betrachtungen

#### 4.1.1 Grundprinzip der Methode

Das Grundprinzip besteht in der Inkubation eines Testorganismus (hier: *Yarrowia lipolytica*) unter Zugabe subletaler Dosen des zu testenden Wirkstoffes. Infolge einer Wachstumshemmung durch den Wirkstoff ist der Testorganismus zwar noch in der Lage zu wachsen, zugleich aber in seinem normalen Sterolanabolismus beeinträchtigt, weil benötigte Enzyme nicht mehr bzw. nur noch eingeschränkt in der Lage sind, ihr Substrat umzusetzen. Diese Beeinträchtigung hat zur Folge, daß

1. Ergosterolbiosynthesevorstufen akkumulieren, weil sie nicht weiter umgesetzt werden können,
2. häufig alternative Biosyntheserouten beschritten werden, die unter Auslassung des inhibierten enzymatischen Schrittes zu anormalen, oft für den Inhibitionstyp charakteristischen Sterolen führen,
3. und in letzter Konsequenz, in Folge eines Mangels an Ergosterol und/oder Anreicherung großer Mengen toxischer Substanzen (Squalen) oder nicht für die Aufrechterhaltung der Membranfunktion geeigneter Sterole, daß mit zunehmender eingesetzter Wirkstoffkonzentration das Wachstum des Testorganismus eingeschränkt wird oder sogar ausbleibt.

Nach erfolgter Inkubation wird die gebildete Biomasse vom Nährmedium getrennt, ihr Trockengewicht bestimmt und anschließend durch alkalische Hydrolyse aufgeschlossen. Die Gesamtfraktion der während der Inkubation gebildeten Sterole wird extrahiert und mit Hilfe chromatographischer Methoden untersucht.

Bevor eine Bewertung neuer potentieller Wirkstoffe erfolgen kann, muß die Methode „geübt“ und auf ihre Aussagekraft hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden kommerzielle, in Medizin und Landwirtschaft genutzte Wirkstoffe mit bekanntem Wirkungsspektrum als Referenzsubstanzen eingesetzt, das von ihnen nach Inkubation und Aufarbeitung erzeugte Sterolmuster auf neue, charakteristische Sterole untersucht und die Ergebnisse, soweit möglich, mit denen aus der Literatur verglichen. Zur Absicherung wurden noch weitere Referenzsubstanzen desselben Wirkmechanismus getestet und geprüft, ob sich in diesem Fall die gleiche Zuordnung zum potentiellen Wirkort treffen läßt.

<sup>♦</sup> Als potentielle Antimykotika gelten alle Substanzen, welche im Vorfeld im sog. *Agardiffusionstest* eine deutliche Hemmhofbildung bei verschiedenen Pilzkulturen verursacht haben. Dieser unspezifische Vorversuch wurde entweder extern in Auftrag gegeben, oder aber im Hause vom jeweiligen Doktoranden, der die Verbindungen selbst synthetisiert hatte, durchgeführt und findet daher in dieser Arbeit keine weitere Erwähnung.

Auf Basis der so gewonnenen Referenzsterolmuster von bekannten Inhibitoren verschiedener Angriffspunkte konnten im Anschluß neue, noch nicht charakterisierte Substanzen entweder bekannten Sterolmustern (und damit Wirkorten) zugeordnet, oder neue Angriffsorte in der Ergosterolbiosynthese aufgezeigt werden.

#### 4.1.2 Bisheriger „Stand der Technik“

Das in 4.1.1 vorgestellte Grundprinzip basiert auf einer Arbeitsvorschrift der Firma Bayer, Abt. Pflanzenschutz. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit (vgl. 2.1) war, diese Vorschrift an die örtlichen Gegebenheiten und Bedürfnisse anzupassen und weiterzuentwickeln.

Die als Vorlage für diese Arbeit dienende Arbeitsvorschrift<sup>64</sup> zu Kultivierung des Testorganismus und der Sterolextraktion aus demselben wird nachfolgend vorgestellt:

##### 1. *Organisms and Growth Conditions*

*Saccharomyces lipolytica* isolate HT 20, was kept as liquid culture on T3 medium (10 g glucose, 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g citric acid, 2 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.7 g MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl, 2.5 g yeast extract, 10 mg pyridoxalhydrochloride in 1 l H<sub>2</sub>O). For sterol analysis 250 ml flasks containing sterilised 130 ml T3 medium were inoculated with 2 ml of a *S. lipolytica* culture in log phase and the appropriate amount of test compound in 1 ml ethanol was added. Cultures were incubated for two days at 28 °C on a rotary shaker (280 rpm).

##### 2. *Sterol Extraction*

*Fungal biomass was collected by centrifugation and after addition of cholesterol (1 mg/50 µl methanol) as internal standard, samples were homogenized in 80 ml chloroform / methanol (2:1) (Ultra-Turrax). 16 h later the samples were dried in the vacuum evaporator and then saponified in 30 ml 6 % (w/v) KOH in 60% (w/v) ethanol for again 16 h. Sterols were extracted to toluene (80 ml), dried in the vacuum evaporator and taken up in 3 ml of toluene. The toluene is extracted with SEP-PAK<sup>®</sup> silica cartridges (Waters), the cartridges are washed with 2 ml of toluene and extracted with 1 ml of ethanol.*

Wie aus der gezeigten Vorschrift ersichtlich, ist im Aufarbeitungsprozeß sowohl der Zeitbedarf, als auch die analytische Vorgehensweise relativ unökonomisch. Obwohl hier nach alkalischer Hydrolyse „nur“ freie Sterole analysiert werden, geht man zunächst den umständlichen Weg der Extraktion von gebundenen und freien Sterolen aus der biologischen Matrix (vgl. 3.1). Als Grund für diesen hohen Material- und Zeitaufwand ist wahrscheinlich die mit der flüssig-flüssig-Extraktion (ethanol. KOH / Toluol) verbundene problematische Emulsionsbildung zu sehen. Indem im Vorfeld durch das Chloroform-Methanol-Verfahren wenigstens die übrigen in der Hefe vorkommenden emulgierenden Fraktionen (Acyllipide, Phospholipide) abgetrennt wurden, ist ein „Ausschütteln“ mit einer besseren Phasentrennung gewährleistet.

In diesen Punkten hat die vorliegende Arbeit entscheidende Verbesserungen gebracht, da durch die vorgestellte Festphasenextraktionsmethode die Problematik der Emulsionsbildung umgangen werden kann, wobei die freien Sterole direkt und auch selektiv aus der biologischen Matrix extrahiert werden, was im Vergleich zu der obigen Methode Zeit und Lösungsmittel spart.

### 4.1.3 Möglichkeiten des Testsystems

Das vorliegende Testsystem ermöglicht es, innerhalb eines Tages nach Beendigung der Inkubationsphase eine klare Aussage zu treffen, ob ein Wirkstoff in die Ergosterolbiosynthese eingreift, oder nicht. Ferner ist es in der Lage, auf Grund der analysierten Sterolmuster dem getesteten Wirkstoff einen (oder mehrere) Angriffspunkt(e) zuzuordnen. Dies geschieht im Allgemeinen durch Abgleich mit Daten, welche aus Inkubationsversuchen mit bekannten Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren gewonnen wurden. Es ist jedoch auch möglich, Wirkstoffe zu charakterisieren, welche neue Angriffspunkte haben, die noch nicht literaturbekannt sind, oder sie zumindest von den bekannten abzugrenzen. Mit Hilfe des neu entwickelten Extraktionsverfahrens für die Sterolfraction kann eine klare Wirkortzuordnung noch bei einer eingesetzten Menge von ca. 20 mg an Biomasse getroffen werden.

Durch den Zusatz von internem Standard während der Probenaufarbeitung kann das System prinzipiell auch für eine vollquantitative Analytik eingesetzt werden.

Hauptnachteil der Methode ist, daß die Erkennung einer Ergosterolbiosynthese-Inhibition durch einen Wirkstoff auf eine Inhibition des Post-Squalen-Abschnittes limitiert, ist. Dies beruht auf der Tatsache, daß bei Inhibition von Enzymen des Prä-Squalen-Abschnittes Substanzen akkumulieren würden, die zu polar (Phosphate oder CoA-aktivierte Substanzen) sind, um mit der Sterolextraktionsmethode erfasst zu werden. Beispielsweise würde eine Inhibition der HMG-CoA-Reduktase zwar auch zu einer Blockierung der Ergosterolbiosynthese führen, könnte aber mit der beschriebenen Methode nicht als solche charakterisiert werden.

Wie bereits erwähnt, ist die Methode prinzipiell geeignet, die analysierten Sterole quantitativ zu erfassen, da Cholesterol als interner Standard zugesetzt werden kann und sich bei der Extraktion analog den Pilzsterolen verhält. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz nicht umgesetzt und die Beurteilung der Sterolmuster nur qualitativ bzw. halbquantitativ getroffen.

Diese Entscheidung beruht auf zwei Gründen.

Einerseits sind zwar sowohl GC-MS als auch LC-MS hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit geeignet, jedoch war keine der beiden Methoden frei von Coelutionen gleicher Massen, und daher nur eingeschränkt verwendbar. Weiterhin waren die für eine Standardisierung erforderlichen Reinsubstanzen nicht oder nicht in ausreichender Reinheit oder Menge verfügbar, um Referenzchromatogramme erstellen zu können.

Zum zweiten ist in Anbetracht der gestellten Aufgabe die Frage zulässig, ob eine Quantifizierung der detektierten Sterole überhaupt sinnvoll ist. Die qualitative Aussage beantwortet bereits die Frage nach dem Angriffsort und, wie später berichtet, ist die exakte Zusammensetzung des Sterolmusters nach Inkubation mit einem antimykotischen Wirkstoff nie exakt reproduzierbar, denn neben der Wahl des Testorganismus haben auch Sauerstoffgehalt und Inkubationsdauer einen wichtigen Einfluß.

## 4.2 Mikrobiologische Aspekte

### 4.2.1 Auswahl und Charakterisierung von *Yarrowia lipolytica* als Testorganismus

Bei der Auswahl eines Testorganismus für den anstehenden Assay mußten eine Reihe von Anforderungen erfüllt werden. Auf Grund von Schutzbestimmungen durften humanpathogene Keime in unseren Labors nicht kultiviert werden. Gleichzeitig sollte der Testorganismus in einem kurzen Zeitraum ausreichend Biomasse produzieren, leicht vom Nährmedium abzutrennen sein und nach Möglichkeit sollten literaturbekannte Angaben zur Sterolzusammensetzung und zu Inhibitionsversuchen mit Antimykotika vorliegen.

Naheliegender war es daher zunächst, mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu arbeiten, zumal dieser Organismus noch vor *Candida albicans* zu den am besten erforschten Modellorganismen hinsichtlich Ergosterolbiosynthese und daran beteiligter Enzyme zählt.

Leider konnte sich *S. cerevisiae* nicht als geeigneter Testkeim für unser Testsystem durchsetzen, da zum einen die Wachstumsrate bei Ruhekultur zu gering war und sich in der erwünschten Inkubationszeit von 72 h nicht genug Biomasse gebildet hatte. Zum anderen bildete der vorliegende *S. cerevisiae*-Stamm nur Einzelzellen und keine Mycelverbände, mit dem Resultat, daß der feinverteilte Hefeniederschlag bei der sich an die Inkubation anschließenden Membranfiltration die Poren verstopfte und eine Abtrennung vom Medium oft massiv erschwerte.

In Anlehnung an die in 4.1.2 vorgestellte Arbeitsvorschrift wurde die Hefe *Saccharomyces lipolytica* erfolgreich als Testorganismus für unsere Methode eingeführt. *S. lipolytica* wurde zwischenzeitlich taxonomisch neu bewertet und in *Yarrowia lipolytica* umbenannt. *Y. lipolytica* zählt zu den Blastomyceten (Hefepilze) und stellt die perfekte Form des Deuteromyceten (= „*Fungi imperfecti*“) *Candida lipolytica* dar. Sie kann als Verderbniskeim in Milchprodukten gefunden werden<sup>65</sup>, aber auch aus Weizen, Erde, Fett, gezuckerten Getränken, Tieren oder humanem Material isoliert werden und ist nicht humanpathogen.<sup>66</sup> Die Hefe bildet kurzovale bis langgestreckte Zellen sowie Pseudomycel, echtes Mycel, Blastosporen und Arthrosporen. Die Kolonien sind cremefarben. Charakteristisch für diese Hefe sind die starke Lipase-Aktivität, die Produktion von extrazellulärer Protease und die Produktion von überschüssigen Mengen an Zitronensäure. Diesen Eigenschaften verdankt *Y. lipolytica* seinen vereinzelt Einsatz bei der Käse-<sup>67</sup> und Sojasaucen-Herstellung<sup>68</sup>, aber auch das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Projekt, mit Hilfe von *Y. lipolytica* fetthaltige Abfälle und Abwässer aus der Ernährungsindustrie mikrobiologisch zu aufzureinigen.<sup>69</sup>

In flüssiger Kultur wird eine auf der Oberfläche schwimmende Haut gebildet. Dieser zusammenhängende Zellverbund erlaubt ein vollständiges Abtrennen der Kultur vom Nährmedium durch Membranfiltration. Zudem ist bei Standkultur ohne Inhibition und den gewählten Bedingungen eine ausreichende Bildung von Biomasse von ca. 100 – 120 mg innerhalb 72 h gegeben. Damit ist auch gewährleistet, daß eine Untersuchung der Sterolfraction nach Inkubation mit einem Inhibitor - und damit einhergehender reduzierter Biomasse - bis zu einem Inhibitionsgrad von > 80% (entsprechend 20-24 mg) möglich ist, um damit noch im Nachweisbereich der entwickelten Methode zu liegen.

In Schüttelkultur erreicht *Y. lipolytica* etwa die doppelte Biomasse (220 – 240 mg). Dies ist auf eine bessere Versorgung mit Sauerstoff während der Wachstumsphase zurückzuführen.

#### 4.2.2 Kultivierung von *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* wurde in Flüssigkultur in einem Nährmedium nach Empfehlung der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kultiviert. Der eingesetzte Stamm *Yarrowia lipolytica* DSMZ Nr.1345 wurde ebenfalls dort bezogen.

Zur Aufrechterhaltung der Vitalität wurde der Stamm wöchentlich in frisches Medium überimpft. Dabei wurden 100 µl Impflösung zu 30 ml Medium in eine Petrischale gegeben und in einem Brutschrank bei 28 °C bebrütet. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß sich die Hefe permanent in der log-Phase befindet und eine gleichbleibende Qualität der Hefe gewährleistet ist.

## 4.3 Entwicklung einer SPE-Methode zur Extraktion der Sterolfraction aus Hefe

Die eigens für die Screening-Methode zur Charakterisierung potentieller Antimykotika entwickelte SPE-Methode stellt in gewisser Weise das Herzstück der vorliegenden Arbeit dar. Dank ihrer Hilfe war es erst möglich, den gewünschten Probendurchsatz mit den zeitlichen, räumlichen und personellen Vorgaben in Einklang zu bringen und dabei eine für die Anforderungen der instrumentellen Analytik optimale Aufarbeitung zu erreichen. Auch wenn sie nur einen Teilbereich des gesamten Assays ausmacht, wird sie auf Grund ihrer besonderen Relevanz getrennt von der sich daran anschließenden Gesamtbetrachtung des Assays beschrieben.

### 4.3.1 Nachteile der konventionellen Sterolextraktion

Ausschlaggebend für die Suche nach einer neuen Möglichkeit zur Extraktion von freien Sterolen waren mehrere Gründe.

Die klassische Methode der flüssig-flüssig-Extraktion (vgl. 3.1 bzw. 4.1.2) ist mit mehreren unmittelbaren Nachteilen behaftet:

- Eine auftretende Emulsionsbildung an der Phasengrenze verzögert oder verhindert eine verlustfreie Extraktion der Sterole.
- Kalkuliert man diesen Verlust bereits ein, muß mehr Probenmenge eingesetzt werden oder man riskiert Nebeninhaltsstoffe zu verlieren.
- Eine nachgeschaltete Trocknung der organischen Phase (z.B. über  $MgSO_4$ ) und deren Einengen am Rotationsverdampfer sind zeitintensiv, vor allem, wenn viele Proben gleichzeitig aufgearbeitet werden sollen.
- Der im Rundkolben einrotierte Sterolextrakt muß durch Zugabe von möglichst wenig organischem Lösungsmittel quantitativ gelöst werden, damit er für die anschließende Chromatographie verfügbar ist. Dabei verbietet sich mehrmaliges Nachspülen, weil es zu Lasten der Probenkonzentration geht.
- Schwebstoffe oder Zellbruchstücke müssen durch einen zusätzlichen Filtrationsschritt abgetrennt werden. Dies ist nötig, um nachgeschaltete Geräte (GC, HPLC) vor Schäden zu bewahren.
- Dem Wunsch nach einem hohen Probendurchsatz stehen ein hoher Zeit- und Materialaufwand gegenüber, die Aufarbeitungsverluste sind naturgemäß hoch.

### 4.3.2 Forderungen an die zu entwickelnde Extraktionsmethode

Dem klassischen Prinzip der Sterolisolierung aus Pilzmaterial stand der Wunsch nach einer Extraktionsmethode gegenüber, welche mit minimalen Mengen an Biomasse, d.h. praktisch ohne Aufarbeitungsverluste auskommt und zugleich eine relativ hohe Aufkonzentrierung des Sterolextraktes für die analytischen Bestimmungen ermöglicht. Dies war nicht zuletzt deshalb erforderlich, weil die vorhandene Infrastruktur eine Kultivierung großer Ansätze in großer Stückzahl nicht zuließ.

Weiterhin wünschenswert war eine mechanische Aufreinigung (Filtration) während der Probenaufarbeitung, um die nachgeschalteten chromatographischen Instrumente zu schützen.

Nachdem beabsichtigt war, einen Durchsatz von einer Testsubstanz à 12 Einzelproben pro Tag und Arbeitskraft zu realisieren, war aus ökonomischen Erwägungen heraus eine weitgehend parallele Aufarbeitung von Proben erwünscht, welche bei reduziertem Materialaufwand schneller zum Ziel führt.



### 4.3.3 Prinzip der Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE (*engl.* solid-phase-extraction) umgeht die Vermischungs- und Entmischungsproblematik von Extraktionlösungsmittel und der flüssigen Probenmatrix, wie sie bei der klassischen flüssig-flüssig-Extraktion auftritt, da der Übertritt des Analyten von der Matrix zuerst auf eine stationäre Phase (Festphase) erfolgt.

Bei geeigneter Wahl der Bedingungen erfolgt zunächst eine Beladung der Festphase mit dem Analyten. Ein anschließender Waschschriff entfernt unerwünschte Rückstände der Probenmatrix auf der Festphase. Die Festphase wird durch Anlegen eines Vakuums trockengesaugt. Schließlich eluiert man den Analyten von der Festphase mit Hilfe eines Lösungsmittels hoher Elutionskraft. In manchen Fällen läßt sich durch schrittweise Elution mit verschiedenen Lösungsmitteln eine Fraktionierung erreichen. Letzteres war bei der hier vorgestellten Methode nicht erforderlich.

### 4.3.4 Methodenentwicklung zur SPE

Bei der Entwicklung der SPE-Methode zur Extraktion der Sterolfraction aus der kultivierten Hefe mußten in erster Linie die Bedingungen, die nach dem Aufschluß der Zellen vorlagen, Berücksichtigung finden. Da die SPE nur eine Alternative zum konventionellen „Ausschüteln“ darstellt, mußte das vorbereitende Zell-Aufschlußverfahren nach wie vor durchgeführt werden. Dabei wurde im Grundprinzip auf das in 3.1 vorgestellte Verfahren der alkalischen Hydrolyse zurückgegriffen. Auf Einzelheiten zum Aufschlußverfahren wird später eingegangen.

Nach dem genannten alkalischen Aufschluß lagen folgende Bedingungen vor:

- 51 ml heißes ethanolisch-alkalisches Hefe-Hydrolysat
- pH = 13-14
- Schwebeteilchen, Zellbruchstücke

Da die Sterole der Neutralstofffraktion zuzurechnen sind, bot sich an, diese über eine lipophile Festphase von der übrigen Probenmatrix abzutrennen. Dabei sollte jedoch vermieden werden durch Säurezugabe eine teilweise Neutralisation des Hydrolysates herbeizuführen, weil die Gefahr bestand, daß die im heißen Hydrolysat eben gelösten Sterole infolge einer Erhöhung des wäßrigen Anteils ausfallen. Dies wäre jedoch erforderlich gewesen, wenn man eine klassische (hydrolyseempfindliche) RP-Phase als Festphase zur Extraktion gewählt hätte.

Eine elegante Lösung brachte die Verwendung einer Polymerphase, welche als Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer lipophile Eigenschaften aufweist, dabei aber pH-stabil ist. Diese stationäre Phase wird nach ihrem Hauptanwendungsgebiet als Environmental-Phase (EN-Phase) bezeichnet (Abbildung 55).

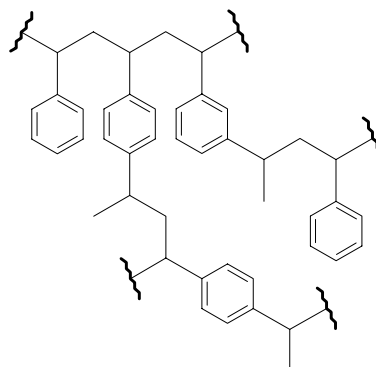


Abbildung 55: Strukturausschnitt einer EN-Phase

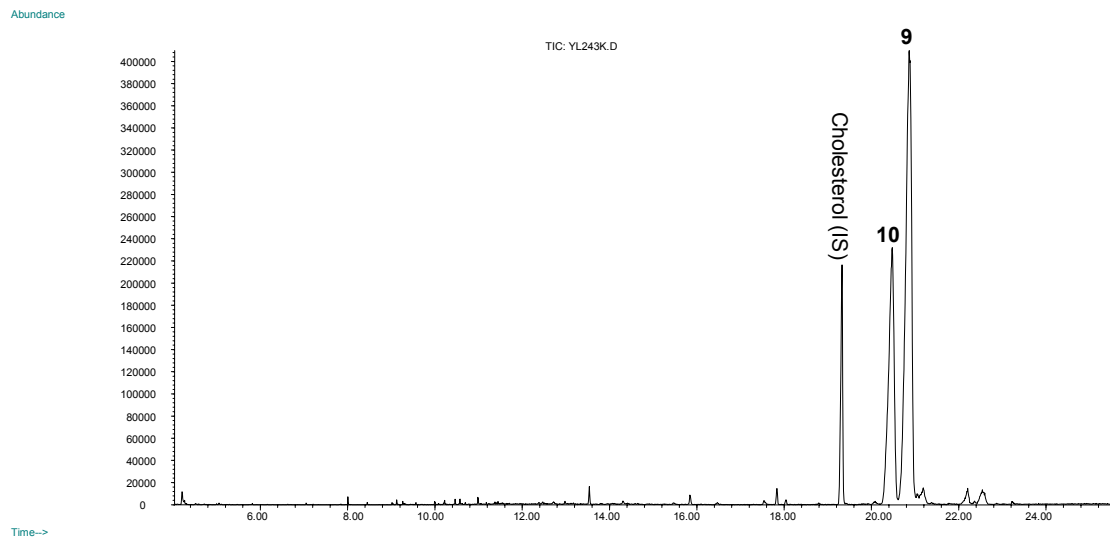
Mit Hilfe der EN-Phase war es nun *theoretisch* möglich, das Hydrolysat ungeachtet des stark basischen pH über SPE in eine lipophile Neutralstofffraktion (inklusive Sterole) und eine polare Fraktion zu trennen.

Bis zur erfolgreichen praktischen Umsetzung dieses Ansatzes mußten entscheidende Punkte berücksichtigt bzw. optimiert werden:

1. Die im Hydrolysat enthaltenen Zellbruchstücke verstopften bei der Probenaufgabe die SPE-Kartusche. Daher mußte zwischen Hydrolyse und SPE ein Zentrifugationsschritt gesetzt werden.
2. Das Verhältnis von Ethanol und Kalilauge im Hydrolysat mußte in Verbindung mit der Temperatur der Lösung so eingestellt werden, daß einerseits die freien Sterole vor der Probenaufgabe in Lösung bleiben und nicht abzentrifugiert werden (d.h. möglichst hoher EtOH-Anteil erwünscht), andererseits die Elutionskraft aber nicht ausreicht, um die an der Festphase adsorbierten Sterole schon während der Probenaufgabe herunterzuwaschen (d.h. möglichst niedriger EtOH-Anteil erwünscht). Ein allen Anforderungen gerecht werdender Kompromiß konnte bei einem Ethanolanteil von 55-60 Vol.-% gefunden werden.
3. Um die Löslichkeit der Sterole im Hydrolysat durch Abkühlung nicht zu vermindern, mußte die Zentrifugation unmittelbar im Anschluß an die Hydrolyse erfolgen, wobei die Zentrifuge während der Laufzeit auf 35 °C temperiert war. Die Probenaufgabe auf die SPE-Kartusche wurde sofort danach mit dem noch warmen Zentrifugat durchgeführt.
4. Dabei erfolgte die Probenaufgabe direkt aus dem Zentrifugenglas, wobei das Zentrifugat mit Hilfe einer Einwegspritze mit aufgesetzter Kanüle vorsichtig und fast vollständig abgezogen werden konnte, während das Hefepellet zurückblieb. Auch wurde das Zentrifugenglas nicht nachgewaschen. Der einhergehende Aufarbeitungsverlust wurde in Kauf genommen, da etwa 49 von 51 ml Hydrolysat überführt werden konnten.
5. Um eine Zersetzung von Ergosterol und eventuell anderen in der Probe vorhandenen lichtempfindlichen Sterolen zu verhindern, mußten die alkalische Hydrolyse und die SPE unter weitestgehendem Ausschluß von Tageslicht durchgeführt werden.
6. Art und Menge des Extraktionsmittels mußten im Versuch ermittelt werden, um eine vollständige Elution von der Festphase unter möglichst geringer Verdünnung des Extraktes zu erzielen. Als geeignet hat sich die Elution der Sterole von der EN-Phase mit 4 ml Ethylacetat erwiesen.

Die Gesamtsterolkonzentration des so gewonnenen Extraktes lag damit bei einem ungefähren Sterolanteil von 1 % in 100 mg Trockenbiomasse in der Größenordnung von 250 µg/ml. Auf eine exakte Quantifizierung wurde aus genannten Gründen (vgl. 4.1.3) verzichtet.

Neben der Auswahl der EN-Phase als Festphase ist auch die Abstimmung des Mischungsverhältnisses Ethanol : Kalilauge als mobile Phase bei der Probenaufgabe dafür verantwortlich, daß die Extraktion sehr selektiv die freien Sterole erfaßt. Das GC-MS-Chromatogramm einer Extraktion der Sterole aus *Y. lipolytica*-Stammkultur zeigt praktisch keine weiteren extrahierten Inhaltsstoffe (Abbildung 56).



**Abbildung 56: GC-MS des Sterolextraktes aus *Y. lipolytica* mit SPE mit den Hauptsterolen 24(28)-Dehydroergosterol (9) und Ergosterol (10)**

Die SPE-Methode ist nicht ausschließlich dazu geeignet, Sterole aus Hefen zu extrahieren. Wenn in der Probe vorhanden, werden Squalen und Tocopherole ebenfalls extrahiert. Letzteres konnte bei einem Modellversuch festgestellt werden, bei welchem mit der gleichen Methode Phytosterine aus einer Margarine extrahiert wurden. Nach der SPE wurden neben den Phytosterinen ebenfalls Tocopherole im GC-MS-Chromatogramm identifiziert.

In einem Modellversuch zur Bestimmung der Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit der SPE-Methode wurden 16 Einzelproben à 1,00 ml einer Cholesterol-Standardlösung mit GC-MS vermessen. Davon wurden 8 Proben ohne SPE mit Ethylacetat ad 4 ml verdünnt, per Autosampler injiziert und integriert (= Referenz). Die restlichen 8 Proben wurden unter Zugabe der für die Aufarbeitung üblichen Chemikalien einer simulierten „alkalischen Hydrolyse“ unterzogen, auf 35-40 °C abgekühlt und das Cholesterol über SPE mit 4 ml Ethylacetat extrahiert (= SPE-Extrakt). Auch diese Proben wurden per Autosampler in den GC-MS injiziert und die Signale integriert. Nachstehende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen.

	Referenz	SPE-Extrakt
Einzelwerte (Area)	6424870	5965165
	5714372	6581397
	6580444	6015280
	6561171	5371800
	6603748	5906825
	6169381	5582460
	6611196	5809389
	6578009	5442409
Mittelwert x:	6405399	5834341
Standardabweichung sr:	316227	386342
<b>Variationskoeffizient VK (%)</b> :	<b>4,94</b>	<b>6,62</b>
<b>Wiederfindungsrate WFR (%)</b> :	<b>100,00</b>	<b>91,08</b>

**Tabelle 6: Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate der SPE-Methode**

Tabelle 6 belegt, daß die SPE-Extraktionsmethode im Modellversuch mit Cholesterol bei praktisch identischen Bedingungen wie bei der Hefehydrolysat-Aufarbeitung eine Wiederfindungsrate von 91 % erreicht. Dieser Wert wäre im Modellversuch sogar noch zu steigern



gewesen, denn das „Modellhydrolysat“ wurde (in Anlehnung an die Hefeaufarbeitung) nur so weit aus dem Becherglas in die SPE-Kartusche überführt, wie es durch Aufziehen mit der Spritze möglich war. Die Restmenge wurde nicht nachgespült.

Der Variationskoeffizient von 6,62% beim SPE-Extrakt ist im Vergleich mit dem der Referenz zu sehen. Dort gehen die Ungenauigkeiten beim Pipettieren des Standards aus der Stammlösung, dem Verdünnungsschritt und Schwankungen bei der Autosamplerinjektion in den Variationskoeffizienten von 4,94% ein. Da diese Schritte aber auch Teil der Bearbeitung der SPE-Extrakt-Proben sind und hier sicher einen vergleichbaren Anteil beisteuern, kann man von einer guten Reproduzierbarkeit bei der eigentlichen SPE-Prozedur sprechen. Nachdem diese Arbeit keinen Beitrag zur Quantifizierung von Sterolen leistet, wurden entsprechende quantitative Validierungsparameter (Arbeitsbereich, Linearität) auch für die SPE-Methode nicht bestimmt.

Jeder mit SPE aufgearbeiteten Probe wurde schon während der alkalischen Hydrolyse eine definierte Menge an Cholesterol als interner Standard zugesetzt.

Im Fall einer qualitativen Untersuchung eines Hefesterolmusters ist der Zusatz von Cholesterol aus drei Gründen sinnvoll.

1. Durch Vergleich der Intensität des Cholesterolsignals im Chromatogramm innerhalb einer Meßreihe können ggf. Schwankungen in der Aufarbeitung erkannt werden.
2. Cholesterol ist als qualitativer Marker in jeder Probe geeignet, Verschiebungen in der Retentionszeit festzustellen, z.B. bei ungenügender Äquilibrierung, oder bei Nachlassen der Qualität der Trennsäule.
3. Die gleichbleibende Intensität des Cholesterolsignals läßt in Verbindung mit den veränderlichen Intensitäten der Hefesterole halbquantitative Aussagen zu.

Im Fall einer gewünschten Quantifizierung der Sterolzusammensetzung egalisiert der Zusatz von Cholesterol als internem Standard die möglichen Schwankungen in der Reproduzierbarkeit der SPE-Methode.

## 4.4 Beschreibung des gesamten Testablaufes

Die Screening-Methode läßt sich grob in einen mikrobiologischen und einen analytischen Teil gliedern. Der *mikrobiologische Teil* befaßt sich mit der dosisgestaffelten Inkubation von *Y. lipolytica* mit dem zu testenden (potentiellen) Wirkstoff, den Kulturbedingungen, der „Ernte“ der gebildeten Biomasse nach Beendigung der Inkubation, der Bestimmung der Trockenmasse jeder Einzelprobe und der effektiven Konzentration  $EC_{50}$ , welche die Konzentration in  $\mu\text{g}$  (oder  $\text{mg}$ ) zugesetztem Wirkstoff pro ml Medium angibt, die im Vergleich zu einer unbehandelten Referenz zu nur 50 % gebildeter Biomasse führt.

Der *analytische Teil* beginnt mit der alkalischen Hydrolyse der Biomasse und umfaßt weiterhin die Sterolextraktion mit SPE und abschließend die in Kapitel 3 besprochenen instrumentell-analytischen Verfahren zur Aufklärung des Sterolmusters, sowie die Interpretation der so erzeugten Daten.

Durchführungsbestimmungen zu den genannten Schritten sind in *Standard Operating Procedures (SOP's)* im Experimentellen Teil dieser Arbeit niedergelegt.

### 4.4.1 Mikrobiologischer Teil

Für die Inkubation von *Y. lipolytica* mit einer Testsubstanz werden 10 Ansätze mit unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration vorbereitet. Dazu wird eine ethanolische Stammlösung der Testsubstanz hergestellt, sowie daraus eine 1:10 Verdünnung und eine 1:100 Verdünnung in Ethanol. Die Zugabe der Stamm- bzw. Verdünnungslösungen erfolgt in 40 ml Nähr-

medium in Kulturflaschen mit Capsenbergkappen-Verschuß. Gemäß dem im Experimentellen Teil aufgeführten Pipettierschema kann ein Bereich von 0,02 – 4,00 µg/ml Wirkstoff im Medium abgedeckt werden. Durch die Wirkstoffzugabe und ergänzende Ethanolzugabe ad 80 µl wird in allen Fällen ein Alkoholanteil im Medium von 0,2 Vol.-% eingestellt, was von der Hefe noch ohne Wachstumseinbußen toleriert wird. Der abgedeckte Bereich läßt sich bei Bedarf nach unten oder oben erweitern. Dies hängt jedoch vor allem von der Löslichkeit der Testsubstanz im Nährmedium ab. Schließlich wird ein Inokulum von 100 µl Hefe-Stammkultur zugegeben, danach geschüttelt und inkubiert. Gleichzeitig zu der Testreihe werden zwei Kontrollen, welche nur mit 80 µl Ethanol versetzt sind, vorbereitet. Sie werden später einerseits zur Bestimmung der EC<sub>50</sub> herangezogen und dienen außerdem nach der Aufarbeitung als Sterolmuster-Blindprobe.

Im Allgemeinen wurden die Inkubationen in Ruhekultur, d.h. stehend im Brutschrank, durchgeführt. Wenn keine vollständige Löslichkeit der Testsubstanz im Medium gegeben war, wurde die Inkubation im temperierten Schüttler durchgeführt. Damit konnte erreicht werden, daß sich der Wirkstoff, obgleich ungelöst, zumindest gleichmäßig im Medium verteilt und die Hefe dem Kontakt damit ausgesetzt ist. Nebeneffekt der Schüttelinkubation war eine ungefähre Verdoppelung der Biomasse gegenüber der Ruhekultur, wahrscheinlich zurückzuführen auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung bei gleichzeitiger Vergrößerung der Mediums-Oberfläche im Kolben. Damit einhergehend nahm die Sensibilität gegenüber den inhibierenden Testsubstanzen ab und die hier erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte liegen auffällig über denen, die in einem analogen Ruhekultur-Experiment durchgeführt wurden.

Wie in 4.5.1 genauer geschildert, verschiebt sich dabei auch das Verhältnis der beiden Hauptsterole Ergosterol (**10**) und 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) in *Y. lipolytica*. Durch die Kultivierung unter Schüttelkulturbedingungen reduzierte sich der Signalanteil an **9** zu Gunsten von **10** erheblich (Abbildung 60, S. 72). Dieser Effekt konnte ausgenutzt werden, um bei Inhibierungsversuchen im GC-MS Massenspektren von akkumulierten Sterolen, die sich unter Ruhekulturbedingungen teilweise mit dem des auslaufenden Signals von **9** mischten, nun sauberer zu erhalten. Dies war auch der Grund, warum in einem gesonderten Versuch ein Großteil der unter Ruhekultur bereits getesteten Substanzen diesmal unter Schüttelinkubation an *Y. lipolytica* getestet wurden; hierbei konnten die GC-MS-Signale von Sterolen wie Fecosterol (**7**) oder Igosterol (**14**) ohne Restanteile von **9** im Spektrum erhalten werden.

Nach erfolgter, ca. 72 stündiger Inkubation erfolgt die „Ernte“ der gebildeten Biomasse aller Proben. Dabei werden die Hefekuchen durch Vakuumfiltration an gewogenen Membranfiltern vom Medium getrennt und mit Wasser gewaschen. Hefekuchen und Filter werden gemeinsam bei 90 °C für 2 h im Trockenschrank eingetrocknet und anschließend gewogen. Die Netto-Auswaagen der Trockenbiomassen der Ansätze und der Kontrollen werden in einem Diagramm gegen die eingesetzte Wirkstoffkonzentration aufgetragen. Graphisch kann so ermittelt werden, ob die Testsubstanz im untersuchten Konzentrationsbereich eine antimykotische Aktivität aufweist. Die graphische Bestimmung der Konzentration, welche für eine Halbierung der Biomasse gegenüber der Kontrolle verantwortlich ist, führt zum EC<sub>50</sub>-Wert („Effective Concentration“). Er kann als Maß für die Wirkstärke herangezogen werden, im Vergleich mit anderen Testsubstanzen, welche auch unter den selben Bedingungen getestet wurden.

#### 4.4.2 Analytischer Teil

Der getrocknete Hefekuchen samt Filter wird für das alkalische Aufschlußverfahren vorbereitet. Dazu wird er zunächst unter Zugabe von verdünnter HCl und Zugabe des internen Standards Cholesterol 30 min rückfließend erhitzt. Dies geschieht meist mit 4 Ansätzen gleichzeitig. Aus praktischen Gründen hat es sich als sehr geeignet erwiesen diesen und den nachfolgenden Hydrolyse-Schritt im Rundkolben auf dem Sandbad mit aufgesetztem Steigrohr durchzuführen. Das Sandbad erfüllt neben der Heizfunktion und der Möglichkeit, viele Pro-

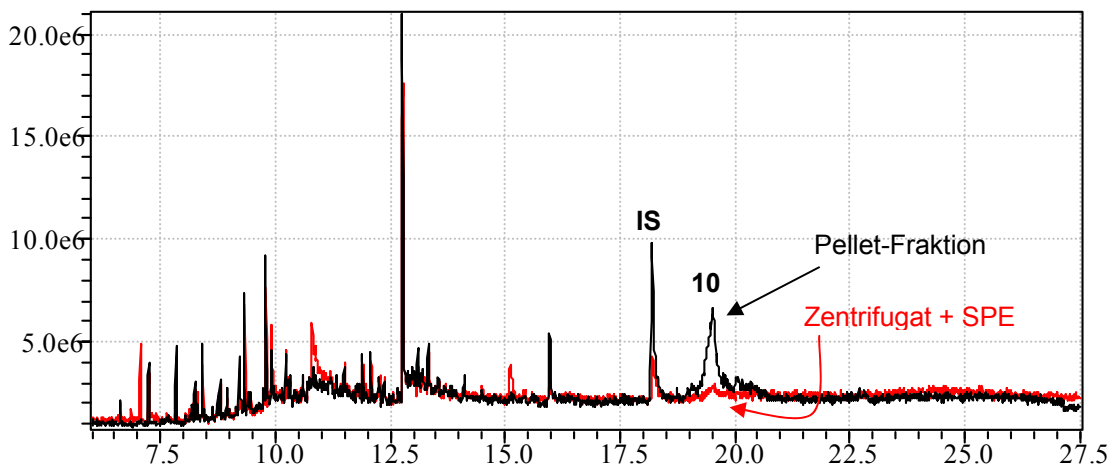
ben gleichzeitig aufzunehmen, die wichtige Funktion des Lichtschutzes der teilweise lichtempfindlichen Sterole. Zu diesem Zweck wird der Rundkolben mit dem Ansatz vollständig im Sand vergraben. Das Steigrohr ermöglicht, daß man die heiße Probe vom Sandbad nehmen kann, ohne während des Abkühlens auf den Rückfluß zu verzichten. Gleichzeitig spart man sich den Verbrauch von Kühlwasser.

In Folge dieses ersten Einwirkens durch die verdünnte Säure löst sich der gequollene Hefekuchen vom Membranfilter ab. Daher kann dieser nun vorsichtig unter Waschen mit dem eigentlichen Hydrolysereagens (Ethanol : KOH = 70 : 30) entfernt werden. Vor der Zugabe der gesamten Menge an Hydrolysereagens wird der Hefekuchen mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Die auftretenden Scherkräfte zerstören die Hefezellen und ermöglichen einen besseren Aufschluß der Zellinhaltsstoffe. Zellbestandteile am Ultra-Turrax werden mit dem restlichen Hydrolysereagens in den Kolben zurückgewaschen. Anschließend wird erneut auf dem Sandbad unter Rückfluß erhitzt.

Nach beendeter Hydrolyse werden die Hydrolysate in Zentrifugengläser überführt und sofort zentrifugiert. Eine zu lange Pause zwischen den Aufarbeitungsschritten und eine starke Abkühlung der Probe sind dabei zu vermeiden, weil sich das negativ auf die Löslichkeit der Sterole auswirkt. In diesem Fall werden die Sterole an die abzentrifugierten Hefebestandteile adsorbiert und stehen der SPE nicht mehr zur Verfügung.

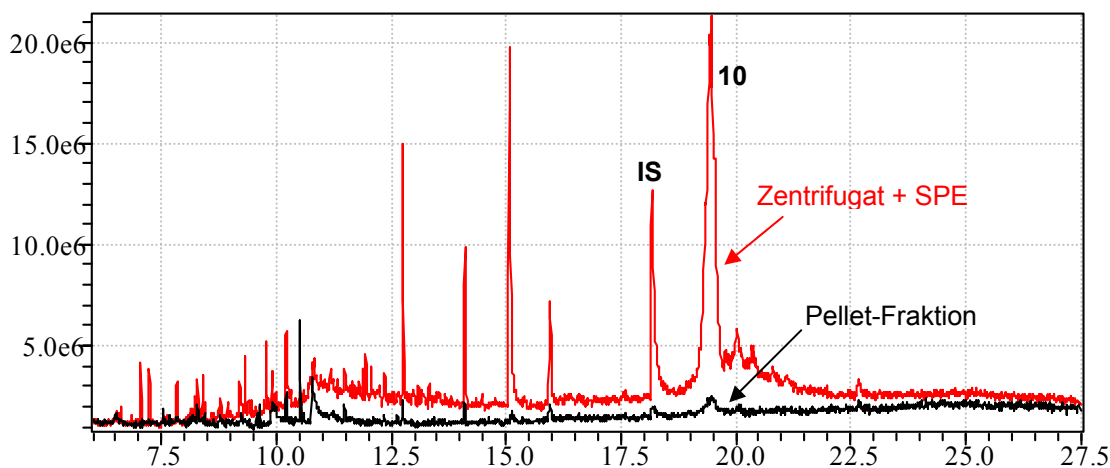
Der negative Einfluß eines ungeeigneten Mischungsverhältnisses des bei der Hydrolyse zugegebenen Hydrolysereagens und einer zu langen Pause zwischen Hydrolyse und Zentrifugation, sowie zwischen Zentrifugation und SPE, soll nachfolgend verdeutlicht werden.

Zu Beginn der Methodenentwicklung führte das Mischungsverhältnis des Hydrolysereagens (Ethanol : KOH = 50 : 50) in Verbindung mit einer zu langen Warte- und Abkühlzeit der Probe zu einer Anreicherung der Sterole in der Pellet-Fraktion (Abbildung 57). Die behelfsmäßige Extraktion aus dem Pellet erfolgte durch klassisches „Ausschütteln“ im wäßrig-organischen Zweiphasensystem gegen Ethylacetat und Aufkonzentrierung im Rotavapor.



**Abbildung 57: Bildmontage: Anreicherung der Sterole in der Pellet-Fraktion infolge von methodischen Fehlern in der Aufarbeitung**

Dieses ungünstige Resultat konnte durch Erhöhung des Ethanolanteils im Hydrolysereagens, sofortige warme Zentrifugation und schnelle anschließende SPE korrigiert werden (Abbildung 58).



**Abbildung 58: Bildmontage: Anreicherung der Sterole im Zentrifugat nach erfolgreicher Änderung einiger Aufarbeitungsparameter**

An die Entnahme der noch warmen Zentrifugengläser schließt sich, wie erwähnt, sofort die Sterolextraktion aus dem Zentrifugat mittels SPE an. Die SPE-Phase wird erst durch Zugabe von Methanol und dann durch Zugabe eines Wasser-Ethanol-Gemisches vorkonditioniert. Es folgt die Probenaufgabe. Vor dem Trockenlaufenlassen der SPE-Kartusche werden unerwünschte Probenreste von der Säule gewaschen. Das bis dahin angefallene Eluat wird verworfen und die Sterole von der SPE-Phase mit Ethylacetat eluiert. Durch den „eingebauten“ Filtrationsschritt bei der SPE steht der gewonnene schwebstofffreie Sterolextrakt direkt für die Untersuchungen mit dem GC-MS, HPLC-DAD oder LC-MS/MS zur Verfügung.

#### 4.4.3 Chromatographische Untersuchung des Sterolextraktes

Details zur Untersuchung und Identifizierung von Sterolen wurden bereits in den entsprechenden Abschnitten von Kapitel 3 beschrieben. Ebenso wurden auch die im Verlauf der Testungsphase neu entdeckten Sterole in Kapitel 3 besprochen.

Hinsichtlich der Bedeutung der drei chromatographischen Untersuchungsverfahren (GC-MS, HPLC-DAD und LC-MS/MS) für den Routinebetrieb war die Untersuchung am GC-MS in den meisten Fällen ausreichend. Hier war die verlässlichste Identifizierung der Sterole durch Retentionszeit und - vor allem – Abgleich der Massenspektren mit der zuvor aufgebauten MS-Datenbank gegeben.

Solange bei untersuchten Proben keine neuartigen Sterole gefunden wurden, mußten die anderen chromatographischen Methoden nicht bemüht werden.

Im anderen Falle wurde, wie in Abbildung 54 (S. 57) gezeigt, vorgegangen. Auf diese Art konnte Ignosterol (**14**) zweifelsfrei identifiziert werden. Brachte die Kombination der drei Methoden noch keine sichere Identifizierung eines neuen Sterols, so mußte mit Hilfe der präparativen HPLC versucht werden, genügend Reinsubstanz für eine  $^1\text{H-NMR}$ -Bestimmung zu isolieren. So geschehen bei der Identifizierung von Cholesta-5,7,24-trienol (**15**) und Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**).

## 4.5 Testergebnisse

Im Verlauf der Testphase wurden 9 kommerzielle Antimykotika und 32 Substanzen, die bisher noch nicht auf ihr antimykotisches Wirkungsspektrum hin untersucht wurden, getestet.

In diesem Abschnitt wird auf das entsprechende, bei *Y. lipolytica* zu beobachtende Sterolmuster eingegangen, wie es sich bei EC<sub>50</sub> im GC-MS-Chromatogramm darstellt, und welche Rückschlüsse über das Zielenzym sich daraus ableiten lassen.

Die als Referenzen eingesetzten Antimykotika decken die drei großen Gruppen der Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren ab:

1. *Allylamin-Gruppe* mit den beiden Vertretern Naftifin und Terbinafin
2. *Azol-Gruppe* mit den drei Vertretern Clotrimazol, Fluconazol und Ketoconazol
3. *Morpholin-Gruppe* mit den vier Vertretern Amorolfiin, Fenpropidin, Fenpropimorph und Tridemorph

Über die jeweiligen Wirkmechanismen wurde in Kapitel 2 ausführlich berichtet.

Erwähnung finden sollten ebenfalls die Bemühungen, die nicht-SBI-Antimykotika Griseofulvin und Nystatin, als *Negativreferenzen* mit *Y. lipolytica* zu inkubieren. Leider verhinderte deren schlechte Löslichkeit im Medium bei bereits geringen Konzentrationen, daß die für eine Wachstumsreduktion erforderliche Mindestmenge zugegeben werden konnte.

Die untersuchten potentiellen Wirkstoffe stammen überwiegend aus unserem Arbeitskreis. Sie werden ebenfalls in diesem Abschnitt vorgestellt und es wird auf die gefundenen Ergebnisse eingegangen. Da sie sich jeweils von einigen wenigen definierten Grundstrukturen ableiten lassen, werden sie entsprechend gruppiert und, sofern möglich, bezüglich Übereinstimmungen mit den Referenz-Wirkstoffen verglichen.

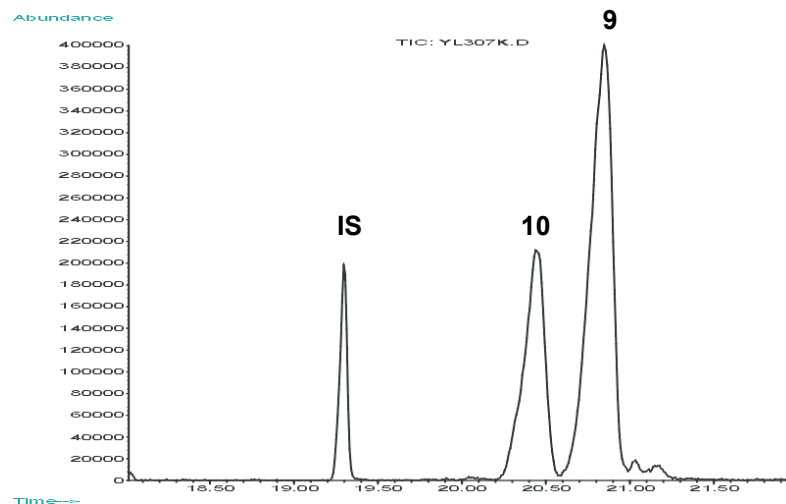
Bevor jedoch auf Unterschiede im Sterolmuster nach Gabe subletaler Dosen an Wirkstoff eingegangen werden kann, sollen zunächst die Sterolmuster der unbehandelten Kontrolle von *Y. lipolytica* in Ruhe- und Schüttelkultur vorgestellt werden.

### 4.5.1 Sterolmuster und Wachstum der *Y. lipolytica* Kontrolle

In Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen, d.h. Ruhe- oder Schüttelinkubation ändern sich sowohl die nach 72 h maximal erreichbare Biomasse, als auch die Zusammensetzung des Grundsterolmusters.

In Ruhekultur erreicht *Y. lipolytica* eine maximale Trocken-Biomasse von 120 – 130 mg bei den vorgegebenen Bedingungen. Nachdem *Y. lipolytica* ein Pilzmycel ausbildet, das auf der Oberfläche des Mediums aufschwimmt, kann die Wachstumsbeschränkung zurückzuführen sein auf eine Sauerstoffverarmung des Mediums und/oder auf die im Kulturkolben limitierte Oberfläche.

Als typische Sterole in der Kontrolle werden Ergosterol (**10**) und 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) gefunden, wobei letzteres die direkte Biosynthesevorstufe des Ergosterols darstellt und im Anteil überwiegt.

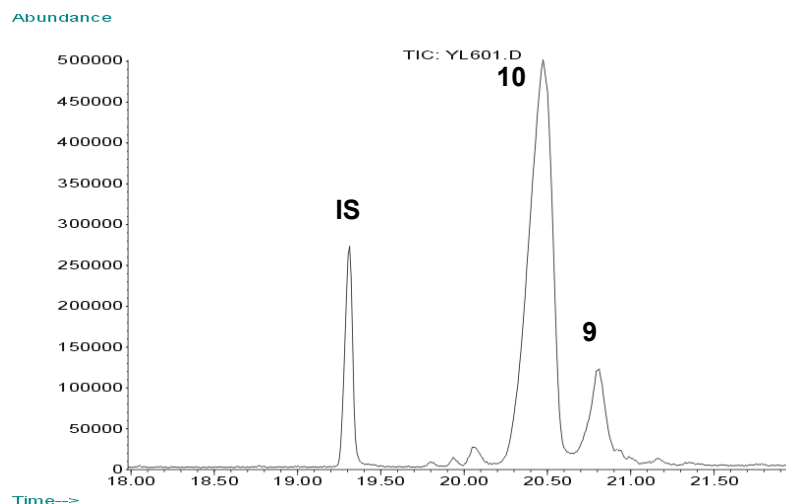


**Abbildung 59:** GC-MS-Chromatogramm von *Y. lipolytica* in Ruhekultur (Cholesterin (IS), Ergosterol (10) und 24(28)-Dehydroergosterol (9))

In Schüttelkultur bei 240 UPM erreicht *Y. lipolytica* eine maximale Trocken-Biomasse von 250 mg bei den vorgegebenen Bedingungen. Hierbei ist eine bessere Durchmischung mit Luftsauerstoff gegeben und die Oberfläche des Kulturkolbens wirkt nicht mehr limitierend. Lässt man den Kolben stehen, sinkt die Hefe flockig ab.

Als typische Sterole in der Kontrolle werden gefunden Ergosterol (10) und 24(28)-Dehydroergosterol (9), wobei im Unterschied zur Ruhekultur Ergosterol dominiert (Abbildung 60).

Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß die zur finalen Umsetzung durch die  $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase benötigte Menge an NADPH von 9 zu 10 in Ruhekultur limitiert ist und 24(28)-Dehydroergosterol als „bulk“-Sterol fungiert.



**Abbildung 60:** GC-MS-Chromatogramm von *Y. lipolytica* in Schüttelkultur (Cholesterin (IS), Ergosterol (10) und 24(28)-Dehydroergosterol (9))

#### 4.5.2 Sterolmuster und $EC_{50}$ der Referenz-Wirkstoffe

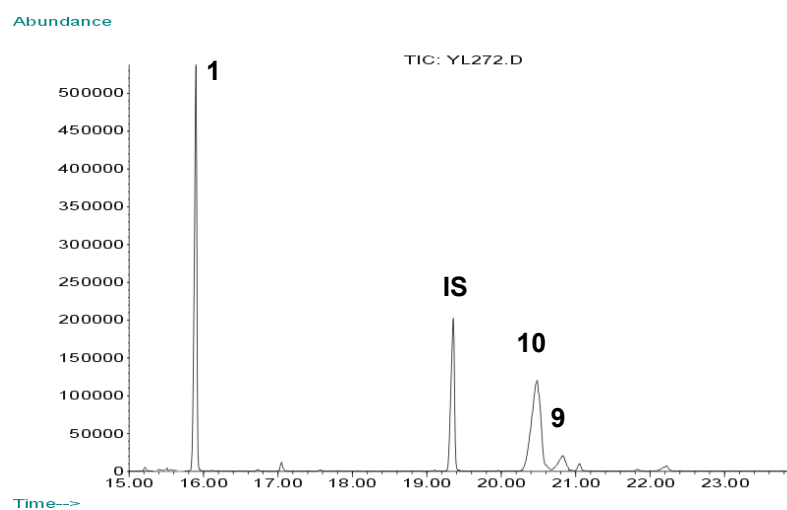
##### 4.5.2.1 Allylamin-Gruppe

Als Inhibitoren der Squalenepoxidase akkumulieren Naftifin und Terbinafin Squalen (1). Im Verlauf einer Testreihe von je 10 Einzelproben mit steigender Wirkstoffkonzentration kann



das Auftreten von Squalen ab einer Konzentration von 0,02 µg/ml (Terbinafin) bzw. 0,05 µg/ml (Naftifin) beobachtet werden, ohne daß es dabei bereits zu einer Reduktion des Wachstums kommt, im Gegenteil; bei sehr geringen Gaben eines der beiden Allylamine war zunächst ein signifikanter Wachstumszuwachs (trotz geringer Akkumulation von Squalen) gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Erst bei höheren Konzentrationen wirkte sich der inhibierende Effekt auf die Squalenepoxidase negativ auf das Pilzwachstum aus. Dieser „promykotische“ Effekt konnte bei wiederholten Versuchen beobachtet werden und ist auch in der Literatur<sup>45</sup> für Inhibitionsstudien verschiedener SBI's an *Nectria haematococca* beschrieben und in einem Dosis-Wachstums-Diagramm dokumentiert, wurde dort aber sonst nicht weiter erwähnt oder interpretiert.

Terbinafin ist mit einem ermittelten EC<sub>50</sub>-Wert von 0,5 µg/ml etwa sechsmal potenter als Naftifin (EC<sub>50</sub> ~ 3 µg/ml). Nachstehende Abbildung dokumentiert die Squalenakkumulation bei *Y. lipolytica* nach Gabe von Terbinafin.



**Abbildung 61: Akkumulation von Squalen (1) nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit Terbinafin**

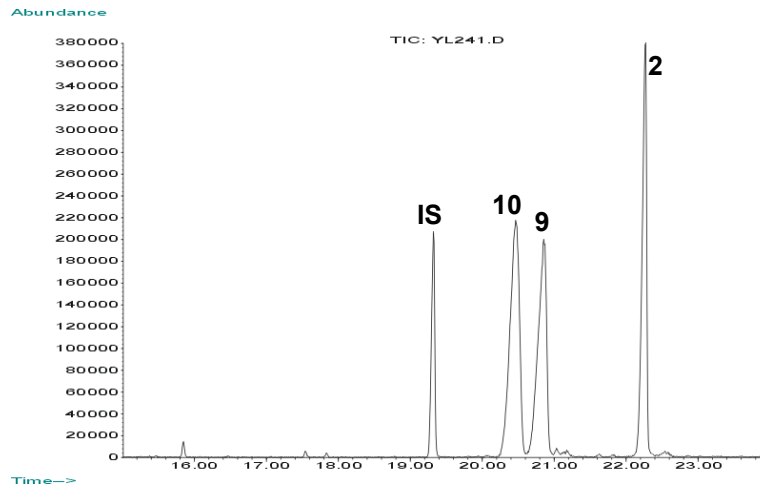
#### 4.5.2.2 Azol-Gruppe

Clotrimazol, Fluconazol und Ketoconazol wirken als Inhibitoren der Cyt. P-450<sub>14DM</sub> und bewirken bei *Y. lipolytica* in der Hauptsache eine Akkumulation von Lanosterol (**2**). Diese Beobachtung deckt sich mit entsprechenden Inhibitionsexperimenten mit Clotrimazol an *S. cerevisiae* und *Torulopsis glabrata*.<sup>38,11</sup> Bei *C. albicans* hingegen wird bei Inhibition mit Clotrimazol überwiegend eine Akkumulation von 24-Methylendihydrolanosterol beobachtet, die darauf zurückgeführt werden kann, daß der C-14-Demethylierungsschritt hier nach der C-24-Methylierung erfolgt.<sup>11</sup>

Bei Clotrimazol und Ketoconazol tritt Lanosterol bereits bei den geringsten eingesetzten Dosierungen (0,05 bzw. 0,02 µg/ml) auf und die Reduktion der Biomasse setzt unmittelbar ein.

Bei Fluconazol kann über den gemessenen Konzentrationsbereich von 0,02 bis 4 µg/ml kein deutlicher Rückgang der Biomasse verzeichnet werden, allerdings ist auch hier ab einer Konzentration von 0,3 µg/ml Lanosterol zu detektieren.

Clotrimazol ist in diesem Testsystem mit einem ermittelten EC<sub>50</sub>-Wert von 0,1 µg/ml etwa zehnmal potenter als Ketoconazol (EC<sub>50</sub> ~ 1 µg/ml). Der entsprechende Wert für Fluconazol liegt offensichtlich weit höher und konnte nicht exakt ermittelt werden. Nachstehende Abbildung dokumentiert stellvertretend für alle getesteten Azol-Antimykotika die Lanosterolakkumulation bei *Y. lipolytica* mit Fluconazol.



**Abbildung 62: Akkumulation von Lanosterol (2) nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit Fluconazol**

#### 4.5.2.3 Morpholin-Gruppe

Amorolfin, Fenpropidin, Fenpropimorph und Tridemorph werden zwar der gleichen Gruppe zugeordnet, man kann aber aufgrund der gefundenen Sterolmuster weiter differenzieren. Wie schon in 1.3.4 ausgeführt, inhibieren Morpholin-SBI's in Pilzen sowohl die Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase als auch die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase, aber je nach Wirkstoff in unterschiedlichem Ausmaß.

##### 1. Tridemorph

Tridemorph kann bei *Y. lipolytica* als reiner Inhibitor der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase angesehen werden. Dies wird dadurch belegt, daß – neben den „Stammsterolen“ Ergosterol (**10**) und 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) – nur  $\Delta^8$ -Sterole akkumulieren, namentlich Lichesterol (**12**), Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol (**13**) und Fecosterol (**7**) (Abbildung 63).

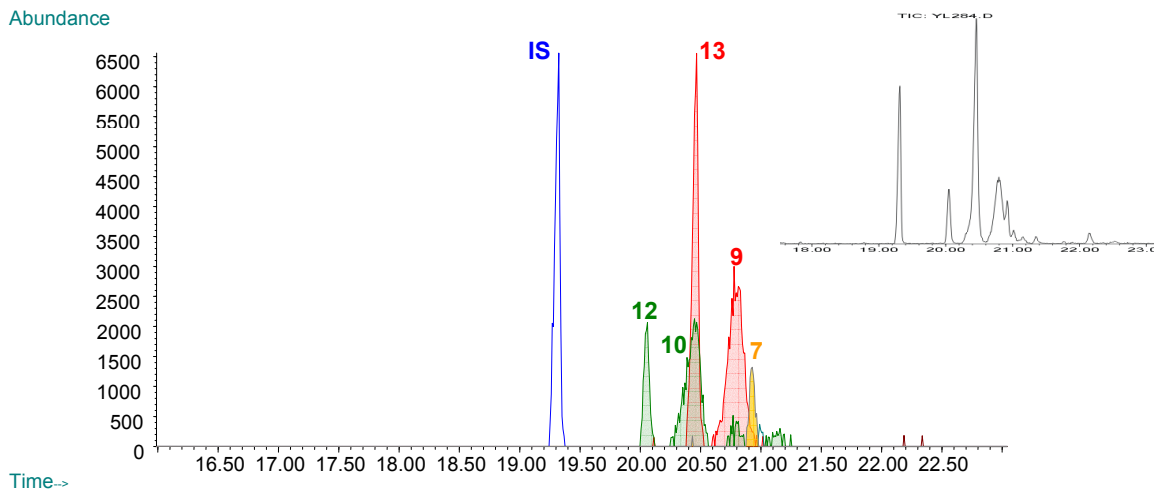
$\Delta^{8,14}$ -Sterole konnten selbst in Spuren nicht nachgewiesen werden. Die coeluiierenden Sterole **10** und **13** können aufgrund ihrer verschiedenen Molekülmassen differenziert werden.

Nicht erklärbar ist, daß bei höheren Konzentrationen an Wirkstoff in geringen Mengen Squalen (**1**) und Episterol (**8**) zu detektieren sind. Diese Beobachtungen wurden auch schon an *Nectria haematococca* gemacht, konnten aber nicht schlüssig erklärt werden.<sup>70,45</sup> Bei den eigenen Untersuchungen an *Y. lipolytica* konnten diese Beobachtungen auch bei den anderen Morpholinen gemacht werden.

Vergleicht man die Inhibitionswirkung von Tridemorph mit von *Y. lipolytica* verschiedenen Organismen, so werden z.B. bei *Ustilago avenae* und *Ustilago maydis* auch Anzeichen für eine gewisse Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibierung gefunden.<sup>33,44</sup> Bei *S. cerevisiae*, *Saprolegnia ferax* und *Nectria haematococca* jedoch wirkt Tridemorph ausschließlich als Isomerase-Inhibitor.<sup>70,44</sup>

Der EC<sub>50</sub>-Wert von Tridemorph im vorliegenden Testsystem liegt bei 1,5 µg/ml.



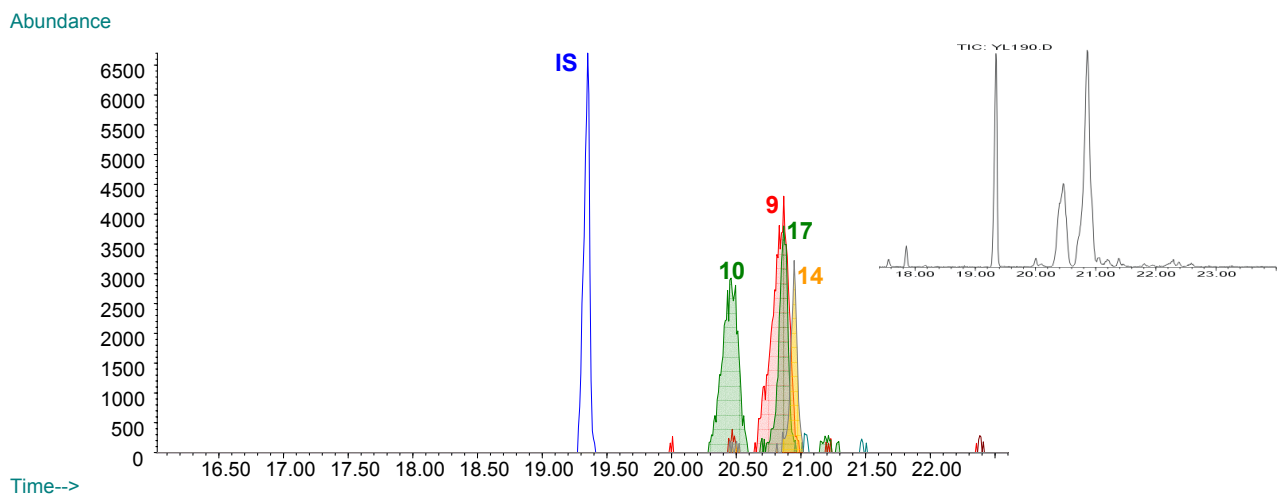


**Abbildung 63:** Akkumulation von  $\Delta^8$ -Sterolen nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit Tridemorph (eingefärbtes XIC, Mitte), sowie selbes Chromatogramm in der TIC-Ansicht (oben rechts)

## 2. Fenpropidin

Im Gegensatz zu Tridemorph wirkt Fenpropidin bei *Y. lipolytica* fast ausschließlich als Inhibitor der Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase. Bis auf einen geringen Anteil an Fecosterol (**7**), welcher wegen Coelution im GC-MS nur über LC-MS gefunden werden konnte und auf eine geringe Inhibitionswirkung auf die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase zurückzuführen ist, finden sich keine weiteren typischen Produkte, die auf einer Hemmung der Isomerase beruhen.

Statt dessen werden deutlich zwei  $\Delta^{8,14}$ -Sterole akkumuliert, namentlich Ignosterol (**14**) und Ergosta-8,14,24(28)-trienol (**17**), welche als typische Produkte der Hemmung der  $\Delta^{14}$ -Reduktase anzusehen sind (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Akkumulation von  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit Fenpropidin (eingefärbtes XIC, Mitte), sowie selbes Chromatogramm in der TIC-Ansicht (oben rechts)

Auch bei anderen Organismen wird für Fenpropidin die  $\Delta^{14}$ -Reduktase als wichtigstes Zielenzym angesehen. Es wirkt jedoch zu einem von Stamm und Kulturbedingungen abhängigen geringen Anteil auch als Inhibitor der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase. So konnten bei *Ustilago avenae*

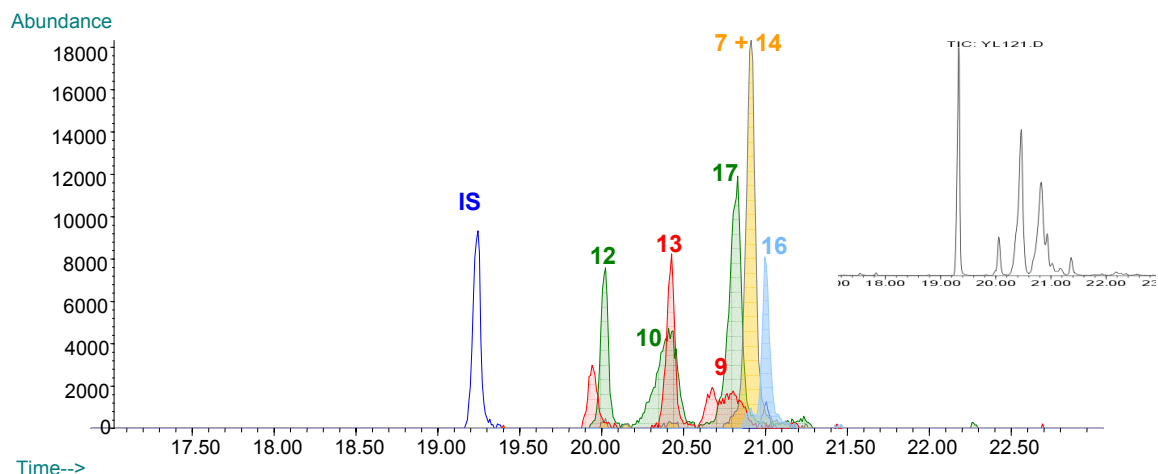
auch Lichosterol (**12**) und das keinem der beiden Inhibitionstypen zuzuordnende Fungisterol (**11**) gefunden werden.

Für Fenpropidin konnte ein  $EC_{50}$  von 3  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden.

### 3. Amorolfin und Fenpropimorph

Das durch Inkubation von *Y. lipolytica* mit Amorolfin und Fenpropimorph erzeugte Sterolmuster zeigt eine Mischung der durch Fenpropidin und Tridemorph erzeugten Muster (Abbildung 65). Das von Amorolfin erzeugte Sterolmuster ist identisch mit dem von Fenpropimorph. Alle für eine Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibition und eine  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibition typischen Produkte werden beobachtet (vgl. Abbildung 63, Abbildung 64). Entsprechend zeigt das GC-MS-Chromatogramm eine Vielzahl von Sterolen. Besonders die nicht zu unterscheidende Anwesenheit von Ignosterol (**14**) und/oder Fecosterol (**7**) macht eine LC-MS-Analytik erforderlich. Dies wurde bereits in Abbildung 54 (S. 57) illustriert.

Ein weiteres, für eine Inhibition der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase sprechendes, anomales Sterol ist Ergosta-8-enol (**16**). Es kann im Verlauf wiederholter Testungen von ein und derselben Isomerase-inhibierenden Testsubstanz massiven Intensitätsschwankungen unterliegen oder kann sogar ganz ausbleiben. Es muß daher ursächlich von den Kulturbedingungen und weniger von der Qualität des Wirkstoffes abhängig sein. Eine schlüssige Erklärung kann nicht gegeben werden.

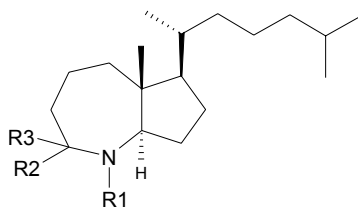


**Abbildung 65:** Akkumulation von  $\Delta^8$ - und  $\Delta^{8,14}$ -Sterolen nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit Amorolfin oder Fenpropimorph (eingefärbtes XIC, Mitte), sowie selbes Chromatogramm in der TIC-Ansicht (oben rechts)

## 4.5.3 Sterolmuster und $EC_{50}$ der getesteten Substanzen aus dem Arbeitskreis

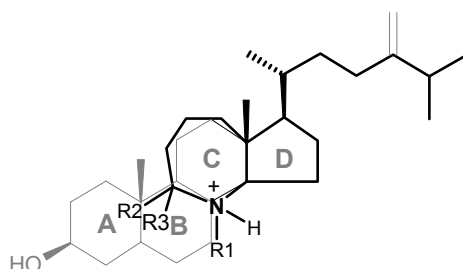
### 4.5.3.1 Azasecosteroide

20 der insgesamt 32 getesteten Verbindungen gehören zur Klasse der Azasecosteroide. Sie entsprechen alle dem in Abbildung 66 gezeigten Grundtypus.



**Abbildung 66: Grundstruktur der getesteten Azasecosteroide**

Aufgrund ihrer Struktur sind diese Verbindungen unter physiologischen Bedingungen am Stickstoff protoniert. Damit sind sie potentiell zu einer partiellen Mimikry des HEI's, das bei der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerisierung postuliert wird, geeignet. Hierbei kommt der protonierte Stickstoff an der carbokationischen C-8 Position des HEI's zu liegen und die Substituenten R1 und R2 können geeignet sein, die Ringe A und B zu imitieren.

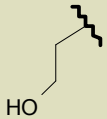
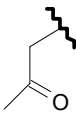
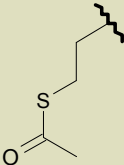
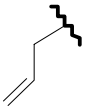
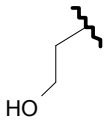
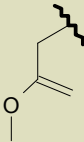
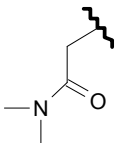
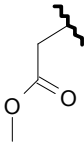
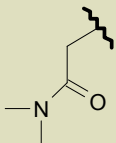
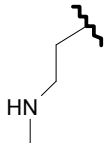


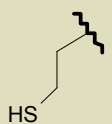
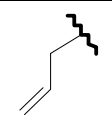
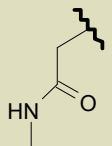
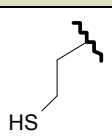
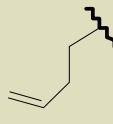
**Abbildung 67: Partielle Mimikry des HEI der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerisierung durch protonierte Azasecosteroide**

Ausnahmslos alle untersuchten Azasecosteroide zeigen ein qualitativ gleiches Sterolmuster wie der Referenz-Wirkstoff Tridemorph. Damit sind sie zweifelsfrei als Inhibitoren der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase charakterisiert. Nachdem keinerlei Anzeichen für eine Inhibition der Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase zu beobachten waren, kann man von einer hohen Wirkortspezifität ausgehen.

In Abhängigkeit von den Substituenten R1 und R2 lassen sich jedoch deutliche Unterschiede in den Wirkstärken feststellen, welche in einem  $EC_{50}$ -Bereich von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  bis weit über dem maximal durch die Methode bestimmbar Bereich von 4  $\mu\text{g/ml}$  liegen.

	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R3</u>	<u>EC<sub>50</sub></u> <u>[<math>\mu\text{g/ml}</math>]</u>	<u>Zielenzym</u>
<b>NS-36</b>	Me		H	0,4	$\Delta^{8 \rightarrow 7}$ -Isomerase
<b>NS-62</b>	Me		H	0,5	$\Delta^{8 \rightarrow 7}$ -Isomerase
<b>NS-53-I</b>	H		H	1	$\Delta^{8 \rightarrow 7}$ -Isomerase

NS-40	-CH <sub>3</sub>		-H	1,1	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-53	-H		-H	1,5	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-63	-H		-H	1,5	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
JCB-N-Allylamin			-H	-H	1,5	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase
NS-55	-CH <sub>3</sub>		-H	2	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-41	-H		-H	2,5	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-57-I	-CH <sub>3</sub>		-H	3	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-47	-H		-H	3,5	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
JCB-N-Ethylamin	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		-H	-H	4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase
NS-20	-H		-H	> 4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-56	-CH <sub>3</sub>		-H	>4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	
NS-58	-CH <sub>3</sub>		-H	>4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase	

NS-64	-CH <sub>3</sub>		-H	>4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase
JCB-Methylallylamin	-H		-CH <sub>3</sub>	>4	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase
NS-54	-H		-H	nicht feststellbar	
NS-65	-H		-H	nicht feststellbar	$\Delta^{8\rightarrow7}$ -Isomerase
JCB-Homoallyl-	-H		-H	nicht feststellbar	nicht feststellbar

**Tabelle 7: Einordnung von Wirkstärke und Wirkort der getesteten Azasecosteroide**

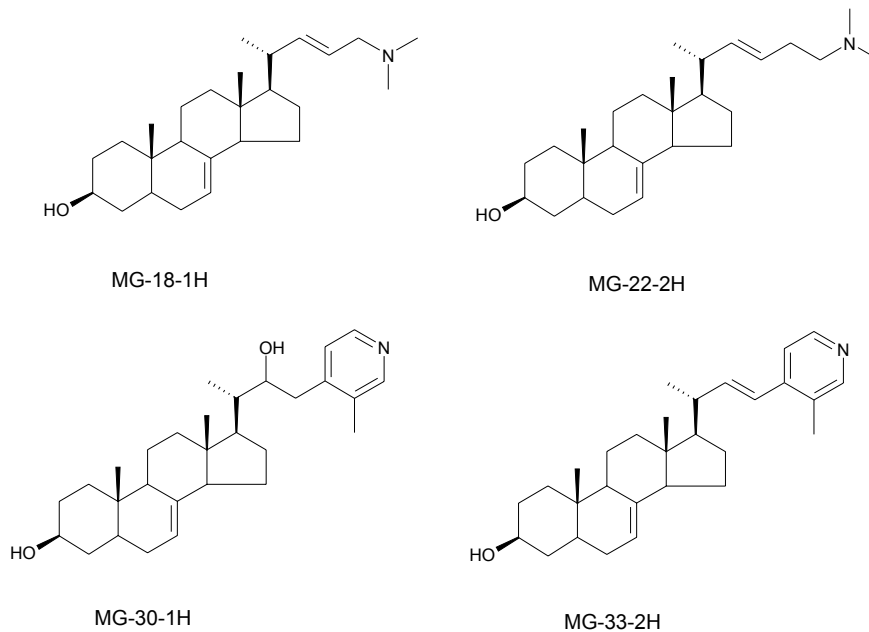
Die Anzahl der untersuchten Verbindungen läßt leider noch keine allgemein umfassenden Aussagen über Struktur-Wirkstärke-Beziehungen zu.

Unter den Testsubstanzen sind sieben strukturgleiche Paare NS-36/20, NS-62/63, NS-53-1/57-1, NS-40/41, NS-55/54, NS-47/56, NS-64/65 (unterstrichen: R1 = Methyl), welche sich nur in R1 in punkto Wasserstoff- oder Methylrest unterscheiden. Hierbei zeichnet sich zumindest ein Trend ab, nachdem eine Methylsubstitution des Ringstickstoffes in fünf der sieben Fälle zu dem potenteren Wirkstoff führt.

Vergleicht man die Verbindungen JCB-N-Allylamin, JCB-N-Ethylamin, JCB-Methylallylamin und JCB-Homoallylamin, so kann man ebenfalls feststellen, daß eine Substitution am Stickstoff wirksamere Inhibitoren liefert. Diese Erkenntnis ist auch schon von *Burbiel*<sup>71</sup> gemacht worden, welcher die genannten Verbindungen hergestellt hat. Mit dem vorliegenden Testsystem nicht nachvollziehbar war allerdings das ebenfalls gute Abschneiden von JCB-Methylallylamin und JCB-Homoallylamin, welche eine den N-alkylierten Verbindungen gleichwertige Inhibitionswirkung auf *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Candida parapsilosis* aufwiesen. Offensichtlich läßt *Y. lipolytica* in dieser Hinsicht keine direkte Vergleichbarkeit zu diesen Stämmen zu.

### 4.5.3.2 Azasterole

Die getesteten Verbindungen leiten sich von einem Cholesta-7-enol-Grundgerüst ab und tragen in der Sterolseitenkette eine Amin- oder Pyridin-Funktionalisierung (Abbildung 68).



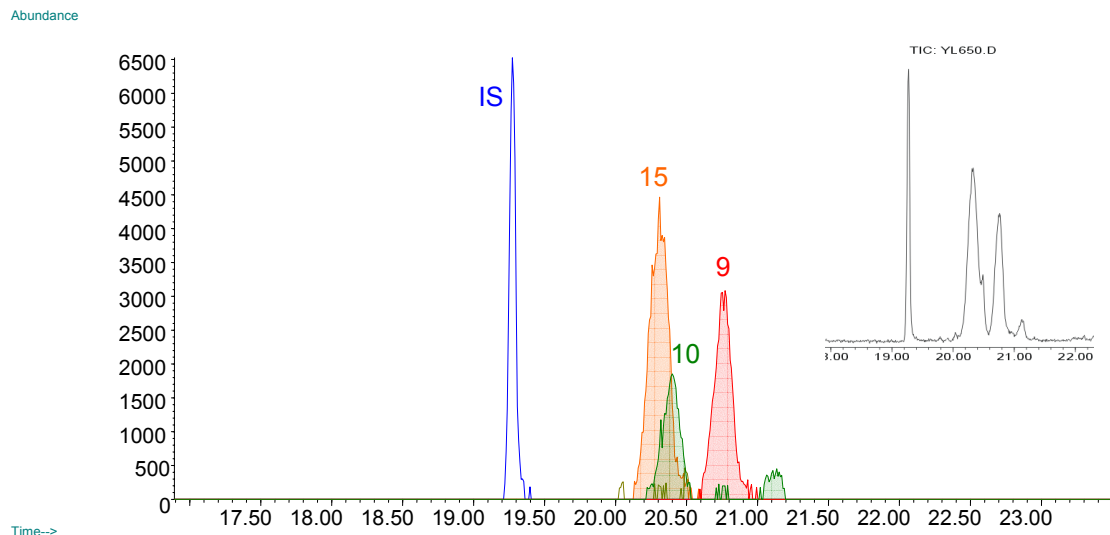
**Abbildung 68: Getestete Azasterole**

Während bei MG-30-1H und MG-33-2H in Konzentrationen bis 4  $\mu\text{g/ml}$  keine Veränderungen im Hefewachstum oder im Sterolmuster zu beobachten waren, zeigten MG-18-1H und MG-22-2H bei  $\text{EC}_{50}$ -Werten von 0,2 bzw. 0,4  $\mu\text{g/ml}$  einen Effekt auf das Wachstum und das Sterolmuster. Neben kleinen Mengen nicht identifizierter Sterole akkumulierte in besonderem Maße Cholesta-5,7,24-trienol (**15**).

Dies belegt eine Inhibierung der C-24-Methyltransferase (SMT), welche die Sterolseitenkettenmethylierung katalysiert. Da die beiden wirksamen Verbindungen strukturell große Ähnlichkeiten mit den in Abbildung 28 gezeigten SMT-Inhibitoren haben, war ein entsprechendes Resultat auch erwartet worden.

Das anormale Sterol Cholesta-5,7,24-trienol gibt ein Beispiel für die offensichtlich geringe Substratspezifität der Enzyme der Ergosterolbiosynthese, denn ungeachtet der ausbleibenden C-24-Methylierung kann das  $\Delta^8$ -Substrat Zymosterol bis zu einer dem Ergosterol entsprechenden  $\Delta^{5,7}$ -Funktionalisierung umgesetzt werden (vgl. Abbildung 6).

Das erhaltene Sterolmuster deckt sich mit keinem der Referenz-Wirkstoffe und wird daher in Abbildung 69 gezeigt.



**Abbildung 69:** Akkumulation von Cholesta-5,7,24-trienol (15) nach Inkubation von *Y. lipolytica* mit 25-Aza-cholesta-7,22-dienol (MG-18-1H) (eingefärbtes XIC, Mitte), sowie selbes Chromatogramm in der TIC-Ansicht (oben rechts)

#### 4.5.4 Weitere Testsubstanzen

Einige weitere Substanzen bzw. Mischungen gaben aufgrund positiver Befunde im Plattendiffusionstest Anlaß zur Überprüfung, ob die antimykotische Aktivität auf eine Inhibierung der Ergosterolbiosynthese zurückzuführen ist. Im Vorgriff auf die folgenden Erläuterungen kann berichtet werden, daß sich kein SBI darunter befand, daher werden sie nur in aller Kürze abgehandelt. Die folgenden Beispiele belegen damit, daß die vorgestellte Screening-Methode zur Unterscheidung von SBI's und nicht-SBI's geeignet ist. Eine unspezifische antimykotische Aktivität manifestiert sich in einer Abnahme des Hefewachstums, was man auch im Chromatogramm anhand eines Vergleichs der abnehmenden Signalintensitäten der Stammsterole gegenüber dem internen Standard beobachten kann. Gegenüber der Kontrolle ändert sich dabei am relativen Verhältnis der Stammsterole Ergosterol (10) und 24(28)-Dehydroergosterol (9) zueinander nichts.

Im Einzelnen wurden untersucht:

#### Sampangin

Dieses Alkaloid aus *Cananga odorata* (*Annonaceae*) konnte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit im Nährmedium nur bis zu einer Konzentration von 1,5 µg/ml in Ruhekultur getestet werden. Die beobachtete Abnahme der Biomasse reichte jedoch nicht aus, um den EC<sub>50</sub>-Wert zu erreichen.

Nachdem die Intensitäten der Stammsterole von *Y. lipolytica* parallel zum Rückgang der Biomasse abnahmen, ohne daß sich weitere Änderungen im Sterolmuster ergaben, kann ein SBI-Wirkprinzip als Grund für den antimykotischen Effekt ausgeschlossen werden.

#### Teebaumöl und seine Hauptkomponente Menthen-4-ol

Teebaumöl wird in der Laienpresse oft eine Allheilmittelwirkung zugesprochen. Dies schließt auch eine antimykotische Wirksamkeit ein. Daher war es naheliegend, dieses ätherische Öl zusammen mit seinem Hauptinhaltsstoff Menthen-4-ol auf SBI-Aktivität zu screenen.

Beide Öle wurden freundlicherweise von Prof. Reichling von der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt, direkt dem Medium zugegeben und unter Schüttelkulturbedingungen untersucht. In beiden Fällen konnte keine qualitative Änderung im Sterolmuster festgestellt werden. Mit  $EC_{50}$ -Werten von 0,5 mg/ml (Teebaumöl) und 0,3 mg/ml (Menthen-4-ol) lag also eine unspezifische antimykotische Aktivität vor.

### **Melissenöl und Blutorangenöl**

Nach den durch das Teebaumöl-Screening gewonnenen Erkenntnissen, lag die Frage nahe, ob Teebaumöl hinsichtlich der antimykotischen Aktivität eine herausragende Stellung unter den ätherischen Ölen einnimmt, oder ob auch andere ätherische Öle eine vergleichbare Wirkung haben. Zu diesem Zweck wurden Melissenöl und das Duftlampenöl „Blutorange“ (Fa. Bergland) getestet.

Beide Öle entstammen der privaten Sammlung. Sie wurden direkt dem Medium zugegeben und unter Schüttelkulturbedingungen untersucht und zeigten eine Reduktion des Hefewachstums ohne qualitative Auswirkungen auf das Sterolmuster. Damit lag eine unspezifische antimykotische Aktivität vor. Melissenöl ist mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 0,2 mg/ml doppelt so wirksam wie Blutorangenöl. Erwähnenswert ist, daß bei der Aufarbeitung die im Orangenöl enthaltenen Phytosterole mitextrahiert wurden.

Das Ergebnis dieses Vergleiches ätherischer Öle ist, daß das „hochgelobte“ Teebaumöl hinsichtlich der antimykotischen Wirksamkeit keine herausragende Stellung einnimmt und *möglicherweise* jedes „Duftwässerchen“ in unterschiedlichem Ausmaß zur Wachstumsbeeinträchtigung bei Pilzen geeignet ist.

Diese letzte Hypothese sollte – unter nicht mehr allzu wissenschaftlichen Gesichtspunkten – in einer finalen Testreihe überprüft werden.

### **Davidoff „Cool Water“, Calvin Klein „Contradiction“ und Chanel „No. 5“**

Dazu wurden drei bekannte Herren- und Damenparfums direkt aus dem Flakon entnommen und in Testreihen mit je fünf Einzelproben getestet.

Die Parfums wurden direkt dem Medium zugegeben und in Ruhekultur inkubiert. „Cool Water“ und „Contradiction“ bewirkten eine Wachstumsreduktion bei Konzentrationen über 0,5 mg/ml. Ihre  $EC_{50}$ -Werte lagen mit  $> 2$  mg/ml außerhalb des untersuchten Bereiches. Nachdem sich keine qualitativen Veränderungen der Sterolmuster ergaben, ist auch hier von einer unspezifischen antimykotischen Aktivität auszugehen. „No. 5“ zeigte bis 2 mg/ml keine Beeinflussung des Wachstums.



## 5 Zusammenfassung

Ein wichtiges Target bei der Entwicklung neuer antimykotisch wirksamer Verbindungen ist die Inhibierung der Ergosterolbiosynthese. Ergosterol trägt als ein wesentlicher Bestandteil der Pilzzellwand zur Membranfluidität bei. Neben dieser sogenannten „bulk“-Funktion übernimmt Ergosterol in der Pilzzelle auch hormonelle Aufgaben. Nachdem Säugetiere und Pflanzen einen vom Pilz verschiedenen Sterolmetabolismus mit z.T. anderen Enzymausstattungen besitzen, bietet sich diese „Achillesferse“ des Pilzes als Ansatzpunkt für die Entwicklung von *Sterol-Biosynthese-Inhibitoren* (SBI's) als Antimykotika an.

Wirkstoffe aus den Klassen der Allylamine, Morpholine oder Azole greifen an verschiedenen Enzymen der Ergosterolbiosynthese an und verursachen damit je nach molekularem Angriffspunkt eine Akkumulation von Precursoren und/oder anderen typischen Sterolen. Die genannten Wirkstoffklassen stellen derzeit die wirksamsten Waffen gegen Pilzkrankungen dar. Allerdings erfordert eine zunehmende Resistenzbildung und eine steigende Zahl an mykoseanfälligen Patienten, daß neue Wirkstoffe entwickelt und auch als solche frühestmöglich erkannt werden.

Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Aufgabe ein biologisches Testsystem zu etablieren, welches in der Lage ist neue potentielle Antimykotika hinsichtlich ihres Potentials, die Ergosterolbiosynthese zu inhibieren, zu charakterisieren. Dabei sollte auch das potentielle Zielenzym dieser neuen Verbindungen herausgefunden werden und eine Möglichkeit geschaffen werden, um Derivate einer Substanzklasse hinsichtlich ihrer Wirkstärke vergleichbar zu machen. Schließlich sollte dieses Testsystem den Anforderungen an eine Routinemethode gerecht werden.

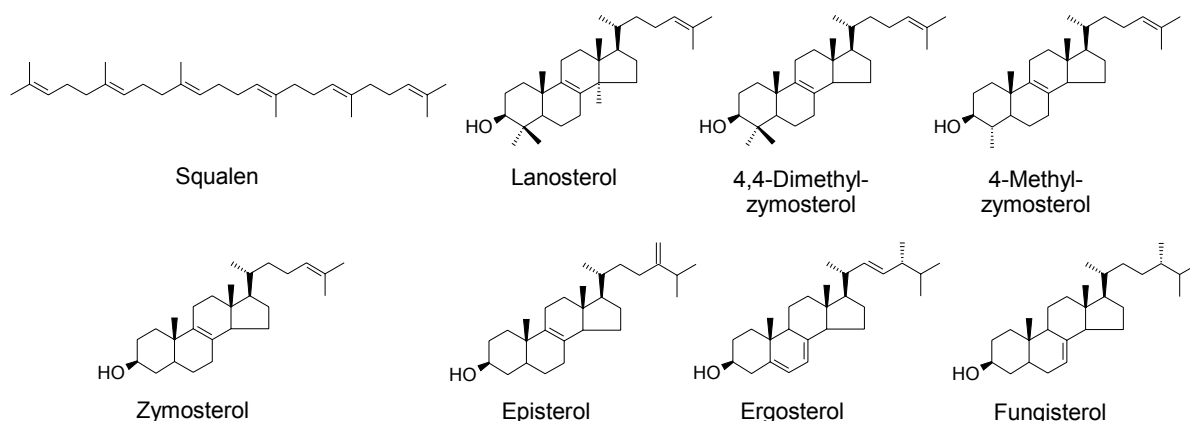
Die Umsetzung der gestellten Aufgabe erforderte sowohl eine analytische als auch eine mikrobiologische Herangehensweise.

Das Grundprinzip des Testsystems beruht auf der Inkubation eines Testorganismus mit subletalen Mengen an Wirkstoff. Bei einem Inhibitionserfolg verändert sich das Sterolmuster des Pilzes, abhängig vom Angriffsort des Wirkstoffes in der Ergosterolbiosynthese. Diese Veränderungen gegenüber dem normalen Sterolmuster können nach Extraktion der Sterolfraction chromatographisch dargestellt und interpretiert werden. Dies läßt sich idealerweise durch Abgleich mit einer Datenbank von Massenspektren bewerkstelligen, welche alle auftretenden Sterolsignale identifiziert.

Der Aufbau dieser Steroldatenbank erforderte im Vorfeld zur Entwicklung des Testsystems eine Auseinandersetzung mit den Grenzen und Möglichkeiten der Sterolanalytik durch präparative HPLC, HPLC-DAD, HPLC-MS/MS und GC-MS und die Gewinnung von Ergosterolbiosynthesevorstufen aus einer geeigneten Sterolquelle. Auf diese analytischen Aspekte wird im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 3) eingegangen.

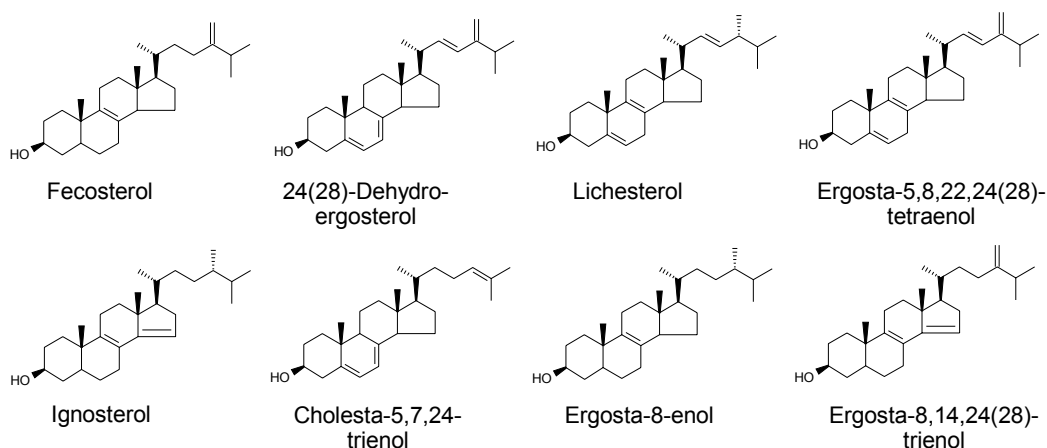
Nachdem praktisch keine der benötigten Biosynthesevorstufen kommerziell zu beschaffen war, mußte nach einem anderen Weg gesucht werden. Dabei ergab sich die Möglichkeit der Isolierung aus einem Hefefett. Dies wurde nach Extraktion durch gekühltes Aceton und anschließende Fraktionierung und Isolierung durch mehrfache präparative HPLC und Umkristallisation aus Methanol realisiert.

Aus Hefefett konnten dabei Squalen, Lanosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Zymosterol, Episterol, Ergosterol, und Fungisterol isoliert werden.



**Abbildung 70: Aus Hefefett isolierte Verbindungen**

Weitere Ergosterolprecursoren traten im Verlauf der eigentlichen Testphase bei diversen Inhibitionsversuchen auf. Dies sind Fecosterol, 24(28)-Dehydroergosterol, Lichesterol, Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol, Ignosterol, Cholesta-5,7,24-trienol, Ergosta-8-enol und Ergosta-8,14,24(28)-trienol.



**Abbildung 71: Weitere charakterisierte Verbindungen**

Gemeinsam mit einem weiteren Sterol, welches von dritter Seite zu Referenzzwecken zur Verfügung gestellt wurde (4,4-Dimethylcholesta-8,24,24-trienol), wurden alle Verbindungen mit Hilfe von HPLC-DAD, GC-MS, LC-MS/MS und NMR charakterisiert und aufgenommene EI-Massenspektren in einer MS-Datenbank archiviert.

Bei der Identifizierung der zunächst unbekanntesten Verbindungen hat sich die LC-MS/MS als wertvolles Bindeglied zwischen HPLC-DAD und GC-MS erwiesen. Mit ihrer Hilfe war es erstmals möglich, die im DAD aufgenommenen UV-Spektren der Verbindungen sicher mit deren EI-Massenspektren zu korrelieren und in Verbindung mit Retentionseigenschaften eine weitgehende Strukturaufklärung auch ohne Zuhilfenahme des NMR durchzuführen. Zudem konnte hiermit erstmals eine sichere Methode vorgestellt werden, welche Coelutionen von Sterolen mit gleichen Massen, sowohl GC- als auch HPLC-seitig erkennen hilft. Als Folge der Einführung dieser neuen Technik ist es nun auch zum ersten Male möglich, Fecosterol und Ignosterol sicher nebeneinander zu detektieren – und gegebenenfalls auch zu quantifizieren. Jedes dieser gaschromatographisch bislang nicht zu trennenden Sterole stellt einen Indikator für eine Inhibierung an einem anderen Enzym der Ergosterolbiosynthese dar.

Im Bereich der HPLC-DAD-Analytik wurde eine auf isokratischer Trennung an einer RP-Phase basierende Methode weiterentwickelt und auf bei der Strukturaufklärung hilfreiche Erkenntnisse eingegangen.

Wichtigster Stützpfiler bei der Strukturaufklärung von Sterolen war in dieser Arbeit die EI-MS nach gaschromatographischer Trennung. Die Interpretation von EI-Massenspektren freier Sterole wird deshalb in der Arbeit eingehend behandelt. Dabei konnten literaturbekannte typische Fragmente von  $\Delta^{5,7}$ - und  $\Delta^{5,8}$ -Sterolen erstmals auch als typisch für  $\Delta^{8,14}$ -Sterole beschrieben werden. Ebenfalls nicht in der Literatur erwähnt ist die Beobachtung, daß sich an C-24 methylierte Sterole von entsprechend unsubstituierten Sterolen leicht unterscheiden lassen, indem man das Verhältnis der Intensitäten von m/z 55 und 69 vergleicht. Weiterhin wurde auf den Einfluß der Struktur auf die Retentionszeit bei gaschromatographischer Trennung eingegangen.

Der zweite Teil dieser Arbeit (Kapitel 4) beschreibt die Entwicklung eines Testsystems zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren.

In einer allgemeinen Betrachtung zum entwickelten Testsystem wird neben dem bereits erwähnten zugrunde liegenden Prinzip zunächst ein Verfahren vorgestellt, welches in der Argochemie zur Charakterisierung neuer Fungizide durchgeführt wird und dieser Arbeit als Rohvorlage zur Verfügung stand. Dabei wurde ersichtlich, daß im bisherigen Verfahren vor allem im Hinblick auf die methodische Vorgehensweise und den erforderlichen Zeitbedarf ausreichend Potential für sinnvolle Weiterentwicklungen bestand.

Bei den Ausführungen zu den Grenzen und Möglichkeiten des entwickelten Testsystems konnte festgehalten werden, daß man nun innerhalb eines Tages nach Beendigung der Inkubationsphase eine klare Aussage treffen kann, ob der untersuchte Wirkstoff in die Ergosterolbiosynthese eingreift, und wenn ja, aufgrund des analysierten Sterolmusters den (die) molekularen Angriffspunkt(e) zuordnen kann. Das neu entwickelte Extraktionsverfahren für die Sterolfraction erlaubt dabei noch eine klare Zuordnung bei einer eingesetzten Menge von ca. 20 mg an Trocken-Biomasse. Durch Zusatz von Cholesterol als internem Standard während der Probenaufarbeitung kann die Methode prinzipiell auch für eine vollquantitative Analytik eingesetzt werden. Aus technischen Gründen und im Hinblick auf die eigentliche qualitative Fragestellung nach dem Zielenzym wurde hier auf eine quantitative Analytik verzichtet.

Hauptnachteil der vorgestellten Methode ist, daß sich der Inhibitionsnachweis für einen Wirkstoff auf den Post-Squalen-Abschnitt beschränkt. Dies bedeutet, daß potentielle Zielenzyme des Prä-Squalen-Abschnittes nicht erfaßt werden können. Grund dafür ist die hohe Selektivität der Extraktionsmethode für Squalen, Sterole und weitere lipophile Neutralstoffe.

Als geeigneter Testorganismus hat sich die nicht-pathogene Hefe *Yarrowia lipolytica* bewährt, da sie innerhalb eines kurzen Zeitraumes (72 h) genügend Biomasse erzeugt und auch im Handling unkompliziert ist.

Kernstück des Testsystems ist die neu entwickelte Methode zur Isolierung der Sterolfraction aus Hefe. Diese beruht auf dem Prinzip der Festphasenextraktion (SPE) und löst damit die konventionelle Methode des „Ausschüttelns“ mit all ihren methodischen Nachteilen ab. Dabei wird im Anschluß an eine modifizierte alkalische Hydrolyse der Hefe das zentrifugierte Hydrolysat auf eine Polymerphase gegeben, wobei die Parameter so gewählt sind, daß nur die Sterolfraction an die Phase adsorbiert. Ein einmaliger Elutionsschritt mit einem kleinen Volumen an Ethylacetat desorbiert die Sterolfraction vollständig von der Phase und bewirkt eine starke Aufkonzentrierung, ohne die bei der flüssig-flüssig-Extraktion erforderlichen Maßnahmen der Trocknung über Natriumsulfat und dem Einengen des Extraktes am Rotavapor. Gleichzeitig bewirkt die SPE eine Filtration der Probe. In einem Modellexperiment konnten

für die SPE-Methode Wiederfindungsraten von > 91 % bei einem Variationskoeffizienten von 6,62 % ermittelt werden, wobei sich im Blindversuch (ohne SPE) selbst ein Variationskoeffizient von 4,94 % ergab.

In einer Beschreibung des gesamten Testablaufes werden – aufgeteilt in einen mikrobiologischen und einen analytischen Teil – die einzelnen Arbeitsschritte von der Aufzucht der Hefe bis zur chromatographischen Untersuchung des Sterolextraktes erläutert.

Schließlich wird auf die eigentliche Testphase mit den gewonnenen Erkenntnissen eingegangen.

Dabei wird zunächst das Sterolmuster von unbehandelter *Y. lipolytica* beschrieben, welches in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen Ergosterol und 24(28)-Dehydroergosterol in unterschiedlichen Mengenanteilen enthält.

Bei der Inkubation von *Y. lipolytica* mit den Squalenepoxidase-Inhibitoren Terbinafin und Naftifin konnte – trotz erstem Auftreten von akkumulierendem Squalen – bei geringen Konzentrationen eine Zunahme an gebildeter Biomasse beobachtet werden, bevor das Wachstum bei weiterer Gabe an Wirkstoff unter Akkumulation von Squalen abnahm. Dabei konnte Terbinafin als sechsmal wirksamer als Naftifin erkannt werden.

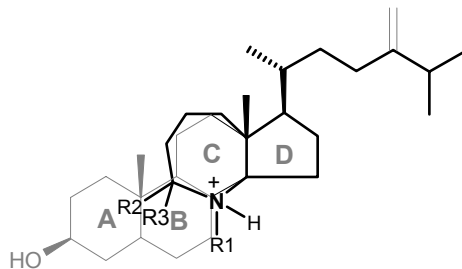
Clotrimazol, Fluconazol und Ketoconazol wurden als Referenz-Inhibitoren der Cytochrom P-450-Sterol-C-14-demethylase eingesetzt. Unter Akkumulation von Lanosterol konnte für *Y. lipolytica* eine Abnahme in der Wirksamkeit von Clotrimazol über Ketoconazol zu Fluconazol beobachtet werden.

Die Inkubation von *Y. lipolytica* mit den Morpholin-Antimykotika Amorolfin, Tridemorph, Fenpropimorph und Fenpropidin zeigte drei unterschiedliche Sterolmuster. Tridemorph konnte als ausschließlicher Inhibitor der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase charakterisiert werden. Dabei akkumulierten die Sterole Lichesterol, Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol, Fecosterol und Ergosta-8-enol. Fenpropidin erwies sich als Sterol- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor mit den Akkumulationsprodukten Ignosterol und Ergosta-8,14,24(28)-trienol. Mit Hilfe der LC-MS konnten auch Spuren von Fecosterol gefunden werden.

Amorolfin und Fenpropimorph erwiesen sich als Inhibitoren beider Enzyme. Dabei traten im Sterolmuster alle Produkte auf, die bei Tridemorph und Fenpropidin zu beobachten waren.

Zur eigentlichen Charakterisierung neuer potentieller Sterolbiosyntheseinhibitoren aus unserer Arbeitsgruppe standen im Wesentlichen zwei Substanzklassen zur Verfügung.

20 der insgesamt 32 getesteten Verbindungen lassen sich zu der Klasse der *Azasecosteroide* rechnen. Diese sollen theoretisch zu einer elektronischen und strukturellen Mimikry der Ringe C und D und der Sterolseitenkette des bei der Isomerisierung von Fecosterol zu Epi-sterol postulierten carbokationischen High-Energy-Intermediates befähigt sein.



**Abbildung 72: Mimikry des HEI der  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerisierung durch Azasecosteroide**

Mit Hilfe der entwickelten Testmethode konnte diese Vermutung voll bestätigt werden; alle untersuchten Derivate dieser Strukturklasse zeigten ein dem Tridemorph qualitativ gleiches

Sterolmuster. Damit konnte zweifelsfrei bestätigt werden, daß der molekulare Angriffspunkt die  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase der Ergosterolbiosynthese ist. Bei Betrachtung der strukturellen Unterschiede der untersuchten Derivate konnte die bereits von *Burbiel*<sup>71</sup> gemachte Vermutung weitgehend bestätigt werden, wonach eine Alkylsubstitution des Ringstickstoffes zu potentere Wirkstoffen führt.

Eine weitere, kleinere Gruppe an potentiellen Wirkstoffen gehört zu den in der Sterolseitenkette N-substituierten Azasterolen. Zwei der vier Verbindungen wiesen eine Pyridinfunktionalisierung auf und zeigten keinen Einfluß auf das Sterolmuster oder das Hefewachstum. Hingegen konnten 25-Azacholesta-7,22-enol und dessen homologe Verbindung durch Identifizierung des Akkumulationsproduktes Cholesta-5,7,24-trienol als Inhibitoren der C-24-Sterolmethyltransferase (SMT) charakterisiert werden.

Zum Abschluß wurden auch noch das Alkaloid Sampangin und einige ätherische Öle, darunter auch Teebaumöl auf eine mögliche Inhibition der Ergosterolbiosynthese hin untersucht. Trotz zu beobachtender Wachstumsreduktion bei Zugabe dieser Stoffe konnte keine Veränderung des Sterolmusters beobachtet werden. Somit handelt es sich bei diesen Verbindungen nicht um Sterol-Biosynthese-Inhibitoren. Damit konnte auch gezeigt werden, daß man mit Hilfe des entwickelten Testsystems sicher zwischen *SBI*'s und antimykotisch aktiven nicht-*SBI* unterscheiden kann.

### Resümee und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich ein für die Antimykotikaforschung wertvolles Hilfsmittel zur Überprüfung neuer Verbindungen bezüglich ihres Inhibitionsverhaltens auf die Ergosterolbiosynthese vorgestellt. Dabei wurde eine aus der Agrochemie verwendete Arbeitsvorschrift komplett überarbeitet und unter Verwendung moderner analytischer Methoden in den wesentlichen Bereichen Zeit- und Arbeitsaufwand, Probendurchsatz, Empfindlichkeit und Aussagekraft verbessert, sowie den Bedürfnissen der pharmazeutischen Forschung angepaßt.

Insbesondere durch den Einsatz der Festphasenextraktion (SPE) und der LC-MS/MS konnten sowohl die Qualität der Probenaufarbeitung als auch die Verlässlichkeit der Identifizierung neuer Sterole deutlich verbessert werden.

Mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde ein nicht-pathogener Testkeim, der sich durch schnelles Wachstum und gute Aufarbeitbarkeit auszeichnet, gewählt. In weiten Teilen stimmt das Verhalten dieser Hefe mit dem von phyto- und humanpathogenen Pilzen gezeigten Verhalten überein, so daß die gefundenen Ergebnisse zumindest qualitativ übertragbar sein sollten. Natürlich empfiehlt es sich, besonders aussichtsreiche Wirkstoffe auch an pathogenen Pilzen zu testen. Hinsichtlich der Probenaufarbeitung und der Analytik sollte die entwickelte Methode problemlos übertragbar sein.

Mit wachsender Zahl an getesteten Substanzen sollte sich zukünftig auch eine ausreichende Datenmenge für eine computerbasierte Auswertung von Struktur-Wirkungs- und Struktur-Wirkstärke-Beziehungen ansammeln, welche ihrerseits noch effizientere Synthesepanungen für die Synthese weiterer potentieller Wirkstoffe ermöglichen sollte.



## EXPERIMENTELLER TEIL

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeine Angaben

Es wurden handelsübliche Lösungsmittel für die Assays verwendet.

Bei flüssigchromatographischen Trennungen wurde gradient-grade Qualität (Merck, Acros), bei den Lösungsmitteln verwendet. Wasser für die HPLC wurde durch Destillation von demineralisiertem Wasser gewonnen.

### 6.2 Geräte und Parameter

Alle Geräte wurden im Allgemeinen mit den nachstehenden Parametern betrieben, sofern nicht anders im Text angegeben.

#### Präparative HPLC

Merck L6250 Pumpe mit präparativem Pumpenkopf

Merck L4000 UV-Detektor

Merck D2000 Integrator

Säule: Merck LiChrospher® RP-18, 250-25, 10µm

Flow: 30 ml/min 100% Methanol

#### Analytische HPLC

Merck L7455 Dioden Array Detektor

Merck L7350 Säulenofen

Merck L7250 Autosampler

Merck L7100 Gradientenpumpe

Merck D7000 Interface

Merck L7612 Solvent Degaser

Merck D7000 System Manager Software Ver.3.1.1

Säule: Maisch ReproSil ODS-3, 125-4, 3µm

Fluß: 1ml/min 2% H<sub>2</sub>O, 70% Methanol, 28% Acetonitril isokratisch

Injektionsvolumen: 10 µl

Säulenofen: 30°C

#### GC-MS (Hewlett-Packard)

Hewlett-Packard HP5972 EI-MS mit GC HP5980II, Split-/Splitless-Injektor, Constant-Flow-Control, Autosampler

ChemStation Software G1701BA Ver. B.01.00

Säule: Agilent HP5-MS, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm

Fluß: 1,4 ml/min Helium

Injektionsvolumen: 2 µl, splitless

Injektortemperatur: 250°C



Detektortemperatur: 280°C

Temperaturprogramm:

---	55°C	1 min
55°C	260°C	20°C/min
260°C	300°C	3°C/min
300°C	---	1 min

### GC-MS (Shimadzu)

Shimadzu QP5000 EI-MS mit GC GC-17A, Split-/Splitless-Injektor, Autosampler  
GCMSsolution Software

Säule: Macherey-Nagel OV-1701, 25 m, 0,25 mm, 0,25 µm

Fluß: 1,6 ml/min Helium

Injektionsvolumen: 1 µl, splitless

Injektortemperatur: 250°C

Detektortemperatur: 280°C

Temperaturprogramm:

---	60°C	1 min
60°C	260°C	20°C/min
260°C	300°C	3°C/min
300°C	---	10 min

### LC-MS

Applied Biosystems API2000 APCI-MS/MS

Agilent HP1100 HPLC-System mit quart. Pumpe, Autosampler, DAD, Säulenofen

Analyst 1.1 Software

Säule: Maisch ODS-3, 125-4, 3µm

Fluß: 1ml/min 2% H<sub>2</sub>O, 70% Methanol, 28% Acetonitril isokratisch

Injektionsvolumen: 2 µl

Säulenofen: 30°C

#### **API2000-Parameter:**

Ion Source: Heated Nebulizer (APCI)

Curtain Gas: 40 ml/min

Nebulizer Current: 1.0 µA

Temperature: 500°C

Ion Source Gas 1: 60 ml/min

Ion Source Gas 2: 15 ml/min

Declustering Potential: 23.0 V

Focussing Potential: 375.0 V

Entrance Potential: -10 V

Ion Energy 1: 0.8 eV

Deflector: -200 V  
CEM: 2300 V

### **Mikrobiologische Werkbank**

Heraeus/Kendro HS-12

### **Schüttelinkubator**

Infors AG, Modell AK-82  
240 UPM, 28°C

### **Brutschrank**

Memmert BE500  
28°C, Luftzufuhr Stufe 6

### **Zentrifuge**

Heraeus/Kendro Megafuge 1.0  
4000 UPM, 7 min, 35°C

### **SPE-Vakuumkammer**

IST-International Sorbent Technology VacMaster 10 mit PTFE-Hahn und -Nadel

### **SPE-Kartuschen**

Merck® LiChrolut EN 200 mg, 3 ml

### **Membranfiltration**

Membranfiltrationsgerät GV-Serie von Schleicher & Schuell  
Filter: Schleicher & Schuell Membranfilter RC-L 60, 1 µm, 50 mm

### **NMR**

Kernresonanzspektrometer Jeol JNM-ECP 400 (400 MHz) und Jeol JNM-ECP 500 (500 MHz für <sup>1</sup>H-NMR bzw. 126 MHz für <sup>13</sup>C-NMR)

## 6.3 Extraktion von Sterolen aus Hefefett

### 6.3.1 Bereitung des Rohextraktes

Es wurden 8 g Hefefett in 200 ml Aceton gelöst und zunächst 1 h unter Rückfluß erwärmt. Die klare tiefbraune Lösung wurde auf zwei 120 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und für 1 h in eine kühlbare Zentrifuge bei 4000 UPM gestellt. Die Temperatur wurde im Laufe der ersten 20 min bis auf 0 °C gesenkt. Nach Beendigung waren in den Röhrchen weiße Pellets zu beobachten. Der Überstand wurde abgezogen und einrotiert, die Pellets verworfen. Der einrotierte tiefgelbe, leicht ölige Rückstand wurde dann in gerade soviel Ethanol aufgenommen, bis die Lösung klar wurde. Der so erhaltene Rohextrakt wurde der HPLC zugeführt.

### 6.3.2 Fraktionierung des Rohextraktes

Die Fraktionierung wurde in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wurde pro Lauf 1 ml ethanolscher Rohextrakt auf die HPLC-Säule aufgebracht, wobei die mobile Phase aus reinem Methanol bestand. Die Flußrate betrug 30 ml/min. In den ersten 12 min wurde nicht gesammelt, danach wurden 6 Fraktionen aufgefangen und die Prozedur wiederholt, bis der Rohextrakt aufgebraucht war.

Die Fraktionen 2, 3 und 4 wurden ein weiteres Mal über die HPLC getrennt, allerdings wurde eine mobile Phase aus Methanol und Acetonitril im Verhältnis 70:30 verwendet. Die Fraktionen wurden auf diese Weise weiter unterteilt: 2a-d, 3a-e, 4a-d.

Mit Hilfe der GC-MS wurden die Fraktionen auf Reinheit und Inhalt untersucht.

### 6.3.3 Kristallisation der Sterolfractionen

Die nach der HPLC gewonnenen Fraktionen wurden in wenig Methanol unter erwärmen und Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht und ins Eisfach gestellt. Die innerhalb zwei Tagen gebildeten Niederschläge wurden über eine Membranfiltervorrichtung abgesaugt.

## 6.4 Datenblätter identifizierter Sterole

Der nachfolgende Abschnitt listet die Substanzen auf, die

1. aus dem Hefefett isoliert und als Reinsubstanzen charakterisiert werden konnten. In diesen Fällen war u.a. eine Strukturaufklärung über  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  möglich.
2. auf Grund zu geringer Substanzmenge oder flüssigchromatographisch nicht zu realisierender Isolierung nur durch Kombination der verbleibenden analytischen Methoden und/oder Abstimmung mit Literaturdaten zugeordnet werden konnten.
3. durch freundliche Zuwendung von dritter Seite erhalten wurden und mit den zur Verfügung stehenden Methoden charakterisiert werden konnten und wichtige Beiträge zur Identifizierung anderer Sterole geleistet haben (siehe 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol).

Die nachfolgenden Verbindungen sind unter Angabe des **Trivialnamens**, der **IUPAC-Nomenklatur** und der **CAS-Registry Number** aufgeführt.

Da die von der IUPAC vorgeschlagene Numerierung der Kohlenstoffatome am Cholestan- bzw. Ergostangerüst nicht ganz einheitlich ist, wurden alle Einträge jeweils komplett durchnummeriert.

**NMR-Spektren** wurden unter Zuhilfenahme literaturbekannter Daten<sup>63</sup> ausgewertet. In vielen Fällen war die isolierte Menge zu gering, um eine Strukturaufklärung auf dieser Basis vornehmen zu können. Auf Grund vorausgegangener UV- und MS-Untersuchungen waren meistens vorhandene Strukturmerkmale bzw. das gesamte Molekül bereits bekannt und eine nur auf NMR basierende Identifizierung auch nicht erforderlich. Allerdings konnten typische Protonenshifts von Olefinen wertvolle Informationen zur Lokalisierung von isolierten Doppelbindungen liefern.

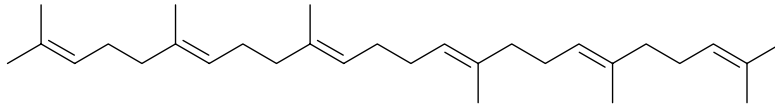
**EI-Massenspektren** wurden mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen. Die abgebildeten Spektren wurden aus der für den GC-MS generierten Spektrenbibliothek entnommen. Die aufgelisteten Massen unter Angabe ihrer relativen Intensitäten stellen eine Auswahl charakteristischer Signale dar. Die Wiedergaben des gesamten aufgenommenen Massenbereiches von 50 amu – 450 amu sind graphisch dargestellt.

Die Bestimmung der **UV-Maxima** erfolgte durch den Dioden-Array-Detektor bei einem Meßbereich von 195 nm – 400 nm.

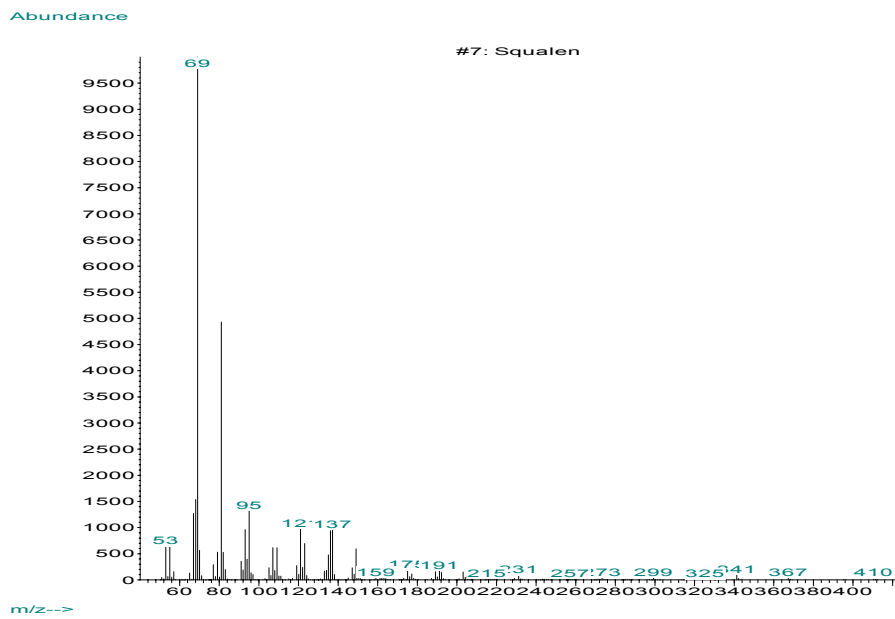
Für die genannten **Retentionszeiten**  $t_R$  für LC und GC gelten die im Abschnitt Geräteparameter genannten Bedingungen.

Die Quellenangabe (Herkunft) benennt die erstmalige Beschreibung der jeweiligen Verbindung.

An dieser Stelle sei der Firma Schering AG gedankt für die Spende von 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol, welches wertvolle Informationen für die Identifizierung weiterer Sterole ermöglichte, sowie die Spende von Lichesterol, Zymosterol und Lanosterol, die jedoch vorher schon selbst isoliert und charakterisiert werden konnten und nur der Bestätigung dienten.

(1) Squalen2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-*E*)

$C_{30}H_{50}$   
 $M_R = 410,71$   
 CAS: 7683-64-9

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 410 (0,2); 341 (1); 149 (6); 137 (10); 121 (10); 95 (13); 81 (50); 69 (100); 55 (8)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 203 nm

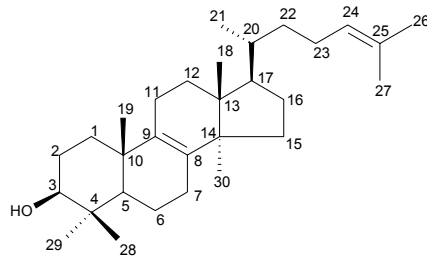
 **$t_R$ :**

LC: 19 min

GC: 15,90 min

**Herkunft:**

Hefefett Frk.5

(2) Lanosterol5 $\alpha$ -Lanosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol

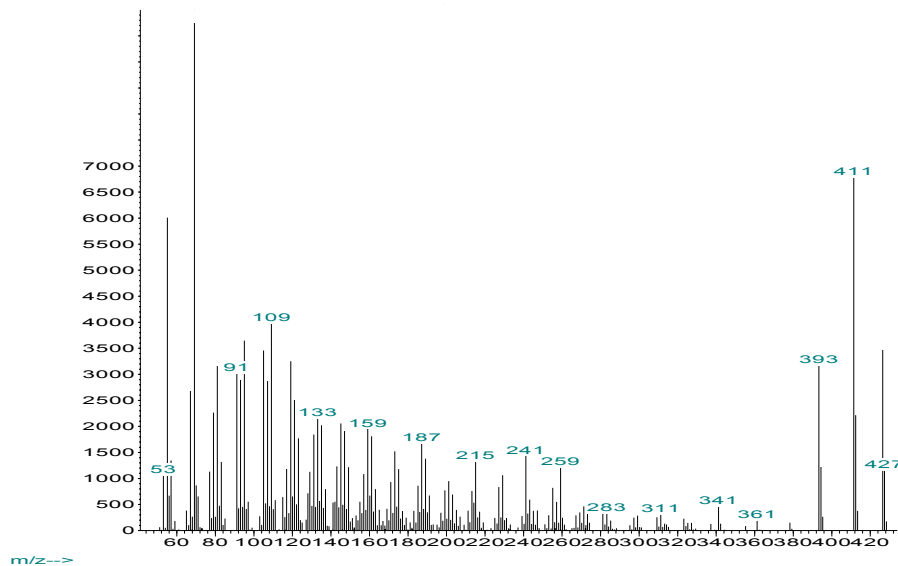
C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O  
 M<sub>R</sub> = 426,724  
 CAS: 79-63-0

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,10 (t, 1 H,  $J$  = 6,6 Hz, H-24); 3,24 (dd, 1 H,  $J$  = 4,8 Hz,  $J$  = 10,7 Hz, H-3); 0,63-2,46 (m, 48H), darunter: 1,68 (s, 3H, H-26); 1,60 (s, 3H, H-27); 1,01 (s, 3H, H-29); 0,98 (s, 3H, H-19); 0,95 (d, 3H,  $J$  = 6,3 Hz, H-21); 0,87 (s, 3H, H-30); 0,81 (s, 3H, H-28); 0,68 (s, 3H, H-18)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 134,4 (C-8 und C-9); 130,9 (C-25); 125,2 (C-24); 78,9 (C-3); 50,5 (C-5); 49,8 (C-14); 44,5 (C-13); des weiteren ohne Zuordnung: 38,9; 37,0; 36,4; 36,3; 35,6; 31,0; 30,9; 29,7; 28,2; 28,0; 27,9; 26,5; 25,7; 24,9; 24,3; 21,0; 19,1; 18,6; 18,3; 17,6; 15,8; 15,4

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 426 (35); 411 (67); 393 (32); 119 (34); 109 (40); 105 (35); 95 (36); 69 (100); 55 (60)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm

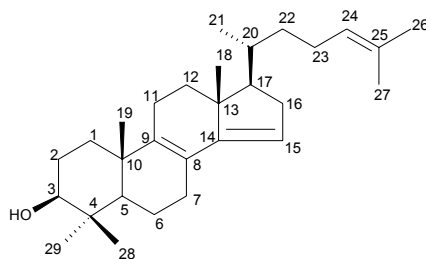
**t<sub>R</sub>:**

LC: 13,4 min

GC: 22,17 min

**Herkunft:**

Hefefett Frk. 3c

(3) 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol4,4-Dimethyl-5 $\alpha$ -cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol

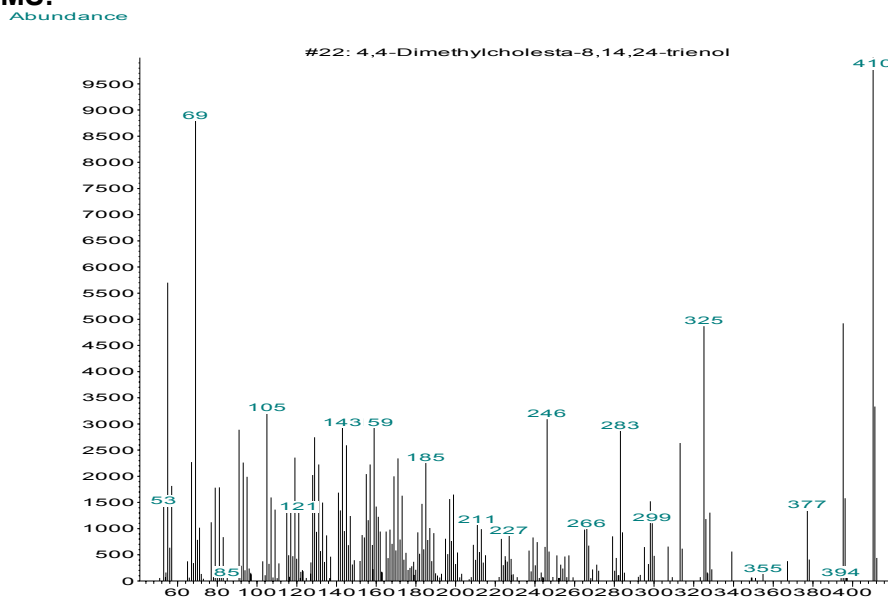
C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O  
M<sub>R</sub> = 410,682  
CAS: 64284-64-6

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm)= 5,36 (br.d, 1 H, H-15); 5,11 (t, 1 H,  $J$  = 6,6 Hz, H-24); 3,24 (dd, 1 H,  $J$  = 4,7 Hz,  $J$  = 10,7 Hz, H-3); 0,81-2,35 (m, 43H), darunter: 1,69 (s, 3H, H-26); 1,61 (s, 3H, H-27); 0,96 (s, 3H, H-19); 0,95 (s, 3H, H-29); 0,83 (s, 3H, H-18); 0,81 (s, 3H, H-28)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm)= 151,1 (C-14); 141,8 (C-9); 131,0 (C-25); 123,1 (C-8); 125,2 (C-24); 117,4 (C-15); 78,8 (C-3); 57,2 (C-17); 50,5 (C-5); des weiteren ohne Zuordnung: 45,2; 39,1; 37,8; 37,1; 36,1; 36,0; 33,9; 28,0; 27,9; 25,7; 24,7; 21,1; 21,0; 20,5; 18,8; 18,3; 17,6; 15,7; 15,4; 14,2

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 410 (100); 395 (50); 377 (14); 325 (49); 313 (27); 298 (16); 283 (29); 246 (31); 159 (29); 143 (29); 119 (24); 105 (32); 91 (29); 69 (88); 55 (57)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm, 248 nm

**t<sub>R</sub>:**

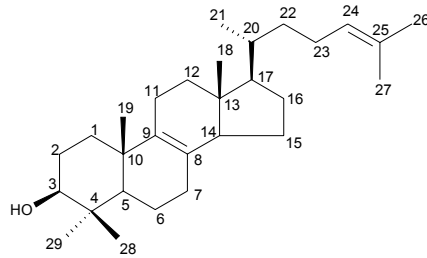
LC: 10,00 min

GC: 22,25 min

**Herkunft:**

Schering AG



(4) 4,4-Dimethylzymosterol4,4-Dimethyl-5 $\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol

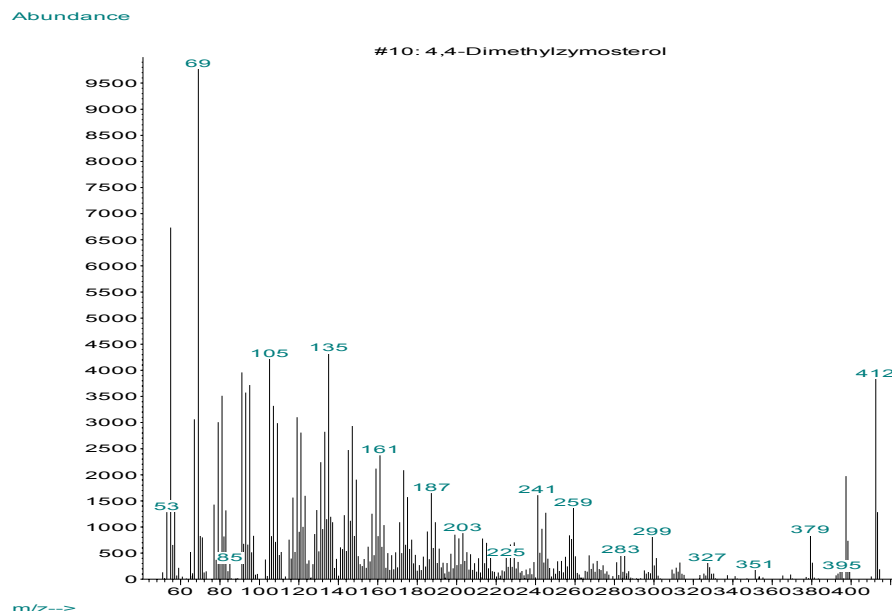
$C_{29}H_{48}O$   
 $M_R = 412,698$   
 CAS: 7448-02-4

 **$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,10 (t, 1 H,  $J = 6,6$  Hz, H-24); 3,24 (dd, 1 H,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 10,7$  Hz, H-3); 0,61-2,16 (m, 46H), darunter: 1,68 (s, 3H, H-26); 1,60 (s, 3H, H-27); 1,01 (s, 3H, H-29); 0,98 (s, 3H, H-19); 0,95 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz, H-21); 0,81 (s, 3H, H-28); 0,69 (s, 3H, H-18)

 **$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 135,0 (C-9); 130,9 (C-25); 128,0 (C-8); 125,2 (C-24); 78,9 (C-3); 54,8 (C-17); 51,9 (C-14); 50,3 (C-5); 42,2 (C-13); des weiteren ohne Zuordnung: 39,0; 37,0; 37,1; 36,1; 36,1; 35,8; 29,8; 28,8; 28,5; 28,0; 25,7; 24,8; 23,8; 22,1; 19,9; 18,7; 18,4; 17,6; 15,4; 11,3

**EI-MS:**

$m/z$  (rel. Int.): 412 (38); 397 (20); 379 (8); 327 (4); 299 (8); 259 (14); 147 (30); 135 (43); 105 (42); 91 (40); 69 (100); 55 (60)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 203 nm

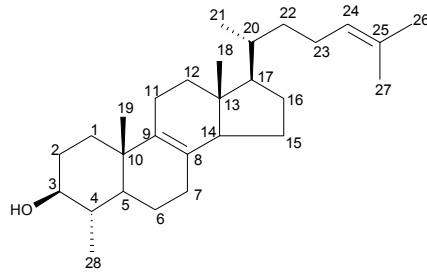
 **$t_R$ :**

LC: 11,74 min

GC: 22,45 min

**Herkunft:**

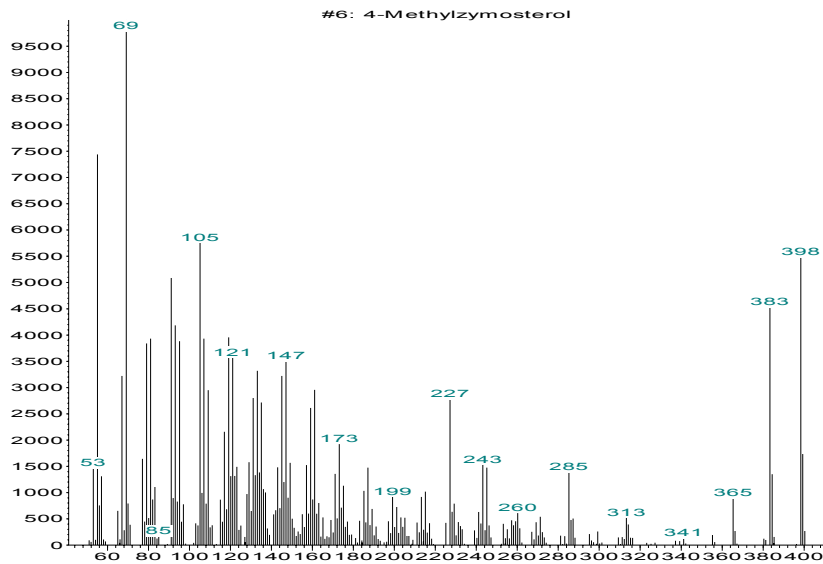
Hefefett Frk. 4a

(5) 4-Methylzymosterol4 $\alpha$ -Methyl-5 $\alpha$ -cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol

$C_{28}H_{46}O$   
 $M_R = 398,671$   
 CAS: 56297-93-9

EI-MS: (in Homologie zu 4,4-Dimethylzymosterol)

Abundance



m/z--&gt;

m/z (rel. Int.): 398 (55); 383 (45); 365 (9); 313 (5); 285 (13); 227 (28); 147 (35); 105 (57); 91 (51); 69 (100); 55 (74)

UV:

 $\lambda_{max}$ : 203 nm $t_R$ :

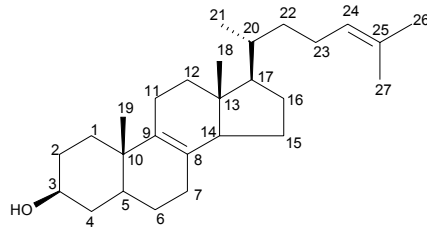
LC: 9,51 min

GC: 20,99 min

Herkunft:

Hefefett Frk. 3b

(6) Zymosterol  
5 $\alpha$ -Cholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol



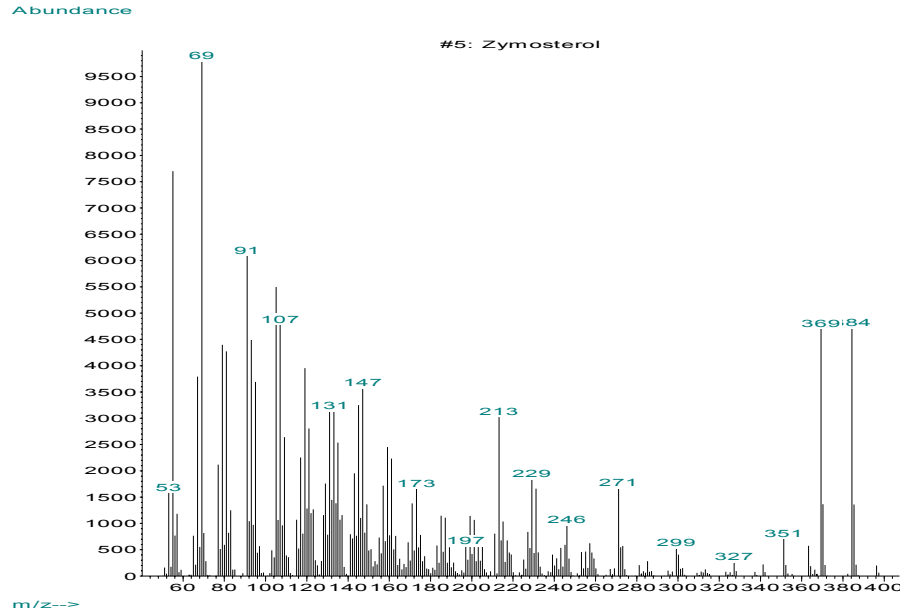
$C_{27}H_{44}O$   
 $M_R = 384,338$   
CAS: 128-33-6

 **$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,09 (t, 1 H,  $J = 6,6$  Hz, H-24); 3,61 (m, 1 H, H-3); 0,60-1,97 (m, 42 H),  
darunter: 1,68 (s, 3H, H-26); 1,60 (s, 3H, H-27); 0,95 (s, 3H, H-19); 0,95 (d, 3H,  $J = 6,3$   
Hz, H-21); 0,61 (s, 3H, H-18)

 **$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 135,01 (C-9); 130,91 (C-25); 128,28 (C-8); 125,21 (C-24); 71,23 (C-3); 54,81  
(C-17); 51,92 (C-14); 42,16 (C-13); des weiteren ohne Zuordnung: 40,8; 38,9; 36,1; 35,7;  
35,2; 31,7; 29,7; 28,8; 27,2; 25,7; 25,5; 24,8; 23,8; 22,8; 18,7; 17,8; 17,6; 11,2

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 384 (47); 369 (47); 351 (7); 299 (6); 271 (17); 231 (17); 229 (19); 213  
(30); 147 (36); 119 (40); 105 (55); 91 (61); 69 (100); 55 (76)

**UV:**

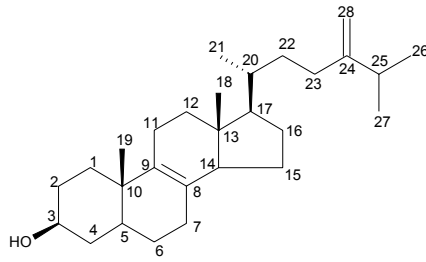
$\lambda_{max}$ : 203 nm

 **$t_R$ :**

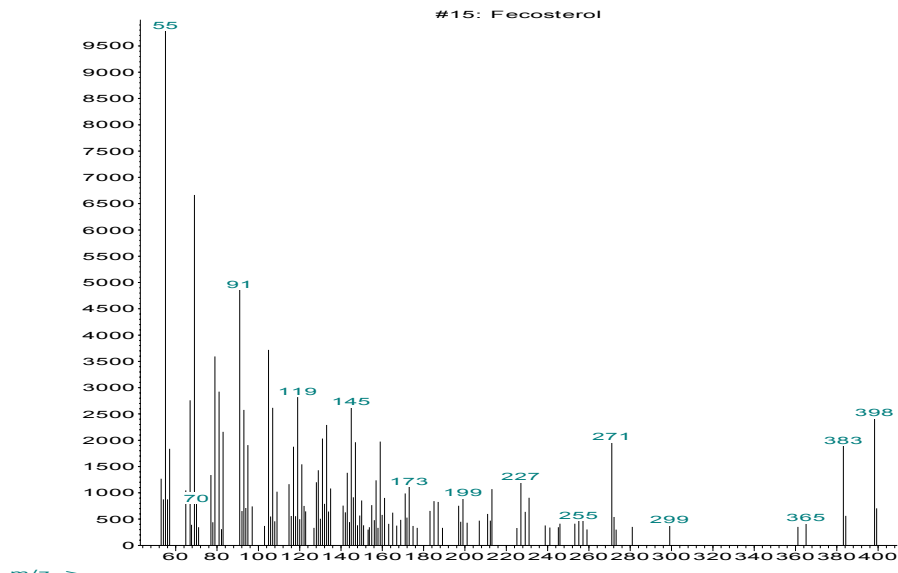
LC: 9,10 min  
GC: 20,21 min

**Herkunft:**

Hefefett Frk. 2b

(7) Fecosterol5 $\alpha$ -Ergosta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol

$C_{28}H_{46}O$   
 $M_R = 398,671$   
 CAS: 516-86-9

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 398 (24); 383 (19); 365 (4); 299 (6); 271 (20); 227 (12); 213 (11); 145 (26); 133 (23); 105 (37); 91 (49); 69 (67); 55 (100)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 203 nm

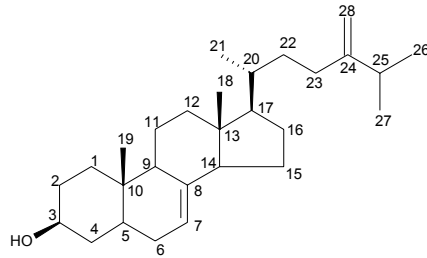
 **$t_R$ :**

LC: 11,64 min

GC: 20,90 min

**Herkunft:**

*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit Amorphin (Ansatz 122)

(8) Episterol5 $\alpha$ -Ergosta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol

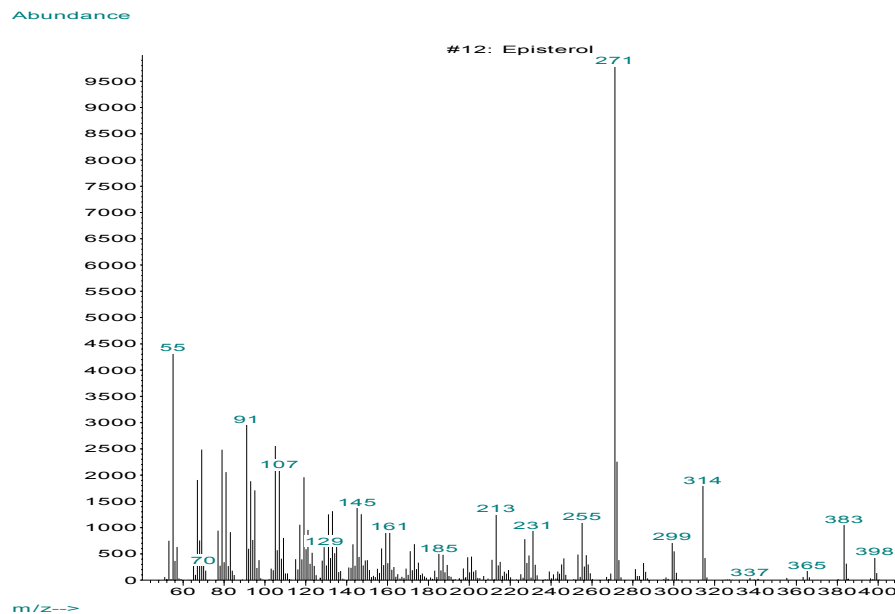
C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O  
M<sub>R</sub> = 398,671  
CAS: 474-68-0

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,15 (dd, 1 H,  $J = 2,7$  Hz,  $J = 4,7$  Hz, H-7); 4,72 (s, 1 H, H-28); 4,66 (s, 1 H, H'-28); 3,60 (m, 1 H, H-3); 2,23 (sept, 1 H,  $J = 6,8$  Hz, H-25); 0,54-2,20 (m, 41H), darunter: 1,03 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz; H-27); 1,02 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-26); 0,94 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz, H-21); 0,80 (s, 3H, H-19); 0,54 (s, 3H, H-18)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 156,9 (C-24) 139,5 (C-8); 117,5 (C-7); 105,9 (C-28); 71,1 (C-3); 56,0 (C-17); 55,0 (C-14); des weiteren ohne Zuordnung: 49,4; 43,4; 40,2; 39,6; 38,0; 37,1; 36,2; 34,6; 34,2; 33,8; 31,5; 31,1; 29,6; 27,9; 22,9; 22,0; 21,9; 21,5; 18,8; 13,04; 11,8

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 398 (4); 383 (11); 365 (2); 314 (17) 299 (7); 271 (100); 255 (11); 231 (9); 227 (8); 213 (13); 145 (15); 133 (15); 105 (25); 91 (30); 69 (25); 55 (44)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm

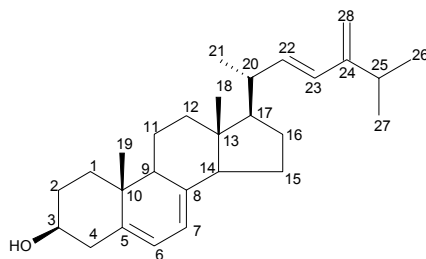
**t<sub>R</sub>:**

LC: 8,59 min

GC: 21,45 min

**Herkunft:**

Hefefett Frk. 2c

(9) 24(28)-Dehydroergosterol(22E)-Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol $C_{28}H_{42}O$  $M_R = 394,639$ 

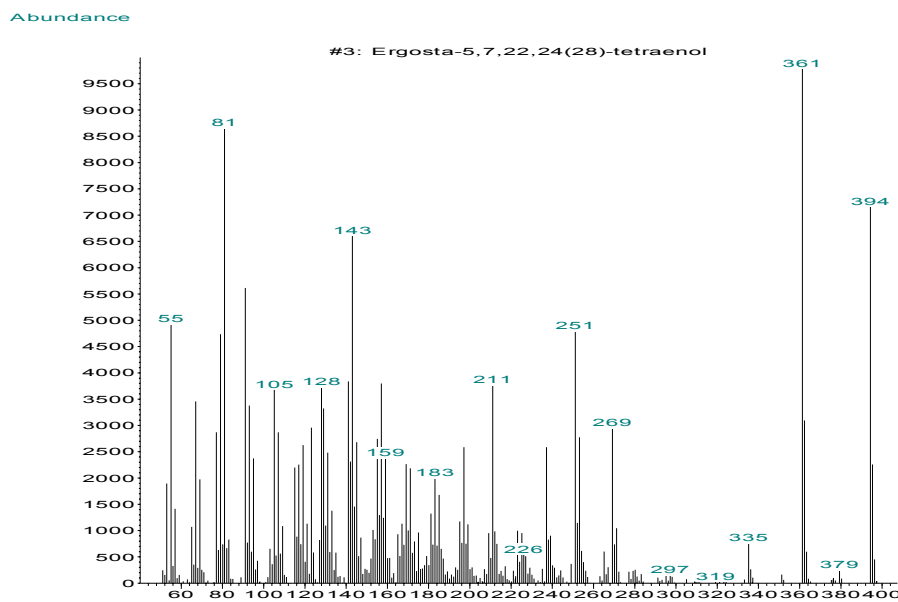
CAS: 29560-24-5

 **$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,97 (d, 1 H,  $J = 15,6$  Hz, H-23); 5,62 (d, 1 H,  $J = 15,6$  Hz, H-22); 5,57 (m, 1 H, H-6); 5,38 (m, 1 H, H-7); 4,86 (s, 1 H, H-28); 4,83 (s, 1 H, H'-28); 3,64 (m, 1 H, H-3); 2,58 (sept, 1 H,  $J = 6,8$  Hz, H-25); 0,65-2,60 (m, 35 H), darunter: 1,08 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz; H-27); 1,06 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-26); 0,94 (s, 3H, H-19); 0,65 (s, 3H, H-18)

 **$^{13}C$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 153,0 (C-24); 141,2 (C-8); 139,8 (C-5); 135,7 (C-22); 129,3 (C-23); 119,6 (C-6); 116,4 (C-7); 109,7 (C-28); 70,3 (C-3); 55,7 (C-17); 54,5 (C-14); 46,2 (C-9); des weiteren ohne Zuordnung: 43,0; 40,8; 40,6; 39,1; 38,4; 37,0; 31,9; 28,2; 23,0; 22,7; 22,4; 21,1; 20,7; 16,3; 14,1; 12,1

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 394 (71); 379 (3); 361 (100); 335 (8); 269 (30); 253 (28); 237 (36); 211 (38); 157 (38); 143 (66); 128 (37); 123 (30); 105 (36); 91 (56); 81 (86); 67 (35); 55 (50)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 232 nm, 262 nm (sh), 271 nm, 281 nm, 292 nm (sh)

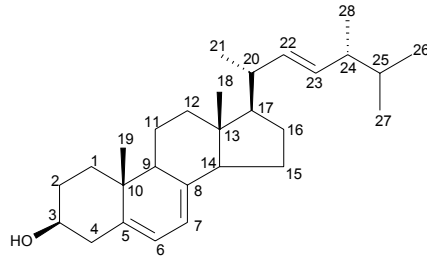
 **$t_R$ :**

LC: 7,02 min  
GC: 20,85 min

**Herkunft:**

*Yarrowia lipolytica* Stammkultur

(10) Ergosterol  
(22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol



$C_{28}H_{46}O$   
 $M_R = 396,655$   
CAS: 57-87-4

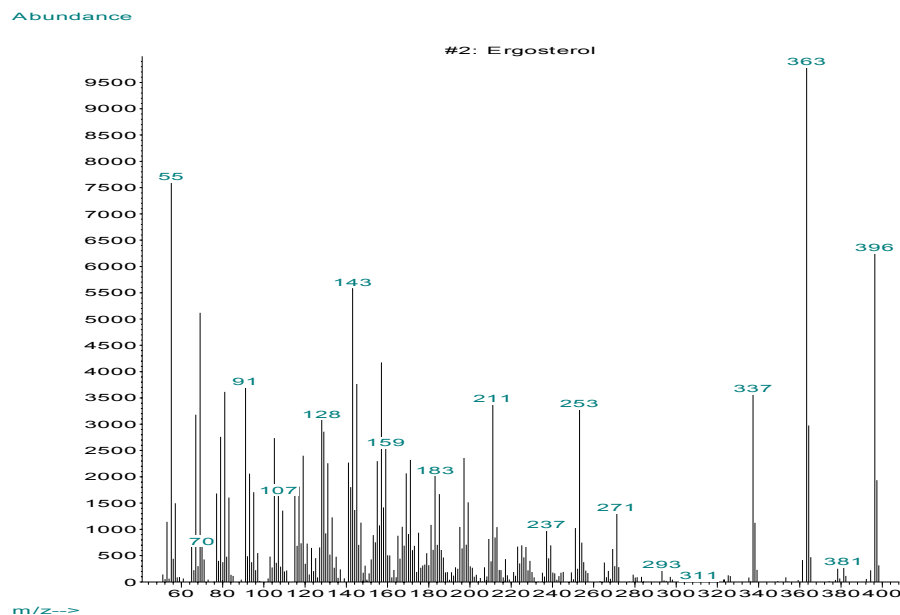
**$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):**

$\delta$  (ppm)= 5,572 (m, 1 H, H-6); 5,383 (m, 1 H, H-7); 5,228 (dd, 1 H,  $J = 7,4$  Hz,  $J = 15,2$  Hz, H-23); 5,196 (dd, 1 H,  $J = 6,9$  Hz,  $J = 15,2$  Hz, H-22); 3,64 (m, 1 H, H-3); 0,632-2,456 (m, 41H), darunter: 1,03 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz, H-21); 0,94 (s, 3H, H-19); 0,91 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz; H-28); 0,84 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz; H-27); 0,82 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-26); 0,63 (s, 3H, H-18)

**$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ):**

$\delta$  (ppm)= 141,3 (C-8); 139,7 (C-5); 135,5 (C-22); 131,9 (C-23); 119,6 (C-6); 116,2 (C-7); 70,3 (C-3); 55,7 (C-17); 54,5 (C-14); 46,2 (C-9); 42,8 (C-24), des weiteren ohne Zuordnung: 40,7; 40,4; 39,1; 38,4; 37,0; 33,0; 31,9; 28,2; 23,0; 21,1; 21,1; 19,9; 19,6; 17,6; 16,3; 12,0

**EI-MS:**



$m/z$  (rel. Int. >30): 396 (62); 363 (100); 337 (36); 271 (12); 253 (33); 211 (34); 157 (42); 145 (38); 143 (56); 128 (32); 91 (37); 81 (36); 69 (52); 55 (76)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 203 nm; 262 nm (sh); 271 nm; 281 nm; 292 nm(sh)

**$t_R$ :**

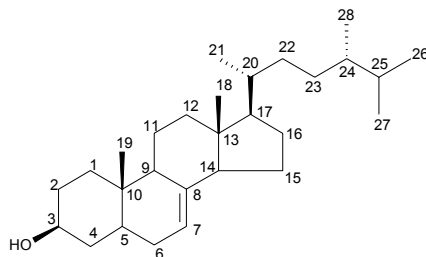
LC: 11,70 min

GC: 20,45 min

**Herkunft:**

Hefefett Frakt. 2c

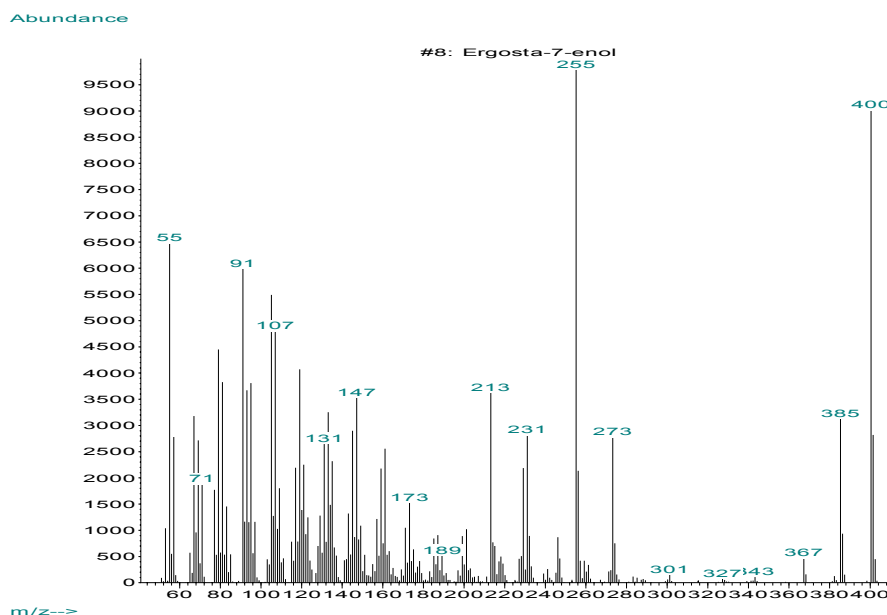


(11) Fungisterol5 $\alpha$ -Ergosta-7-en-3 $\beta$ -ol

C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O  
M<sub>R</sub> = 400,687  
CAS: 516-78-9

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,15 (m, 1 H, H-7); 3,60 (m, 1 H, H-3); 0,52-2,02 (m, 46H), darunter: 0,92 (d, 3H,  $J$  = 6,5 Hz, H-21); 0,85 (d, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, H-26); 0,78 (s, 3H, H-19); 0,77 (d, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, H-27); 0,76 (d, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, H-28); 0,52 (s, 3H, H-18)

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 400 (90); 385 (31); 367 (5); 273 (28); 255 (100); 231 (28); 213 (37); 147 (36); 133 (33); 119 (40); 105 (55); 91 (60); 67 (32); 55 (65)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm

**t<sub>R</sub>:**

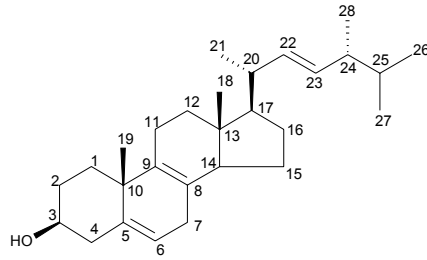
LC: 13,32 min

GC: 22,45 min

**Herkunft:**

Hefefett Frk. 4b

(12) Lichesterol  
(22E)-Ergosta-5,8,22-trien-3 $\beta$ -ol



C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O  
M<sub>R</sub> = 396,655  
CAS: 50657-31-3

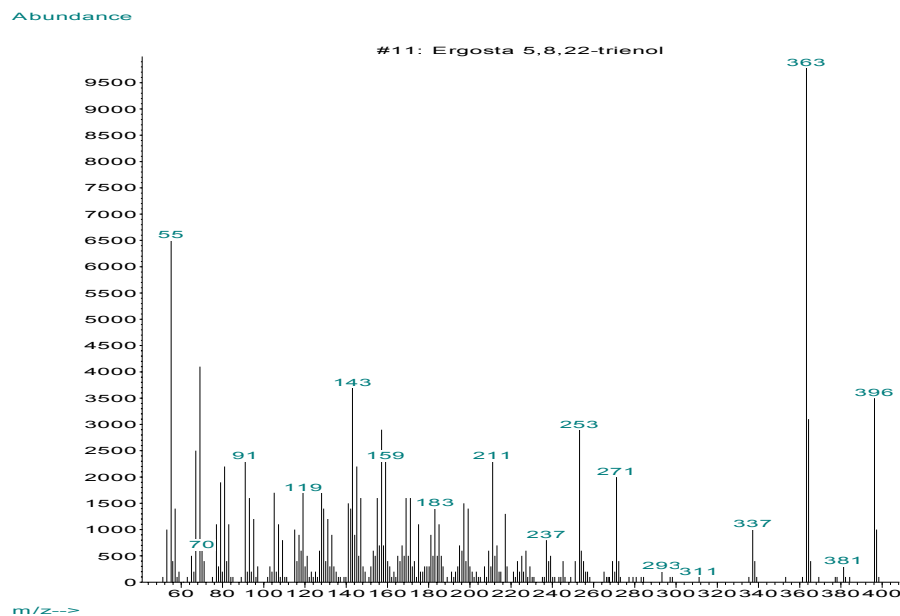
**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,43 (br.d, 1 H, H-6); 5,22 (dd, 1 H,  $J = 7,4$  Hz,  $J = 15,2$  Hz, H-23); 5,19 (dd, 1 H,  $J = 6,9$  Hz,  $J = 15,2$  Hz, H-22); 3,64 (m, 1 H, H-3); 0,65-2,53 (m, 40H) darunter: 2,54 (br.d, 1 H; H-7); 1,20 (s, 3H, H-19); 1,03 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz, H-21); 0,90 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-28); 0,84 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-26); 0,83 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-27); 0,66 (s, 3H, H-18)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 138,8 (C-5); 135,7 (C-22); 132,0 (C-9); 131,9 (C-23); 126,5 (C-8); 119,6 (C-6); 71,4 (C-3); 54,8 (C-17); 51,9 (C-14); 42,8 (C-24), des weiteren ohne Zuordnung: 42,2; 41,9; 40,7; 40,4; 37,4; 36,7; 35,6; 33,0; 31,9; 29,0; 23,0; 21,0; 19,9; 19,6; 17,6; 11,5

**EI-MS:**



m/z (rel. Int.): 396 (36); 363 (100); 337 (10); 271 (20); 253 (29); 217 (13); 211 (23); 157 (28); 145 (22); 143 (33); 128 (18); 91 (22); 81 (22); 69 (40); 55 (66)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm

**t<sub>R</sub>:**

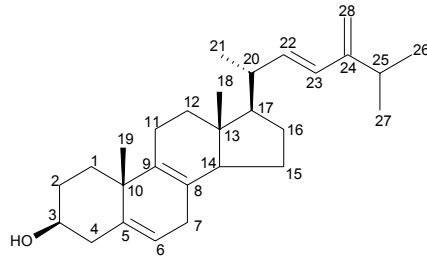
LC: 11,70 min

GC: 20,02 min

**Herkunft:**

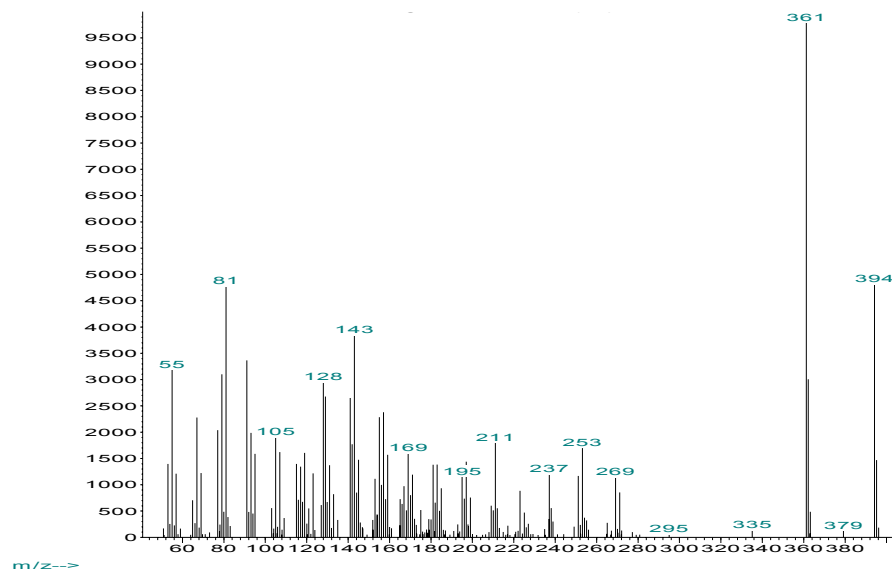
*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit Amorolfin (Ansatz 121)

(13) Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol  
 (22E)-Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraen-3 $\beta$ -ol



$C_{28}H_{42}O$   
 $M_R = 394,639$   
 CAS : 70441-42-8

**EI-MS:**



m/z (rel. Int.): 394 (48); 379 (1); 361 (100); 335 (1) 269 (11); 253 (17); 237 (12); 211 (18); 157 (24); 143 (39); 128 (30); 123 (12); 105 (19); 91 (34); 81 (48); 67 (23); 55 (32)

**UV:**

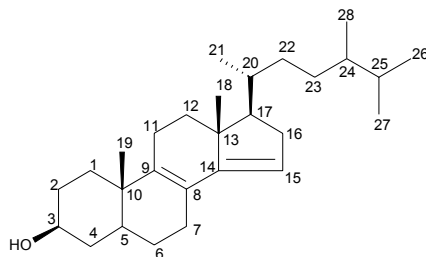
$\lambda_{max}$ : 203 nm, 232 nm

**$t_R$ :**

LC: 7,02 min  
 GC: 20,45 min

**Herkunft:**

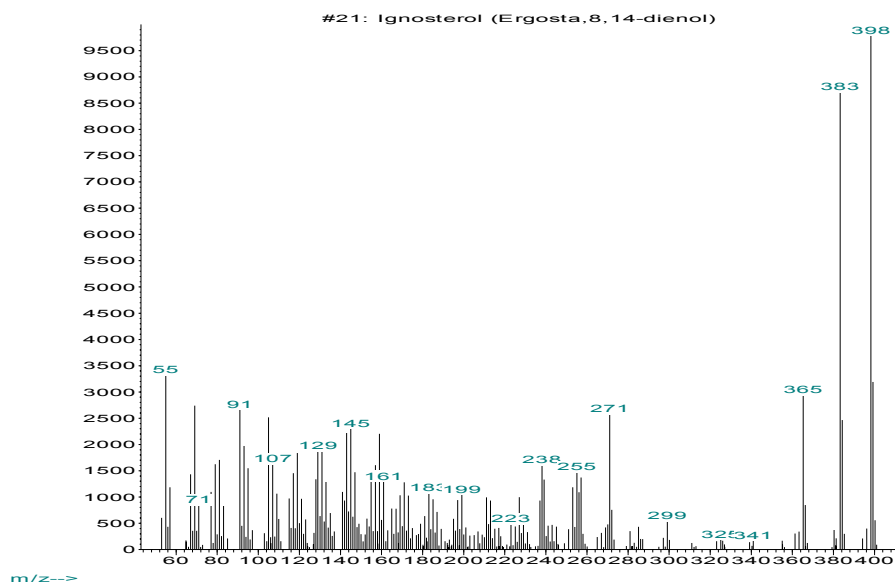
*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit Tridemorph (Ansatz 279)

(14) Igosterol5 $\alpha$ -Ergosta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol

C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O  
M<sub>R</sub> = 398,671  
CAS: 23839-47-6

## EI-MS:

Abundance



m/z (rel. Int.): 398 (100); 383 (87); 365 (29); 299 (5); 271 (26); 255 (15); 238 (16); 227 (10); 159 (22); 145 (23); 105 (25); 91 (27); 69 (28); 55 (33)

## UV:

$\lambda_{\max}$ : 248 nm

 $t_R$ :

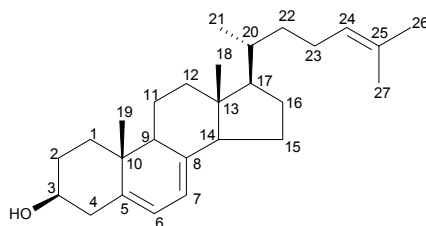
LC: 12,30 min

GC: 20,92 min

## Herkunft:

*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit Fenpropidin (Ansatz 535)

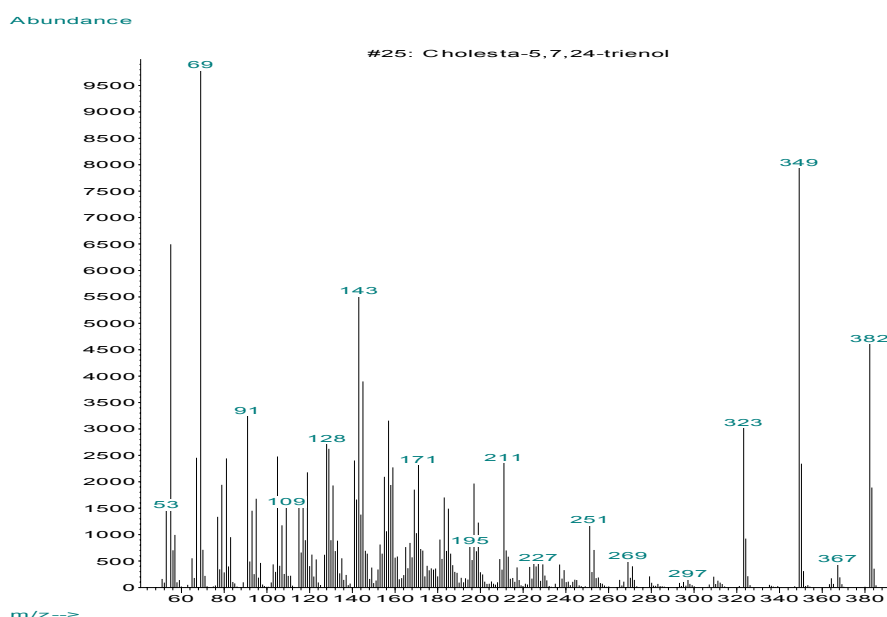
(15) Cholesta-5,7,24-trienol  
Cholesta-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol



$C_{28}H_{42}O$   
 $M_R = 382,622$   
CAS: 1715-86-2

 **$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  (ppm) = 5,57 (m, 1 H, *m*, H-6); 5,383 (m, 1 H, *m*, H-7); 5,09 (t, 1 H,  $J = 7,1$  Hz, H-24); 3,64 (m, 1 H, H-3); 0,63-2,45 (m, 38H), darunter: 1,69 (s, 3H, H-26); 1,61 (s, 3H, H-27); 1,03 (s, 3H, H-19); 0,94 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz, H-21); 0,84 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz; H-27); 0,82 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz, H-26); 0,78 (s, 3H, H-18)

**EI-MS:**

$m/z$  (rel. Int.): 382 (45); 367 (5); 349 (80); 323 (30); 269 (5); 251 (12); 211 (24); 157 (32); 143 (55); 128 (27); 91 (32); 81 (24); 69 (100); 55 (65)

**UV:**

$\lambda_{max}$ : 203 nm; 262 nm (sh); 271 nm; 281 nm; 292 nm(sh)

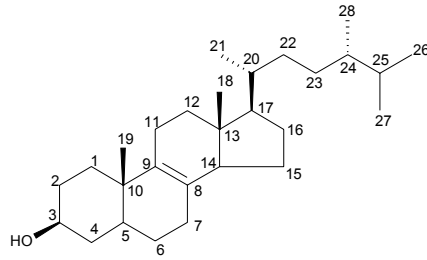
 **$t_R$ :**

LC: 8,77 min  
GC: 20,31 min

**Herkunft:**

*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit 25-Aza-Cholesta-7,22-dienol (MG-18-1H) (Ansatz 650)

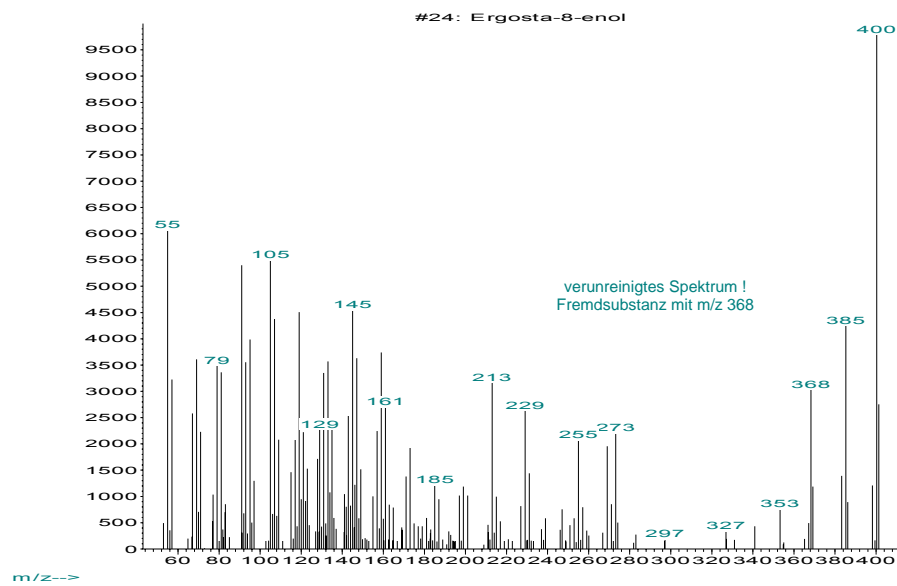
(16) Ergosta-8-enol  
5 $\alpha$ -Ergosta-8-en-3 $\beta$ -ol



C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O  
M<sub>R</sub> = 400,687  
CAS: 5259-28-9

## EI-MS:

Abundance



m/z (rel. Int.): 400 (100); 385 (43); 273 (22); 269 (20); 255 (20); 229 (26); 213 (32);  
159 (37); 145 (46); 123 (15); 119 (45); 91 (54); 79 (35); 69 (36); 55 (60)

## UV:

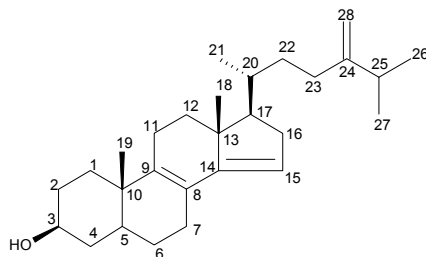
$\lambda_{\max}$ : 203 nm

 $t_R$ :

LC: 16,50 min  
GC: 21,0 min

## Herkunft:

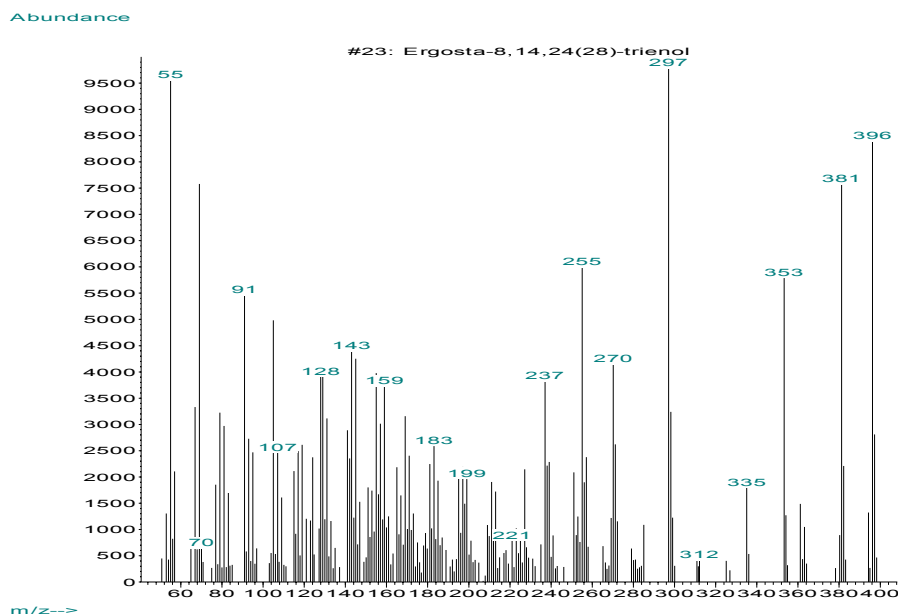
*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit  
Amorolfin (Ansatz 523)

(17) Ergosta-8,14,24(28)-trienol5 $\alpha$ -Ergosta-5,8,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol

C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O  
M<sub>R</sub> = 396,655  
CAS: 70470-57-4

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** (ca. 1-2 mg)

$\delta$  (ppm) = 5,36 (br.d, 1 H, H-15); 4,73 (br.s, 1 H, H-28); 4,67 (br.s, 1 H, H-28'); 3,64 (m, 1 H, H-3); 0,82-2,36 (m, 40H)

**EI-MS:**

m/z (rel. Int.): 396 (84); 381 (76); 363 (10); 353 (58); 335 (18); 297 (100); 270 (42); 255 (60); 237 (38); 227 (21); 211 (19); 159 (37); 145 (42); 143 (44); 124 (24); 105 (50); 91 (55); 69 (76); 55 (96)

**UV:**

$\lambda_{\max}$ : 203 nm; 248 nm

**t<sub>R</sub>:**

LC: 8,60 min

GC: 20,80 min

**Herkunft:**

*Yarrowia lipolytica* nach Inkubation mit Amorolfin (Ansatz 523)

## 6.5 Testung auf SBI-Aktivität

Die folgenden Abschnitte geben Auskünfte über die Ergebnisse der Testreihen, die zugrunde liegenden Parameter, sowie über die Standard Operating Procedures (SOP's), nach welchen die Screening-Methode reproduzierbar durchgeführt werden kann.

Die getesteten Substanzen wurden in Ethanol (vergällt mit Isohexan) gelöst und der Hefe zugegeben.

Die Referenzantimykotika, die das Fundament der Testergebnisse der untersuchten Substanzen und deren Interpretation bilden, wurden freundlicherweise von den nachfolgend genannten Herstellern zur Verfügung gestellt:

Ketoconazol	JANSSEN PHARMAZEUTIKA, Beerse, Belgien
Fluconazol	PFIZER GmbH, Karlsruhe
Terbinafin-HCl	NOVARTIS Pharma GmbH, Wehr/Baden
Naftifin-HCl	Dr. Rentschler, Arzneimittel GmbH, Laupheim
Fenpropidin	NOVARTIS Crop Protection, Münchwilen, Schweiz
Fenpropimorph	BASF Agricultural Center, Limburgerhof
Tridemorph	BASF Agricultural Center, Limburgerhof
Amorolfin	Galderma Laboratorium GmbH, Freiburg

Getestete Substanzen stammen größtenteils aus dem Arbeitskreis, andere Proben sind auf den entsprechenden Datenblättern mit Herkunftsangabe versehen.

Substanzen aus dem Arbeitskreis mit dem Kürzel „JCB“ stammen von Herrn Joachim „Dscho“ Burbiel, mit dem Kürzel „MG“ von Herrn Markus Gans, mit dem Kürzel „NS“ von Frau Nouha Salman.



**6.5.1 SOP – Kultivierung des Testorganismus *Yarrowia lipolytica* in Stammkultur**

**Prinzip:** Aufrechterhaltung der vitalen Funktionen der Hefe durch regelmäßiges Überimpfen

**Geräte:** Mikrobiologische Werkbank (Laminar Flow)  
Brutschrank (Temperatur 28°C)

**Material:** Eppendorf-Pipette mit sterilen Spitzen  
Petrischale (steril)  
*Yarrowia lipolytica* Stammkultur, DSMZ Nr. 1345

**Lösungen:** *Yarrowia lipolytica* Nährmedium (nach Vorgabe der DSMZ), autoklaviert bestehend aus:

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Glucose	20,0 g
H <sub>2</sub> O dest. ad	1000,0 ml

1. Die **regelmäßige Überimpfung** in frisches Medium stellt sicher, daß sich die Hefe permanent in der log-Phase befindet und damit eine gleichbleibende Qualität für die Testung gewährleistet ist. Die Prozedur wird **einmal wöchentlich** durchgeführt.
2. 30 – 35 ml Nährmedium werden unter keimarmen Bedingungen (Laminar Flow) in eine neue Petrischale gegeben. Aus der Kultur der vorangegangenen Wochen werden 100 µl mit einer Eppendorf-Pipette überimpft und die frische Kultur bei 28°C bebrütet.
3. Eine gesunde Kultur von *Yarrowia lipolytica* bildet (in Ruhekultur) eine schwimmende, geflochten wirkende Haut, die beim Schwenken der Petrischale schnell zerbricht und flockig absinkt.

**6.5.2 SOP – Kultivierung von *Yarrowia lipolytica* unter Zusatz von Testsubstanzen**

**Prinzip:** Vorbereitung der Testsubstanzen, Präparation der Kulturschalen

**Geräte:** Mikrobiologische Werkbank (Laminar Flow)  
Brutschrank (Temperatur 28°C), bzw. Schüttelinkubator

**Material:** Eppendorf-Pipette(n)  
Kulturflaschen 100 ml mit Capsenberg-Kappen

**Lösungen:** 1. *Yarrowia lipolytica* Nährmedium (nach Vorgabe der DSMZ), autoklaviert, bestehend aus:

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Glucose	20,0 g
H <sub>2</sub> O dest. ad	1000,0 ml

2. Ethanol

3. Ethanolische Standardlösungen der zu testenden Substanzen

1. Zu testende Substanzen werden eingewogen und in Ethanol gelöst. Aus der resultierenden Stammlösung werden eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung hergestellt.
2. Für eine Testreihe werden zwei Kontrollen (ohne Wirkstoffzugabe) und zehn Ansätze mit Wirkstoffzugabe eingesetzt.
3. Die Kulturflaschen werden mit je 40 ml Nährmedium befüllt. Aus der Stammkultur in der Petrischale werden je 100 µl überimpft.
4. Um Wachstumsbeeinträchtigungen durch zuviel Ethanol zu verhindern, werden maximal 0,2% Ethanolgehalt (= 80 µl) zugelassen. Durch geeignetes Pipettieren<sup>♦</sup> aus der Stammlösung bzw. den Verdünnungen werden die Testsubstanzen ins Medium gegeben.
5. Nach der Probenaufgabe wird jeder Ansatz ad 80 µl Ethanol aufgefüllt und geschüttelt.
6. Die Ansätze und Kontrollen werden drei Tage bei 28 °C im Brutschrank bebrütet (Ruhekultur). Alternativ können sie im Schüttelinkubator bei 240 UPM und 28°C bebrütet werden (Schüttelkultur).

---

<sup>♦</sup> Beispiel siehe „Musterpipettierschema auf der nächsten Seite

**Musterpipettierschema:**

- ① Stammlösung von Testsubstanz: 20,0 mg / 10 ml Ethanol
- ② Verdünnung 1:10 von ① mit Ethanol
- ③ Verdünnung 1:100 von ① mit Ethanol

	Zugabe Testsub- stanz	Zugabe Ethanol	Konzentration im Medium (40 ml)
Kontrolle 1	---	80 µl	0 µg/ml
Kontrolle 2	---	80 µl	0 µg/ml
Ansatz 1	40 µl ③	40 µl	0,02 µg/ml
Ansatz 2	80 µl ③	---	0,04 µg/ml
Ansatz 3	20 µl ②	60 µl	0,1 µg/ml
Ansatz 4	60 µl ②	20 µl	0,3 µg/ml
Ansatz 5	10 µl ①	70 µl	0,5 µg/ml
Ansatz 6	20 µl ①	60 µl	1,0 µg/ml
Ansatz 7	30 µl ①	50 µl	1,5 µg/ml
Ansatz 8	40 µl ①	40 µl	2,0 µg/ml
Ansatz 9	60 µl ①	20 µl	3,0 µg/ml
Ansatz 10	80 µl ①	---	4,0 µg/ml

### 6.5.3 SOP – Gewinnung der Trockenbiomasse aus der Flüssigkultur und Bestimmung von $EC_{50}$

**Prinzip:** Gewinnung der Hefebiomasse nach Filtration, Bestimmung der Trockenmasse und graphische Ermittlung von  $EC_{50}$  aus dem Dosis -Wachstum -Diagramm unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel®.

**Geräte:** Vakuumfiltrationsvorrichtung (Schleicher&Schuell GV 050/3) mit Vakuumpumpe  
Trockenschrank (Temperatur 90°C)  
Analysenwaage

**Material:** Membranfilter (Schleicher&Schuell RC-L 60, Porenweite 1  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  50 mm)  
Pinzette  
Becherglas  
Pasteurpipette

**Chemikalien:** H<sub>2</sub>O dest.

1. Die Membranfilter werden exakt gewogen.
2. Die Flüssigkultur wird an der Filtrationsapparatur mit dem vorgewogenen Filter abgesaugt. Die Kulturflasche und der Trichter werden mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird verworfen.
3. Der feuchte Filter mit dem Hefekuchen wird 90 min in den Trockenschrank bei 90°C gestellt.
4. Der getrocknete Hefekuchen wird gegen das Leergewicht ausgewogen und gegebenenfalls für die spätere Hydrolyse aufbewahrt.
5. Die gesammelten Auswaagen werden im Tabellenkalkulationsprogramm gegen ihre jeweils zugrunde liegende Dosis aufgetragen und graphisch dargestellt. Zur Bestimmung von  $EC_{50}$  wird graphisch die Konzentration an Wirkstoff ermittelt, die eine ungefähr 50%ige Reduktion des Wachstums gegenüber der Kontrolle ohne Wirkstoff aufweist.

#### 6.5.4 SOP – Aufarbeitung der Trockenbiomasse zum Hefehydrolysat

**Prinzip:** Saure und alkalische Hydrolyse der Hefe als Vorbereitungsschritt zur Extraktion der lipophilen, unverseifbaren Anteile mit SPE

**Geräte:** Sandbad (Temperatur: 105-115°C)  
Ultra-Turrax (11.000 UPM)

**Material:** je Ansatz 1x 50 ml Rundkolben NS29  
Meßzylinder 100 ml  
Siedesteinchen  
Steigrohr NS 29, Länge ca. 100 cm  
Einwegspritze oder Pasteurpipette  
lange Pinzette

**Chemikalien:** 1. 0,1N HCl  
2. EtOH / 1N KOH (7:3)  
3. Standardlösung Cholesterol (~ 0,01% in Ethanol)

*Bei der gesamten Prozedur, muß darauf geachtet werden, daß die Proben nicht dem Tageslicht ausgesetzt sind und auch nur in **abgedunkelten Räumen** gearbeitet wird. Andernfalls muß damit gerechnet werden, daß das Ergosterol der Hefe unter Lichteinfluß zerstört wird.*

1. **Saure Hydrolyse (1. + 2.):** Der trockene (evtl. gewogene) Cellulosefilter mit der Hefebiomasse wird in einen Rundkolben gegeben, der zudem 1 ml Cholesterol-Standardlösung und 10 ml 0,1N HCl- Lösung, sowie ein Siedesteinchen enthält.
2. Mit aufgesetztem Steigrohr wird 30 min auf dem Sandbad erhitzt.
3. **Homogenisierung + alkalische Hydrolyse (3. – 6.):** Pro Ansatz werden 40 ml ethanolische KOH im Meßzylinder bereitgestellt. Sie werden nach eigenem Ermessen zur Ausführung der Schritte 4. und 5. eingeteilt und aufgebraucht.
4. Der Kolben wird vom Sandbad genommen, das Steigrohr entfernt. Es wird ein Teil ethanolische KOH zugegeben und der Hefekuchen vom Filter abgeschwemmt. Mit der Pinzette wird der Filter herausgenommen, darauf anhaftende Hefereste werden mit ethanolischer KOH zurück in den Kolben gespült. Der Filter wird entsorgt. Das Siedesteinchen wird ebenso entnommen, gewaschen und für Schritt 6. aufgehoben.
5. Der Inhalt des Rundkolbens wird etwa 20 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Verbleibende Reste am Scherkopf werden mit der übrigen ethanolischen KOH zurück in den Rundkolben gespült.
6. Das Siedesteinchen wird wieder in den Kolben gegeben. Das Steigrohr wird aufgesetzt und es wird weitere 60 min auf dem Sandbad rückfließend erhitzt.

### 6.5.5 SOP – Extraktion der Sterolfraction aus Hefehydrolysat

**Prinzip:** Festphasenextraktion (SPE) der lipophilen, unverseifbaren Anteile

**Geräte:** Zentrifuge ( 4000 UPM / 35°C / 7 min)  
SPE-Vakuumkammer

**Material:** SPE: MERCK® LiChrolut EN (Polymerphase) 3 ml / 200 mg  
je SPE 1x 20 ml Einwegspritze + Kanüle  
Eppendorf-Pipette (1 ml)  
100 ml Zentrifugengläser  
Reagenzgläser zum Einsatz in die Vakuumkammer

<b>Lösungen:</b> 1. MeOH	Konditionieren 1
2. H <sub>2</sub> O / EtOH = 60 / 40	Konditionieren 2
3. 1N KOH / EtOH = 90 / 10	Waschen
4. EtOAc	Elution

*Bei der gesamten Prozedur, insbesondere der SPE, muß darauf geachtet werden, daß die Proben nicht dem Tageslicht ausgesetzt sind und auch nur in **abgedunkelten Räumen** gearbeitet wird. Andernfalls muß damit gerechnet werden, daß das Ergosterol der Hefe unter Lichteinfluß zerstört wird.*

1. Das frisch bereitete Hydrolysat (ca. 51 ml) wird in ein Zentrifugenglas überführt und 7 min bei 4000 UPM zentrifugiert. Die Zentrifuge ist auf 35°C temperiert.
2. **Konditionierung:** Die SPE-Kartuschen werden zunächst mit **2 ml Lösung 1** konditioniert. Die Tropfgeschwindigkeit sollte bei 5-7 ml/min liegen. Kurz vor dem Trockenlaufen wird gestoppt und **2 ml Lösung 2** aufgegeben und bis kurz vor dem Trockenlaufen abgesaugt.
3. **Probenaufgabe:** Man entnimmt das warme Zentrifugat vorsichtig mit der Spritze und gibt die gesamte Probe nach und nach auf die SPE (5-7 ml/min). Das Zentrifugat kann bei vorsichtiger Entnahme fast vollständig entnommen und aufgetragen werden. Der Niederschlag wird verworfen.
4. **Waschen:** Kurz vor dem Trockenlaufen wird gestoppt und insgesamt **5 ml Lösung 3** aufgegeben und abgesaugt. Nach dem Trockenlaufen wird das Vakuum für etwa 20 Sekunden auf unter 500 mbar gesenkt, um letzte Tropfen abzusaugen. Anschließend wird belüftet und das bisher angefallene Eluat verworfen.
5. **Elution:** Nach Einsatz der Reagenzgläser wird mit **2 x 2 ml Lösung 4** eluiert. Vor dem Anlegen des Vakuums läßt man einen Teil des EtOAc in die Phase einziehen und etwa 1 min einwirken. Die Elution wird langsam durchgeführt. Nach erfolgter Elution wird erneut kurz ein höheres Vakuum angelegt, um die SPE vollständig trocken zu saugen.
6. Der gewonnene Sterolextrakt steht direkt zur chromatographischen Analyse zur Verfügung.

## 6.6 Datenblätter der getesteten Substanzen

Die Datenblätter enthalten zunächst neben der **Substanzbezeichnung** in Form des Trivialnamens bzw. der internen Bezeichnung und den Hinweis auf den Testorganismus. Sofern verfügbar wird zudem die Strukturformel der getesteten Substanz angegeben.

Die sich anschließende **Tabelle** bzw. das **Diagramm** geben Auskunft über die Dosis-Wachstums-Beziehung und die Konzentrationsspanne, innerhalb der eine Substanz getestet wurde. Zur besseren Orientierung wurden alle Ansätze nummeriert (*Y.I. 89, 90, 91...*). Die Reihenfolge der Testsubstanzen, bzw. Referenzantimycotika wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit umgestellt, so daß die Nummerierung nicht mehr durchgehend fortlaufend ist.

Weiterhin werden der gefundene **Inhibitionstyp** (falls positiv) und die ermittelte Halbwachstumskonzentration **EC<sub>50</sub>** angegeben.

Die Halbwachstumskonzentration EC<sub>50</sub> wurde graphisch aus den gezeigten Diagrammen ermittelt. Da sie meist nur das Ergebnis von Einzelreihen widerspiegelt ist ihr eine gewisse Fehlertoleranz nachzusehen. Im Rahmen dieser Arbeit spielt sie eine untergeordnete Rolle, denn die qualitativen Auswirkungen auf das Sterolmuster - und damit auf den Inhibitionstyp – stehen im Vordergrund dieser Untersuchungen, da diese in ihrer Kernaussage auf andere, humanpathogene Hefen übertragen werden können. Der EC<sub>50</sub>-Wert kann selbst bei Variation der Kulturbedingungen (Ruhe- oder Schüttelkultur) verschieden sein und ist damit kein verlässlicher Parameter bei der Übertragung auf einen anderen Pilzstamm. Seine Berechtigung erhält er jedoch, da er die Möglichkeit eines „Rankings“ bei Vergleichen innerhalb einer Substanzklasse zuläßt und somit erste Aussagen zu quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen erlaubt.

Der angegebene Inhibitionstyp klassifiziert die Testsubstanzen in folgende Kategorien:

- Squalenepoxidase-Inhibitor
- C-14-Demethylase-Inhibitor
- $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor
- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor
- C-24-Methyltransferase-Inhibitor
- kein SBI

Das im Anschluß abgebildete TIC (*Total Ion Count*) Chromatogramm aus dem GC-MS zeigt das **Sterolpattern** der Testsubstanz nach Inkubation mit *Yarrowia lipolytica* bei der angegebenen Konzentration. Sofern möglich wurde ein Chromatogramm nahe der EC<sub>50</sub> ausgewählt.

Da in der TIC-Ansicht coeluiierende Substanzen nicht gut zu unterscheiden sind, gibt die jeweils nebenstehende Tabelle Übersicht über die gefundenen Sterole in der Reihenfolge der Elution unter Angabe der Retentionszeit\* ( $t_R$ ). Hierbei werden folgende Sterole wie folgt abgekürzt:

Ergosterol ( <b>10</b> )	Erg-5,7,22 Ergo.
24(28)-Dehydroergosterol ( <b>9</b> )	Erg-5,7,22,24(28)
Lichosterol ( <b>12</b> )	Erg-5,8,22 Liche.
Ergosta-5,8,22,24(28)-tetraenol ( <b>13</b> )	Erg-5,8,22,24(28)
Fungisterol ( <b>11</b> )	Erg-7 Fungi.
Episterol ( <b>8</b> )	Erg-7,24(28) Epi.
Ergosta-8-enol ( <b>16</b> )	Erg-8
Igosterol ( <b>14</b> )	Erg-8,14 Igno.
Ergosta-8,14,24(28)-trienol ( <b>17</b> )	Erg-8,14,24(28)
Fecosterol ( <b>7</b> )	Erg-8,24(28) Feco.
Cholesta-5,7,24-trienol ( <b>15</b> )	Chol-5,7,24

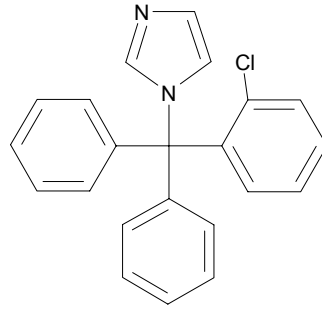
Nicht abgekürzt wurden Lanosterol (**2**) und das als interner Standard (IS) zugegebene Cholesterol, sowie Squalen (**1**).

Sofern nicht anders angegeben, wurde *Yarrowia lipolytica* in Ruhekultur inkubiert.

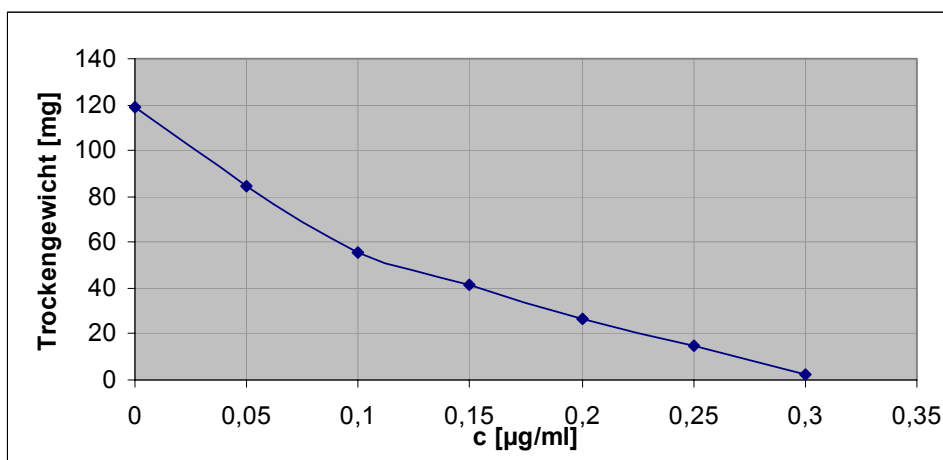
Auf das in Ruhe- oder Schüttelkultur zu beobachtende Sterolmuster, welches im Vergleich mit den nachfolgenden Inhibitionsmustern zu sehen ist, wurde in 4.5.1 eingegangen. Die entsprechenden Chromatogramme sind ebendort abgebildet.

\* Die angegebenen Retentionszeiten wurden gerundet.



(i) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Clotrimazol

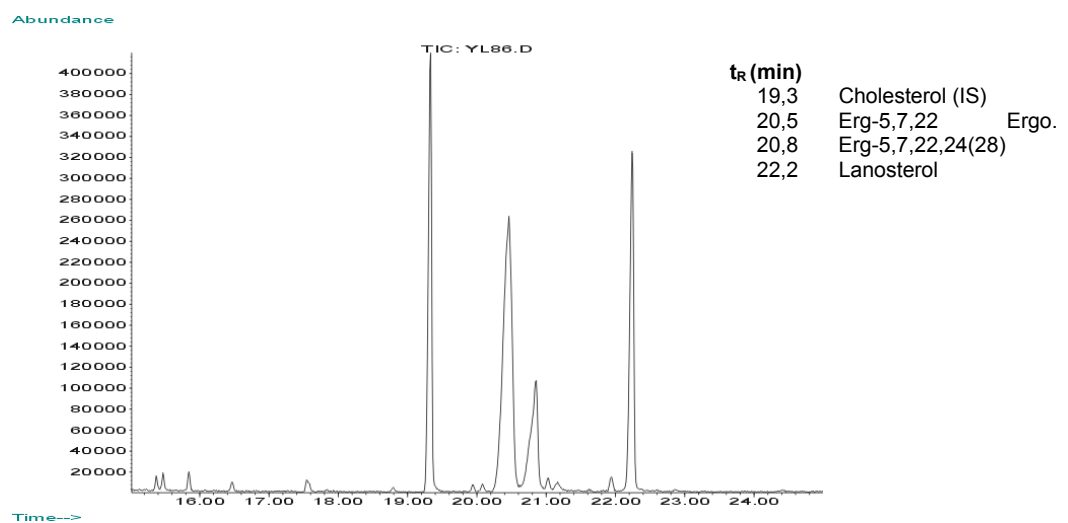
Y.I.	89	90	91	92	93	94	95
Clotrimazol [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Trockengewicht [mg]	118,9	84,7	55,4	41,8	26,8	14,9	2,5

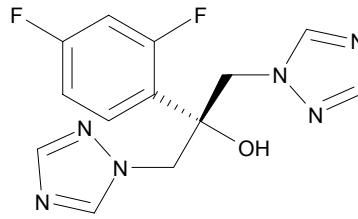


$EC_{50} \sim 0,1 \mu\text{g/ml}$

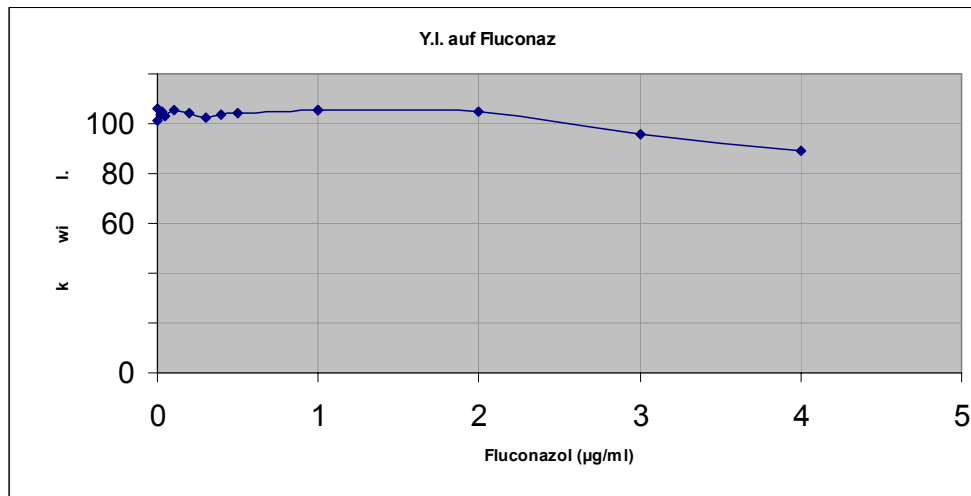
Inhibitionstyp: C-14-Demethylase-Inhibitor

Sterolpattern bei 0,1  $\mu\text{g/ml}$ :



(ii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Fluconazol

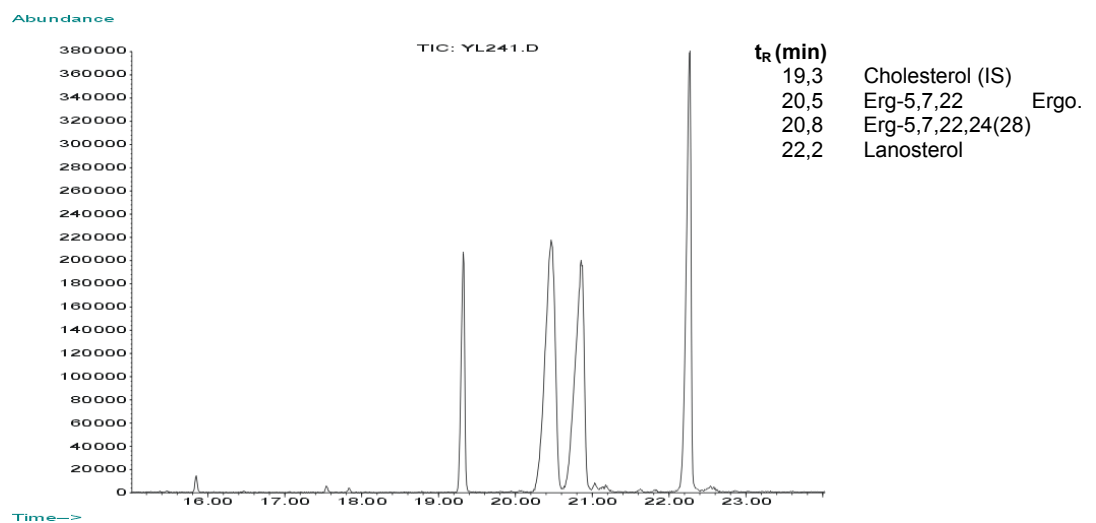
Y.I.	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
Fluconazol [ $\mu\text{g}/\text{m}$ ]												1	1	2	3	
Trockengewicht [mg]												6	105,6	104,6	95,8	88,9

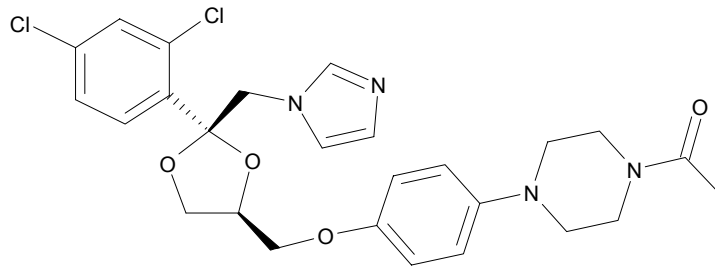


$EC_{50} \gg 4 \mu\text{g}/\text{ml}$

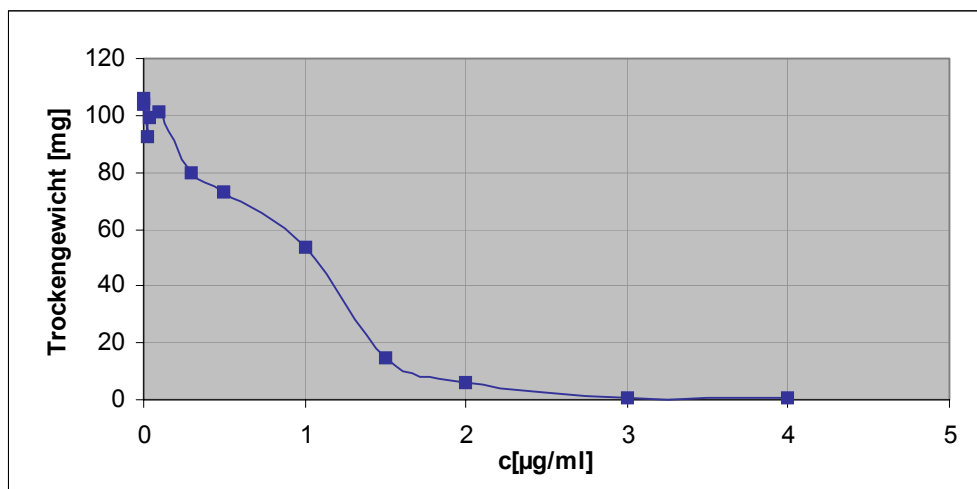
Inhibitionstyp: C-14-Demethylase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ :



(iii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Ketoconazol

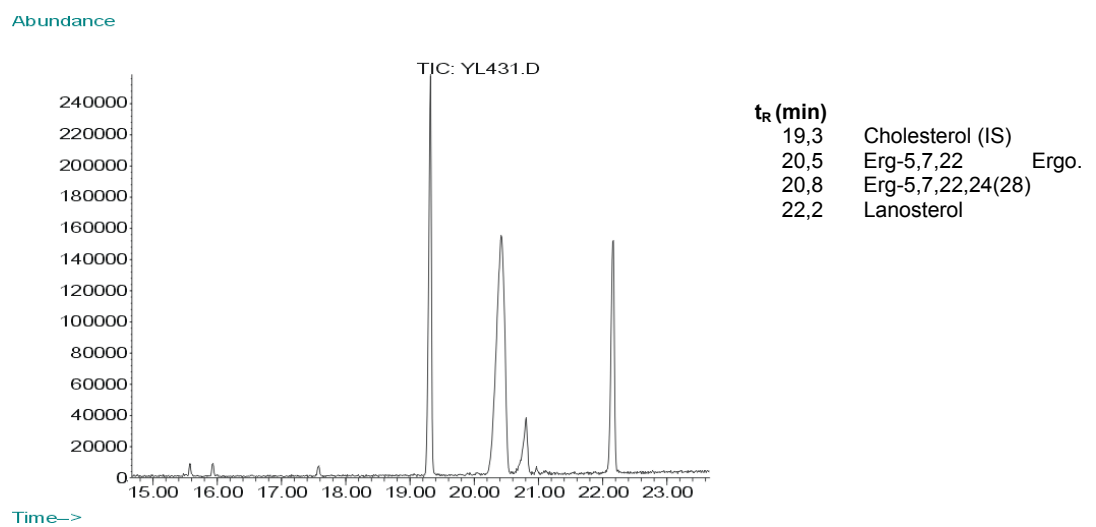
Y.I.	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
Ketoconazol [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	103,6	106,2	92,4	99,1	101,3	80	73,4	53,8	14,9	5,7	0,7	0,5

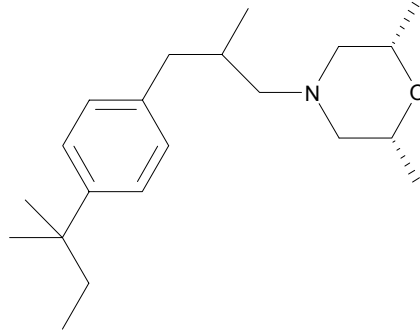


$EC_{50} \sim 1 \mu\text{g/ml}$

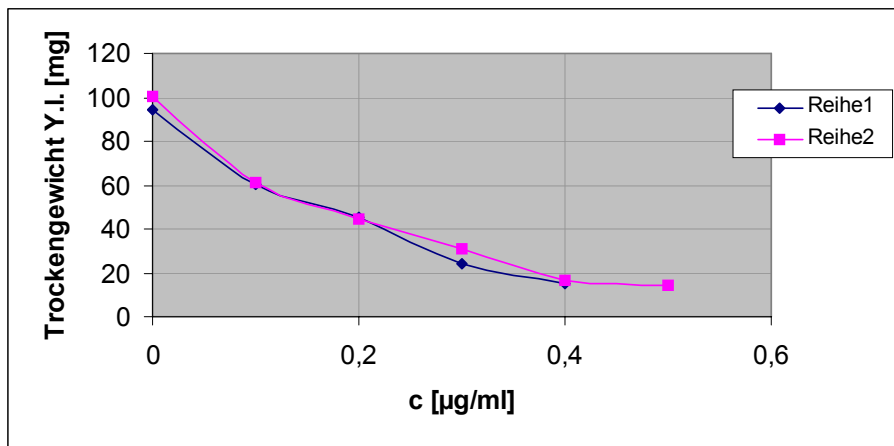
Inhibitionstyp: C-14-Demethylase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1 \mu\text{g/ml}$ :



(iv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Amorolfin

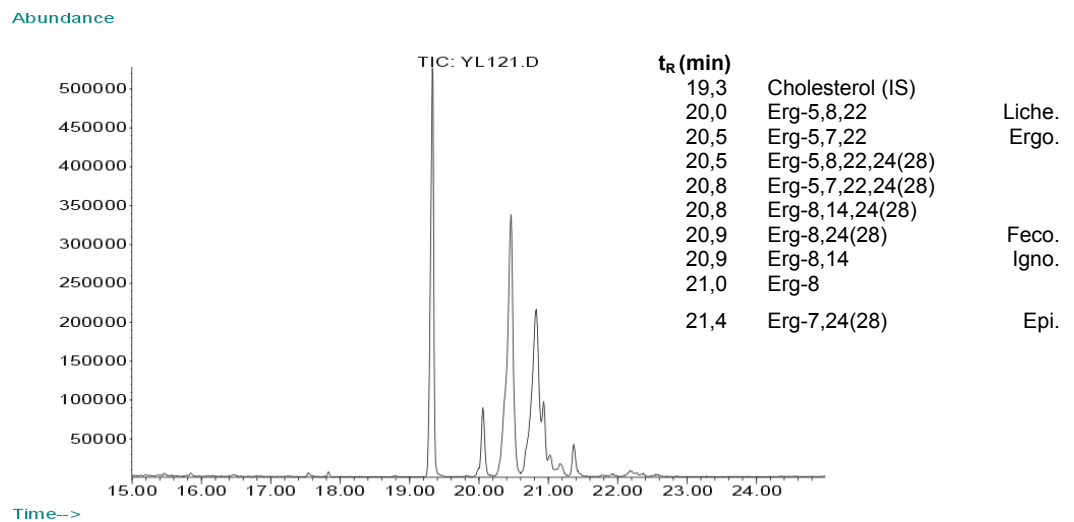
Y.I.	108/109	110/111	112/113	114/115	116/117	118
Amorolfin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Trockengewicht [mg]	94,2	60,4	45	24,3	15	
	100,3	61,4	44,6	30,6	16,3	14,1

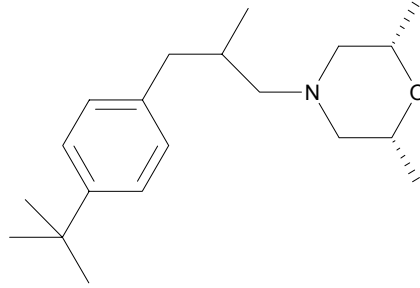


$EC_{50} \sim 0,2 \mu\text{g/ml}$

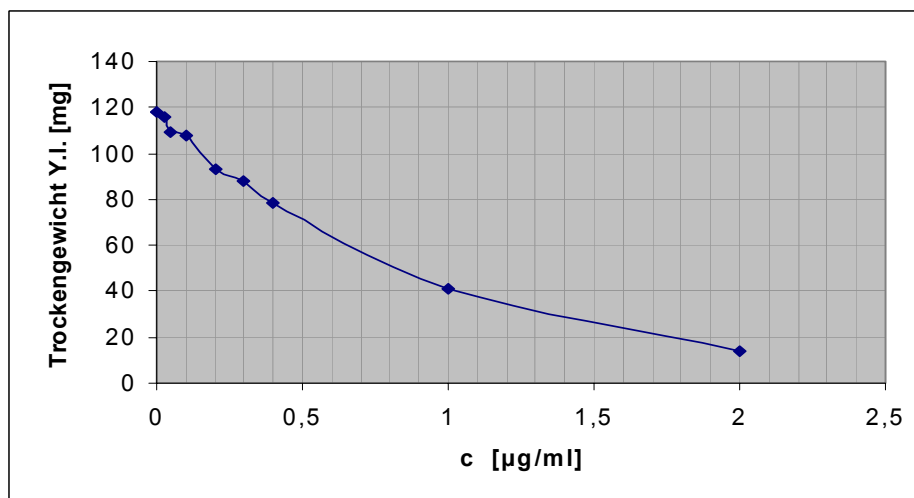
Inhibitionstyp:  $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor und  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei 0,2  $\mu\text{g/ml}$ :



(v) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Fenpropimorph

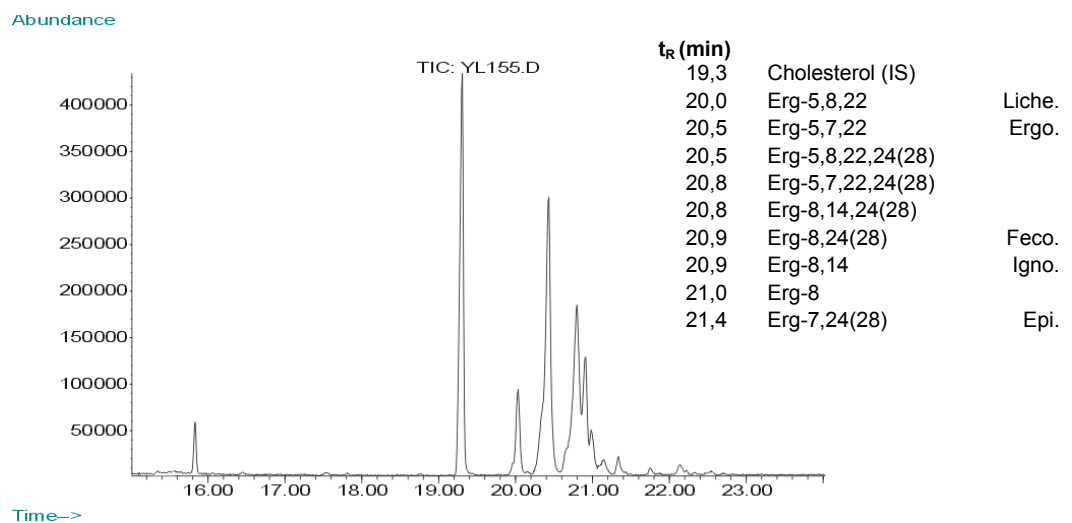
	Y.I.	137	149	150	151	152	153	154	155	156
Fenpropimorph [ $\mu\text{g/ml}$ ]		0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	1	2
Trockengewicht [mg]		118	115,8	109	107,4	93	87,7	78,7	40,8	13,6

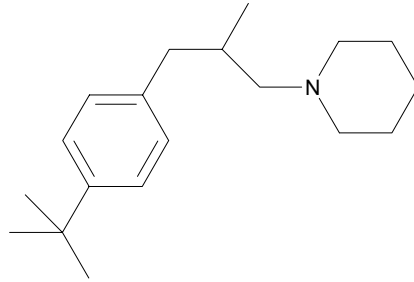


$EC_{50} \sim 0,6 \mu\text{g/ml}$

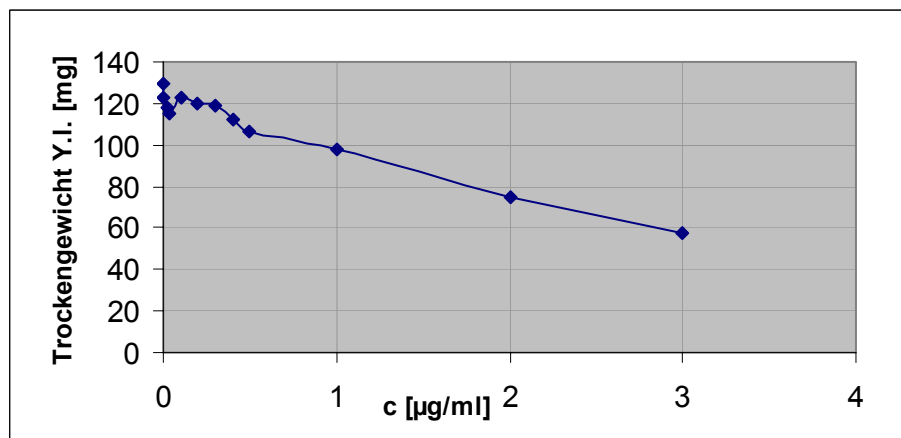
Inhibitionstyp:  $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor und  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei 1  $\mu\text{g/ml}$ :



(vi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Fenpropidin

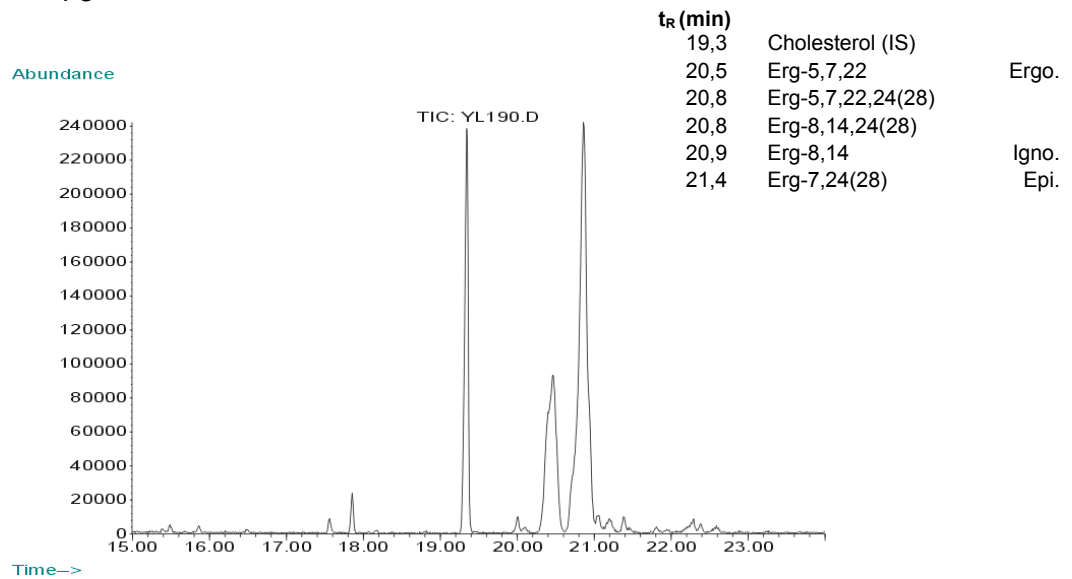
Y.I.	191	192	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
Fenpropidin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,025	0,04	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2	3
Trockengewicht [mg]	129	123	118,1	115,1	123	120,2	118,7	112,3	106	97,7	75,2	57,5



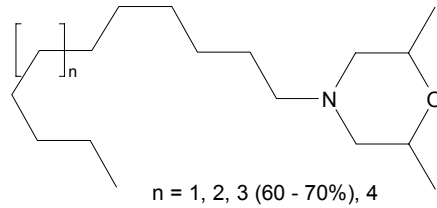
$EC_{50} \sim 3 \mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp:  $\Delta^{14}$ -Reduktase-Inhibitor, sehr eingeschränkt  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor  $\diamond$

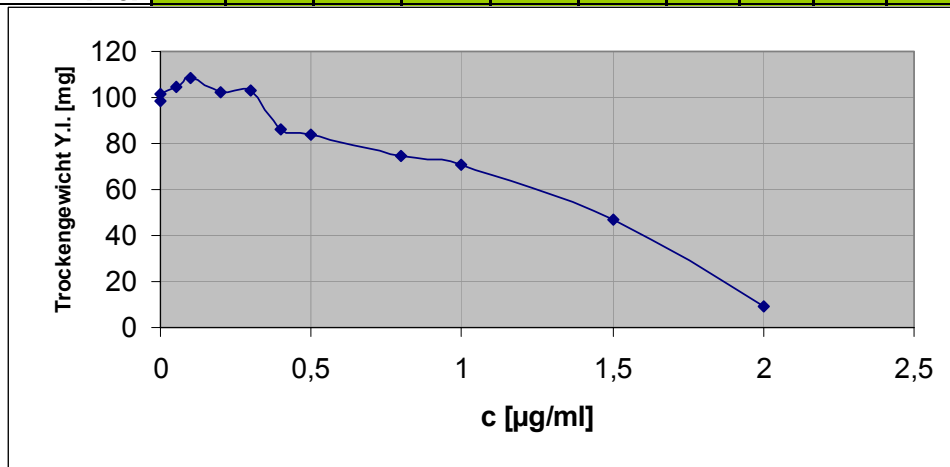
Sterolpattern bei  $3 \mu\text{g/ml}$ :



$\diamond$  Erläuterungen dazu im Allgemeinen Teil

(vii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Tridemorph

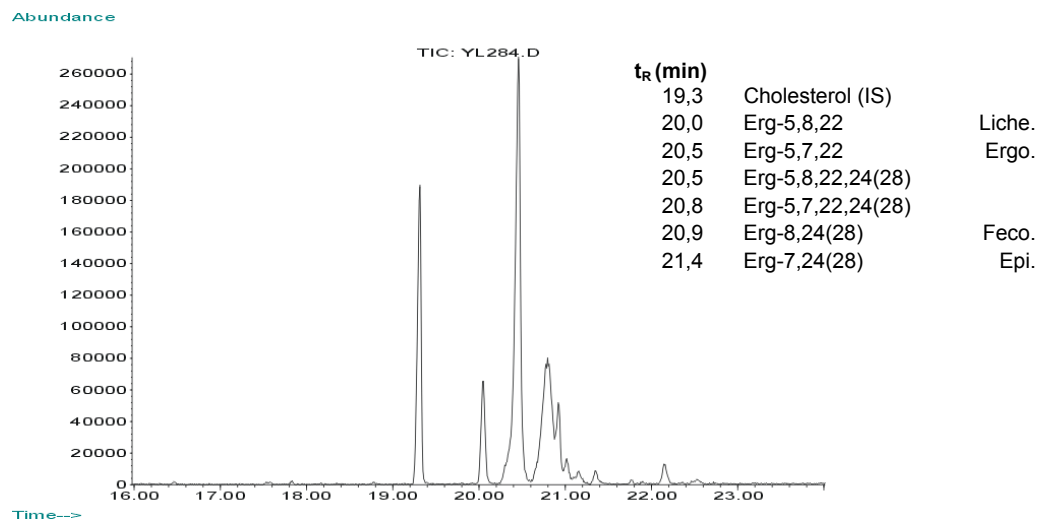
Y.l.	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
Tridemorph [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1	1,5	2
Trockengewicht [mg]	98,1	101,4	104,6	108,4	102,4	103,2	86,5	83,6	74,7	70,5	47,1	9,5

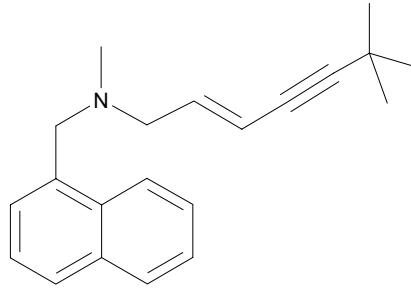


$EC_{50} \sim 1,5 \mu\text{g/ml}$

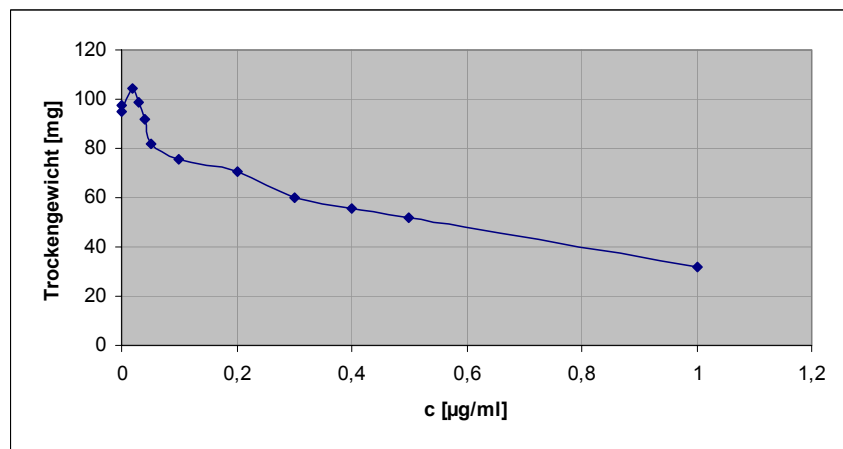
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1,5 \mu\text{g/ml}$ :



(viii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Terbinafin

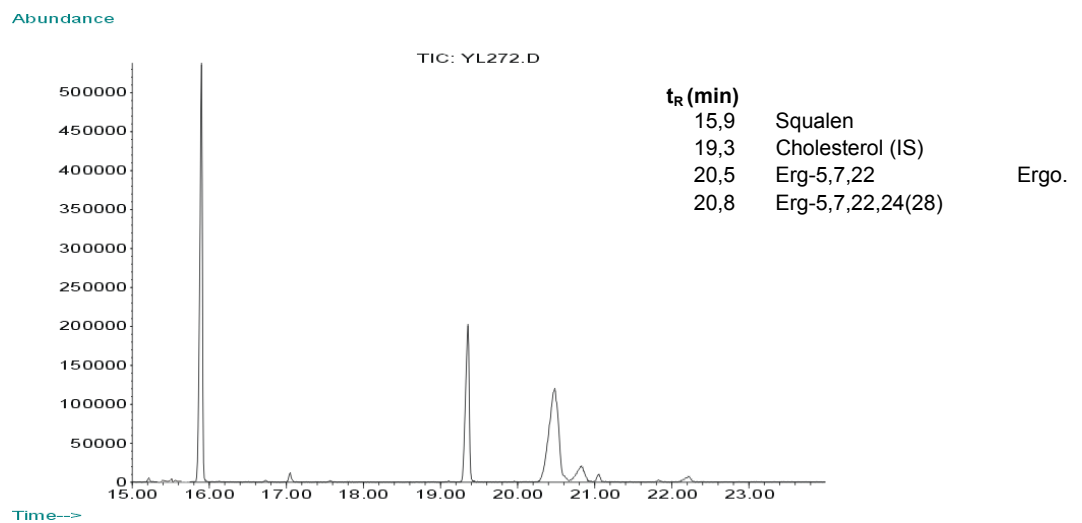
Y.I.	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273
Terbinafin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,03	0,04	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1
Trockengewicht [mg]	97,3	95	104,5	98,8	92	82	75,9	70,6	60	55,6	51,7	31,8



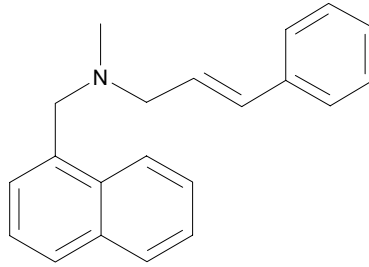
$EC_{50} \sim 0,5 \mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: Squalenepoxidase-Inhibitor

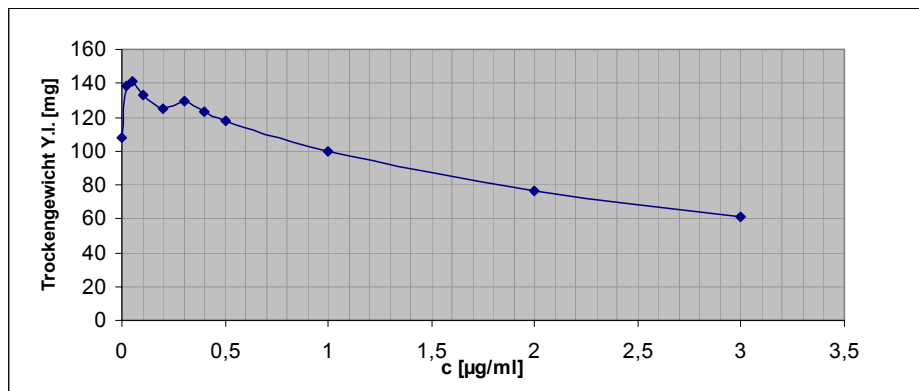
Sterolpattern bei  $0,5 \mu\text{g/ml}$ :





(ix) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Naftifin

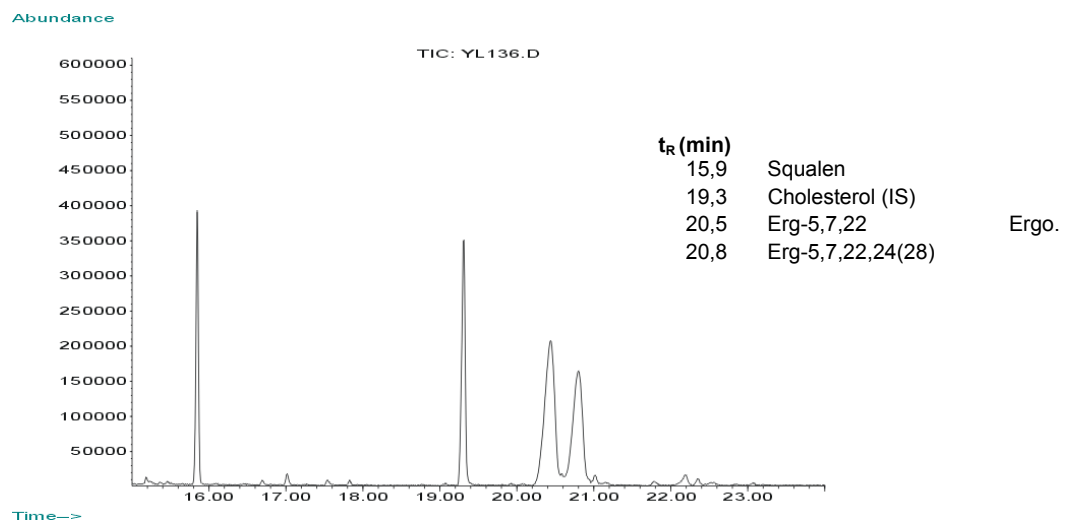
Y.I.	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
Naftifin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	1	2	3
Trockengewicht [mg]	112,5	108	138,2	140,7	133,3	125	129,6	122,9	112,5	117,5	99,7	76,3	61,5

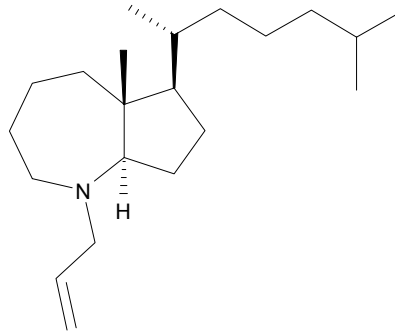


$EC_{50} \sim 3 \mu\text{g/ml}$

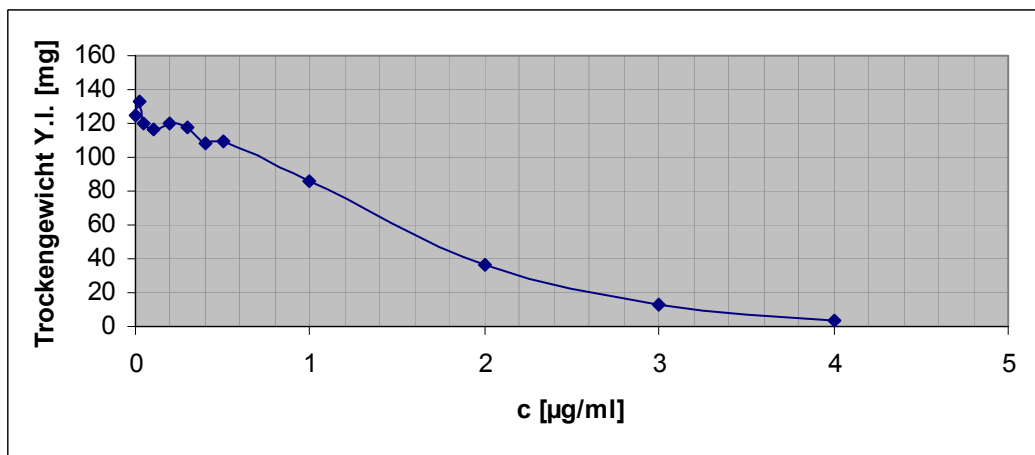
Inhibitionstyp: Squalenepoxidase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $3 \mu\text{g/ml}$ :



(x) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-N-Allylamin

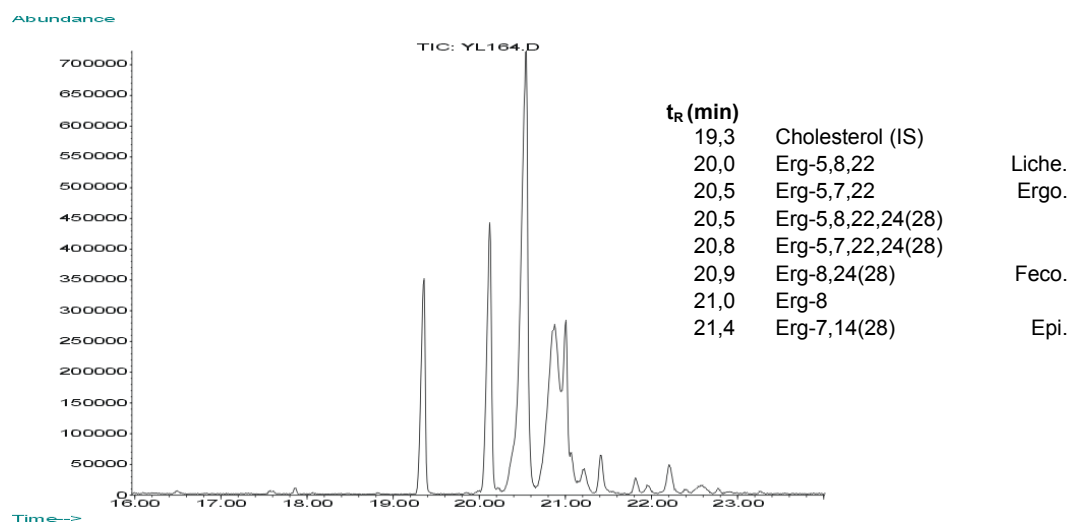
	Y.l.	168K	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
JCB-N-Allylamin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2	3	4	
Trockengewicht [mg]	124,3	133,5	120	116	120	117	108,8	109	85,4	36,1	13,1	3,7	

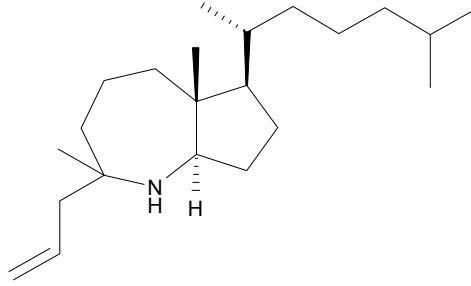


$EC_{50} \sim 1,5 \mu\text{g/ml}$

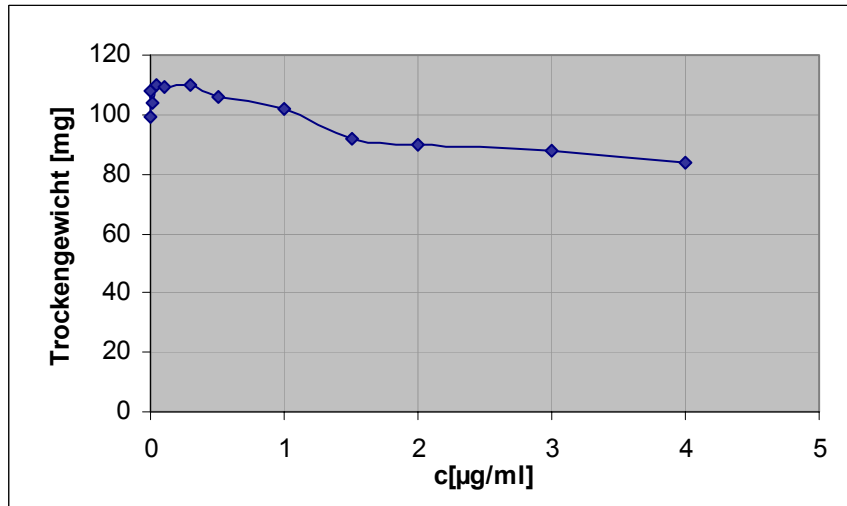
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1 \mu\text{g/ml}$ :



(xi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-Methylallylamin

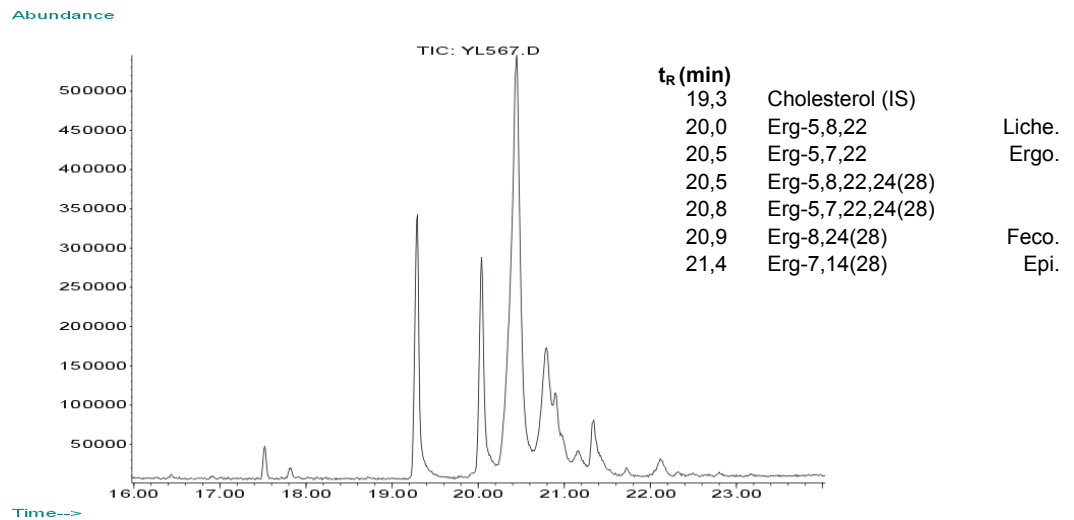
Y.l.	536K	537K	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567
JCB-Methylallylamin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	99	108	104	110	109	110	106	102	92	90	88	84

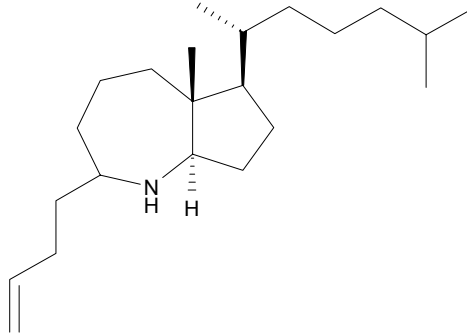


$EC_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$

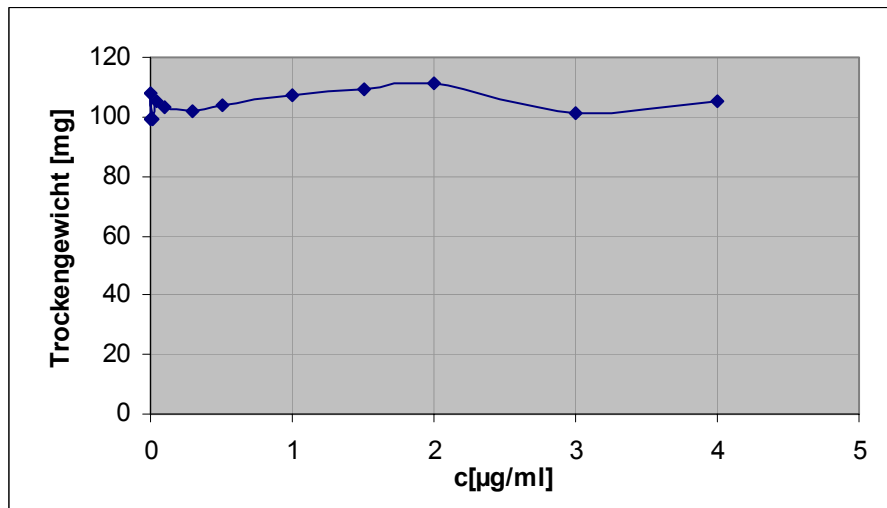
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g/ml}$ :



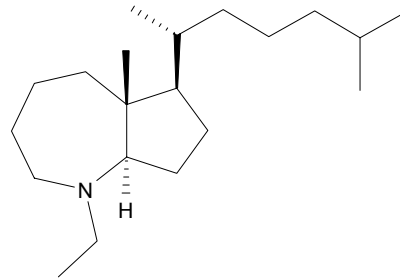
(xii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-Homoallylamin

	Y.I.	536K	537K	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547
JCB-Homoallylamin [ $\mu\text{g/ml}$ ]		0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]		99	108	99	105	103	102	104	107	109	111	101	105

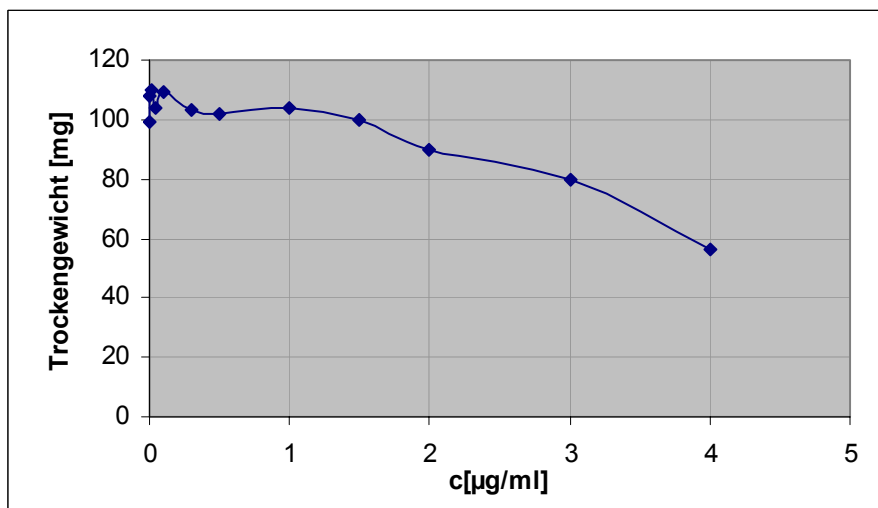


EC<sub>50</sub>: keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: keine Bestimmung möglich

(xiii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-N-Ethylamin

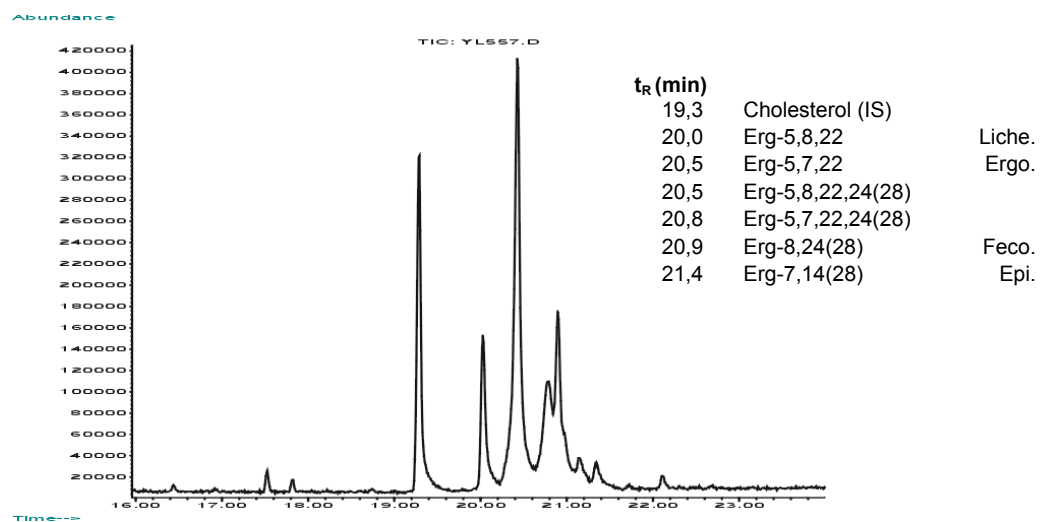
Y.l.	536K	537K	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557
JCB-N-Ethylamin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	99	108	110	104	109	103	102	104	100	90	80	56

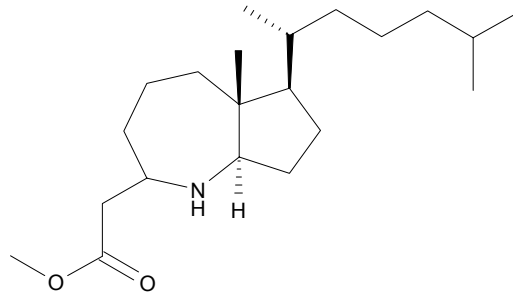


$EC_{50} \sim 4 \mu\text{g/ml}$

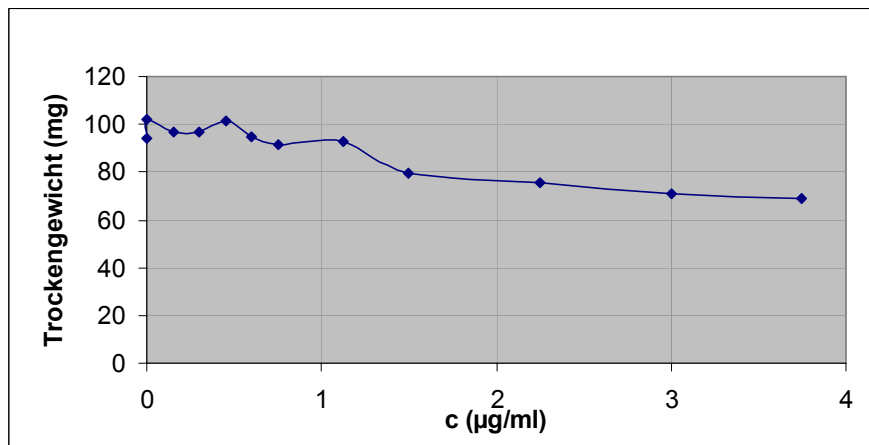
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g/ml}$ :



(xiv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-20

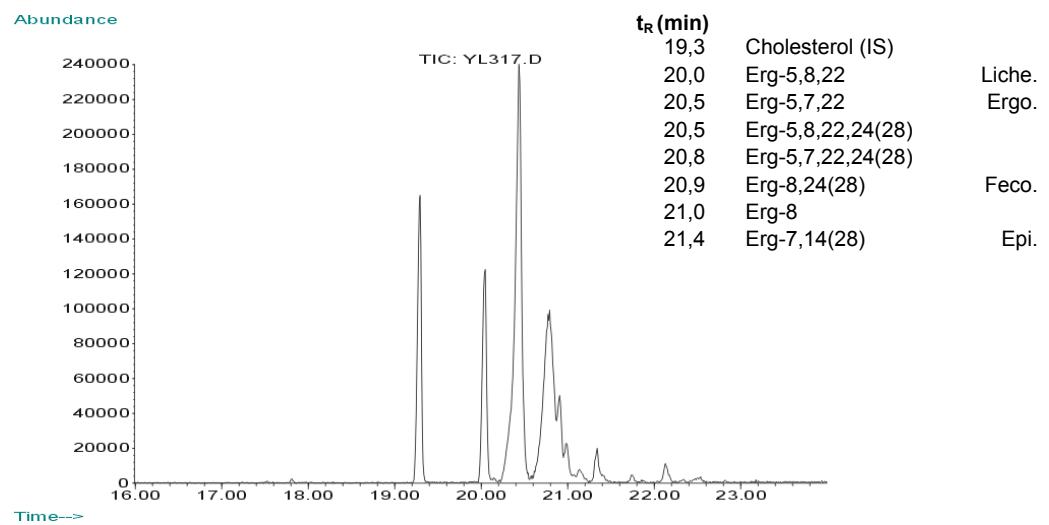
Y.I.	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
NS-20 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75	1,125	1,5	2,25	3	3,75
Trockengewicht [mg]	94,4	102	96,8	96,5	101,3	95,1	91,4	92,5	79,5	75,3	70,8	69

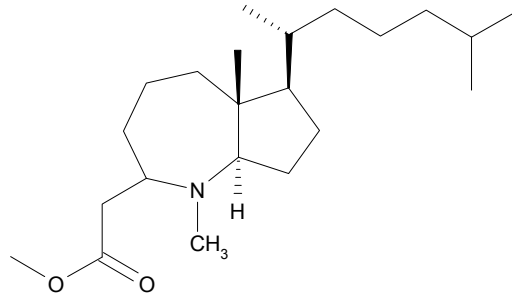


$EC_{50} > 3,75 \mu\text{g/ml}$

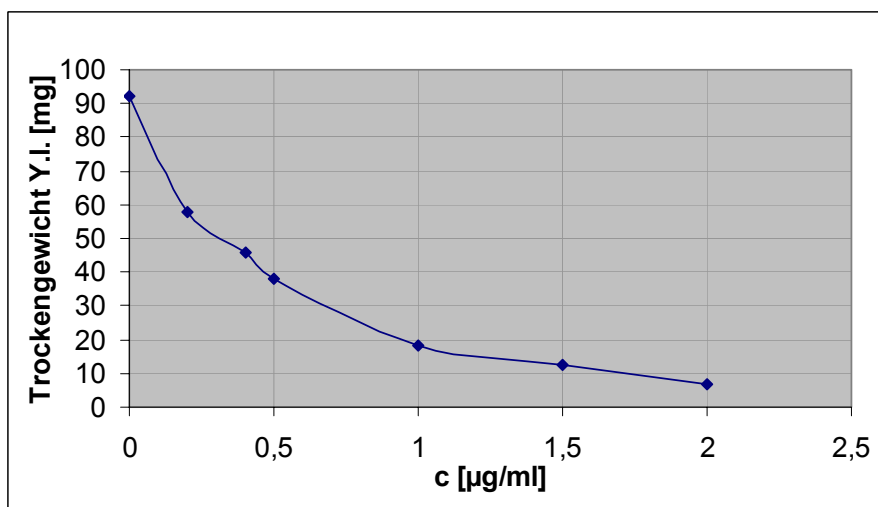
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $3,75 \mu\text{g/ml}$ :



(xv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-36

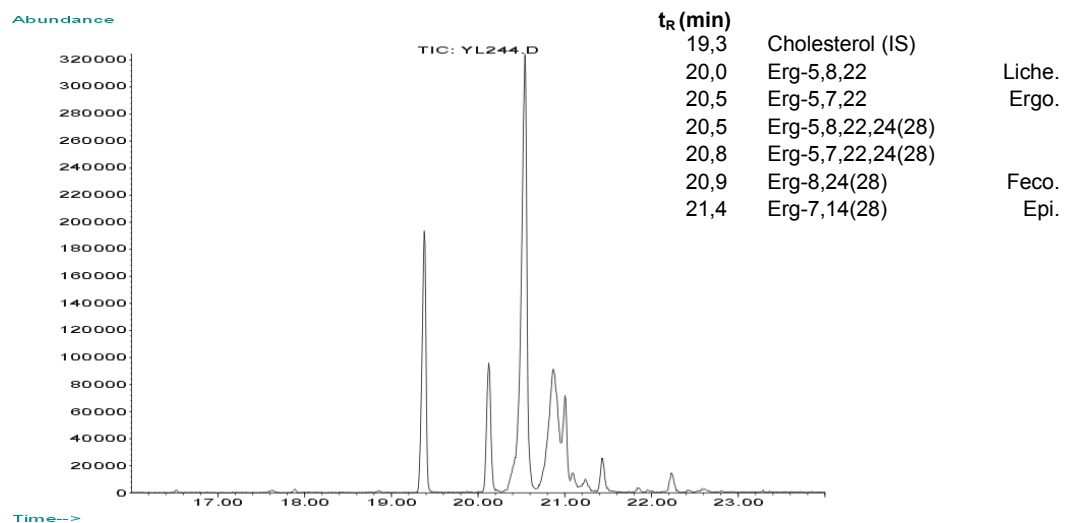
Y.I.	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253
NS-36 Ester [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,2	0,4	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Trockengewicht [mg]	92,3	99,6	57,8	45,6	37,8	18	12,4	6,6	4,6	4,2	3,8	4,5

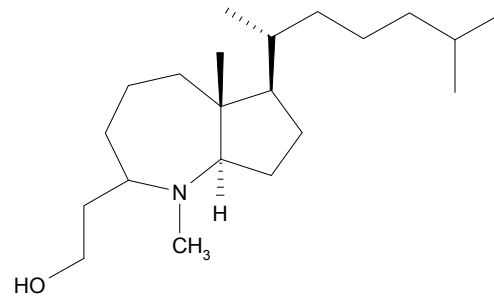


$EC_{50} \sim 0,4 \mu\text{g/ml}$

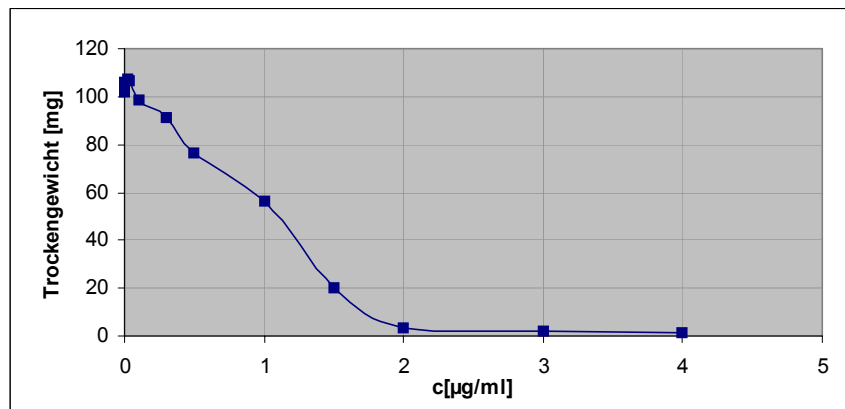
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $0,2 \mu\text{g/ml}$ :



(xvi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-40

Y.l.	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457
NS-40 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	101,8	105,6	107,5	106,5	98,8	90,9	76,1	56,6	19,9	3,5	1,9	1,6

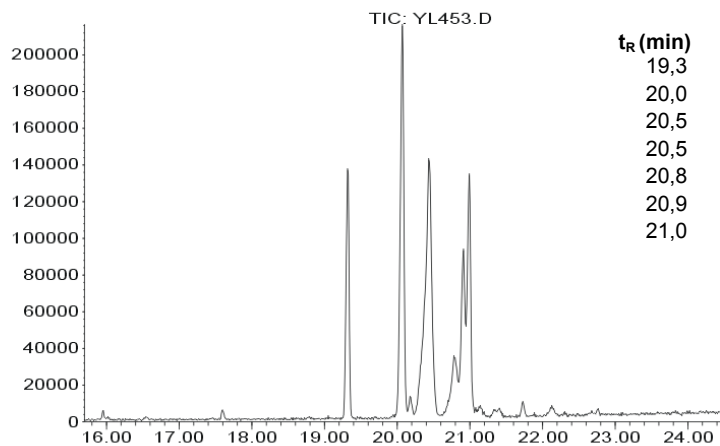


$EC_{50} \sim 1 \mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

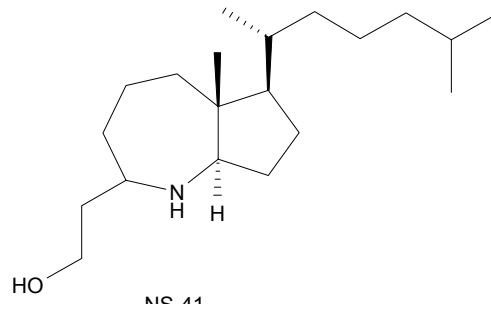
Sterolpattern bei  $1 \mu\text{g/ml}$ :

Abundance

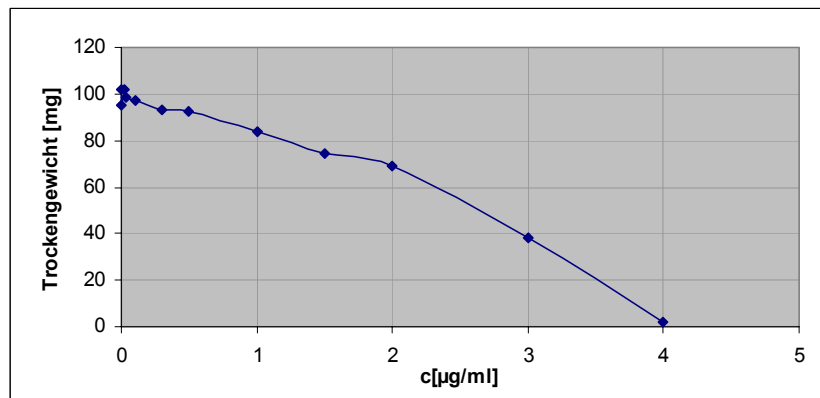


Time-->



(xvii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-41

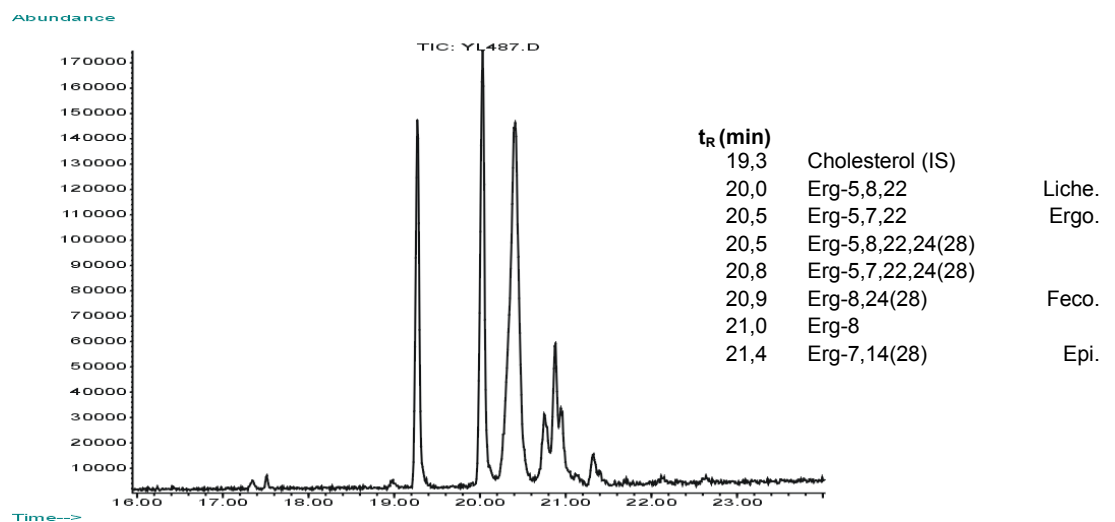
Y.I.	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489
NS-41 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	101,7	95,5	101,7	98,4	97,4	93,1	92,3	83,9	74,1	69,1	38	2,1

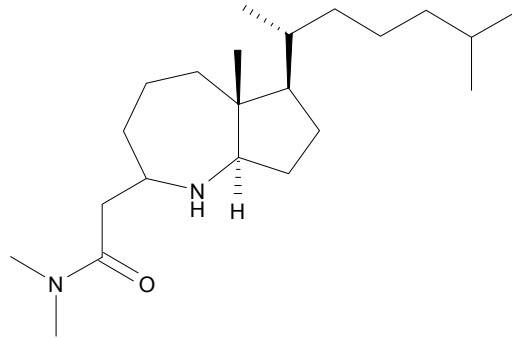


$EC_{50} \sim 2,5 \mu\text{g/ml}$

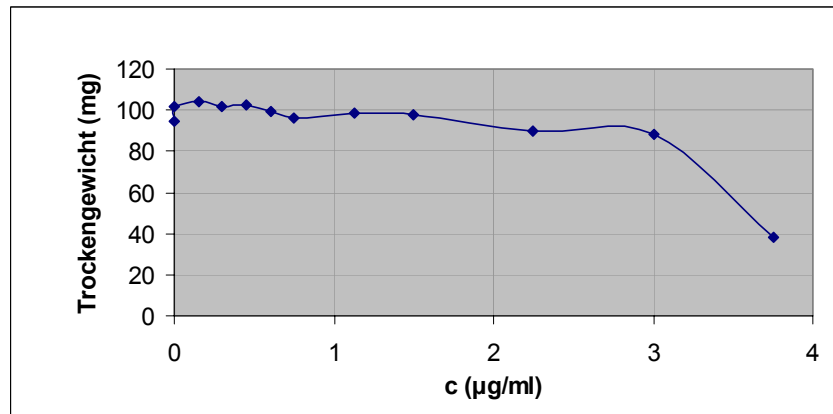
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $2 \mu\text{g/ml}$ :



(xviii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-47

Y.I.	306	307	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327
NS-47 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75	1,125	1,5	2,25	3	3,75
Trockengewicht [mg]	94,4	102	104	101,9	102,4	99,3	96,2	98,7	97,9	89,8	88,3	38,4

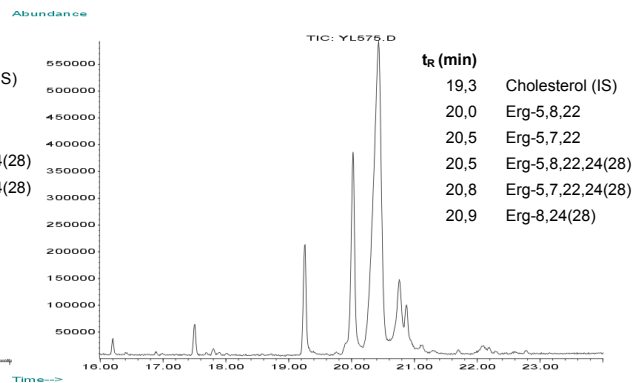
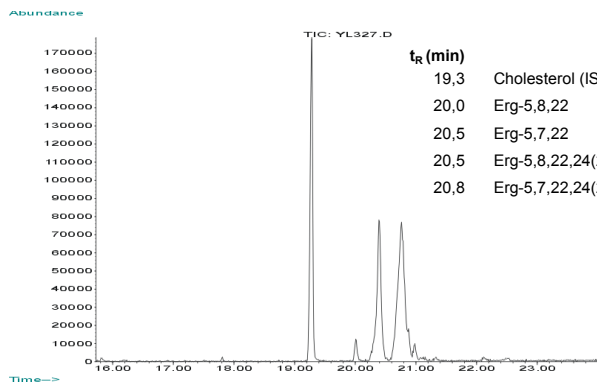


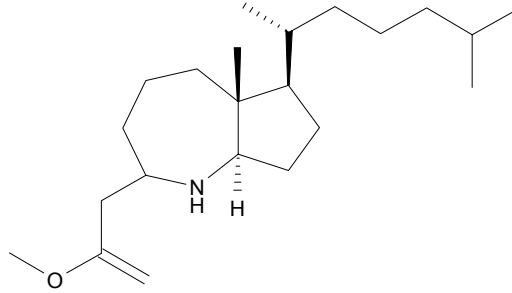
$\text{EC}_{50} \sim 3,5 \mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

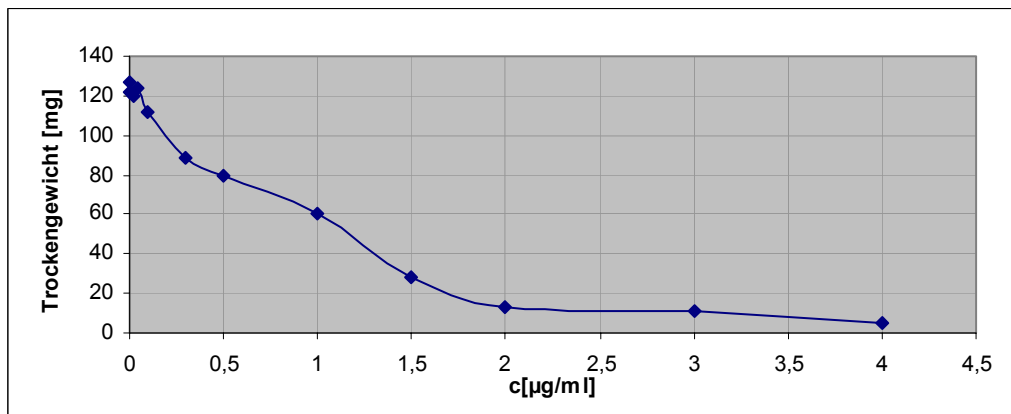
Sterolpattern bei 3,75  $\mu\text{g/ml}$ :

bei 4  $\mu\text{g/ml}$  in Schüttelkultur:



(xix) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-53-I

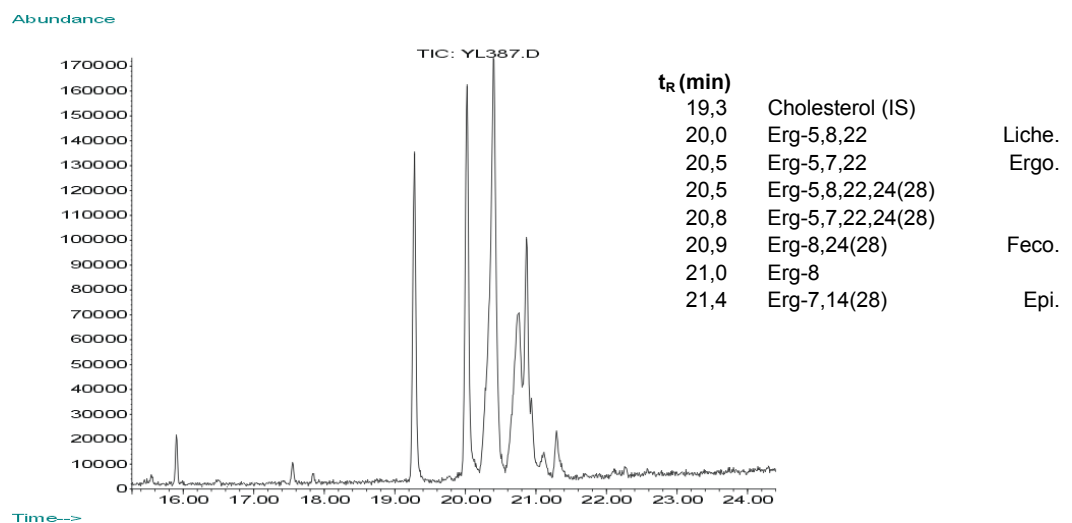
Y.I.	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391
NS-53-I [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	127	122	120	124	112	89	80	60	28	13	11	5

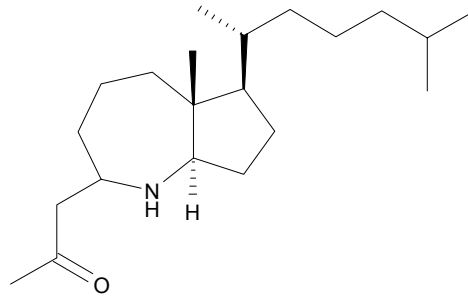


$EC_{50} \sim 1 \mu\text{g/ml}$

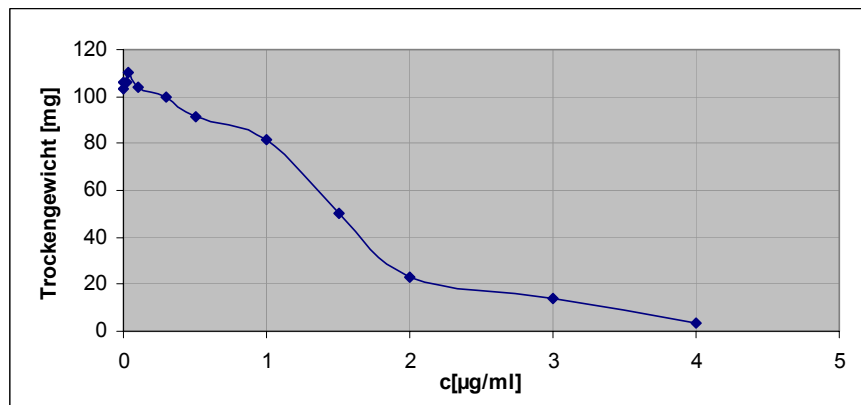
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1 \mu\text{g/ml}$ :



(xx) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-53

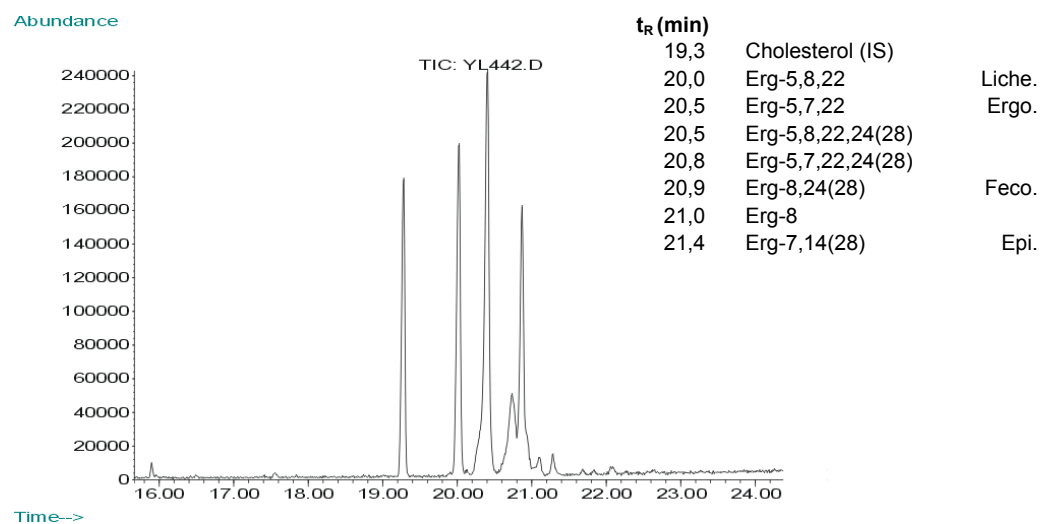
Y.l.	424	425	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
NS-53 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	103,6	106,2	106,3	110,2	104,3	100	91,2	81,8	50,3	23,2	14,2	3,6

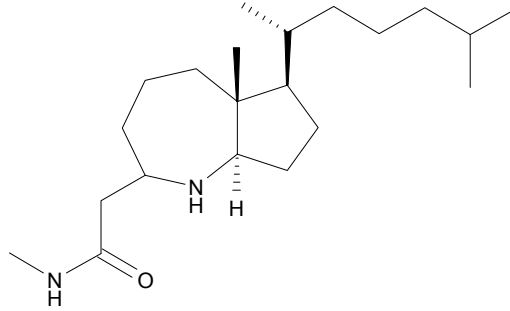


$EC_{50} \sim 1,5 \mu\text{g/ml}$

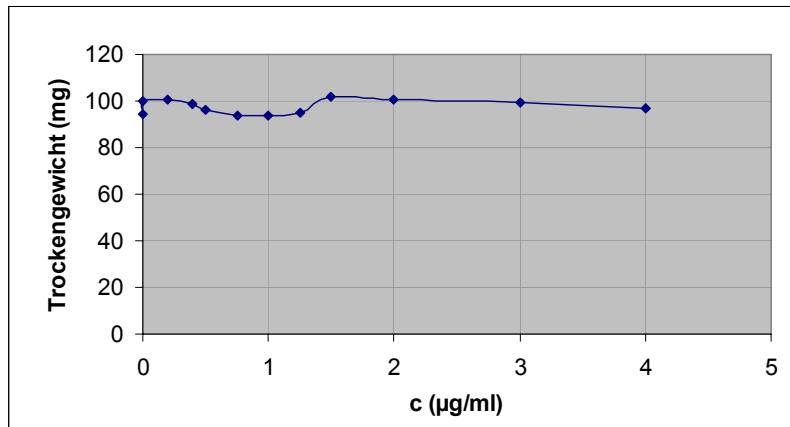
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1,5 \mu\text{g/ml}$ :



(xxi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-54

Y.l.	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349
NS-54 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,2	0,4	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	94,2	99,7	100,5	98,9	96,5	93,6	93,9	95	101,6	100,4	99,68	97,1

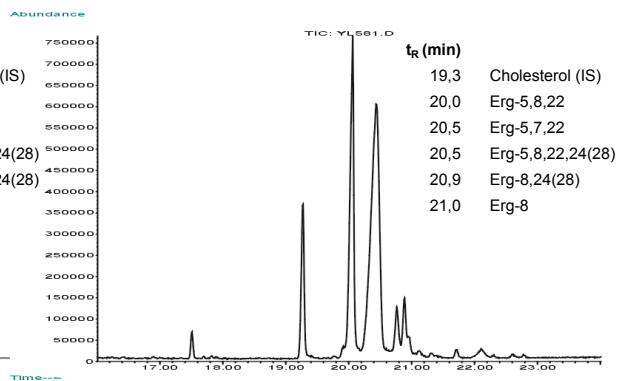
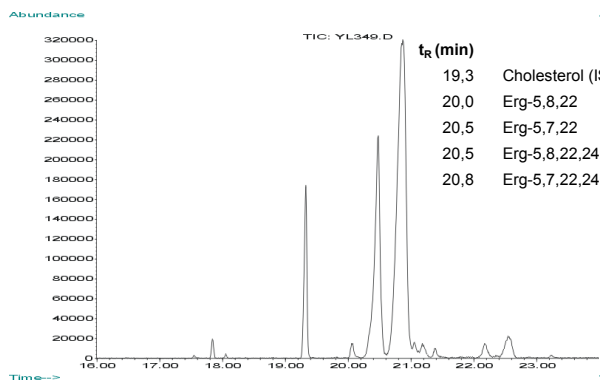


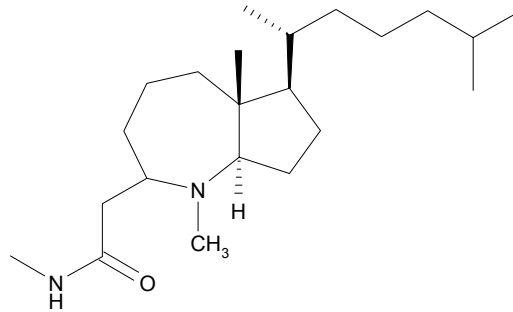
EC<sub>50</sub>: nicht feststellbar

Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

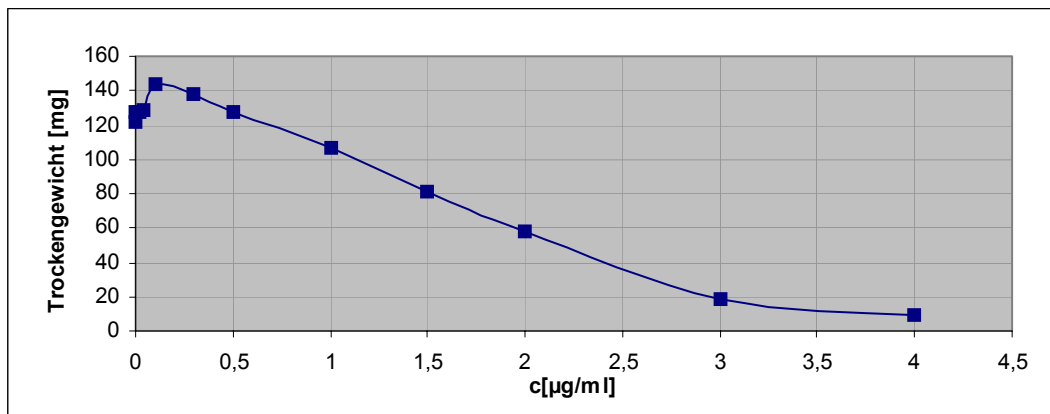
Sterolpattern bei 4  $\mu\text{g/ml}$ :

bei 5  $\mu\text{g/ml}$  in Schüttelkultur:



(xxii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-55

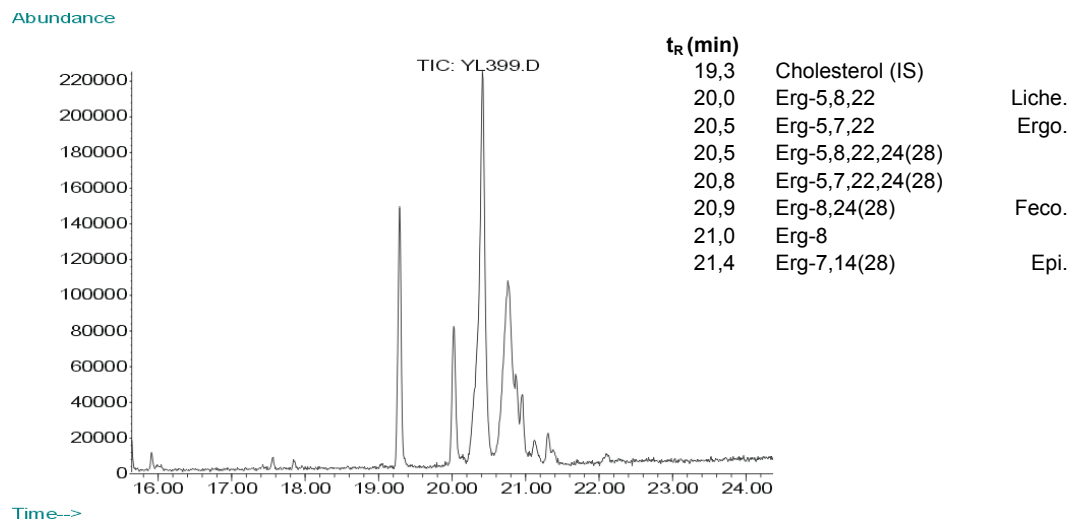
Y.l.	380	381	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401
NS-55 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	127	122	128	129	143,4	138	127	107	81	58	18,7	9,4

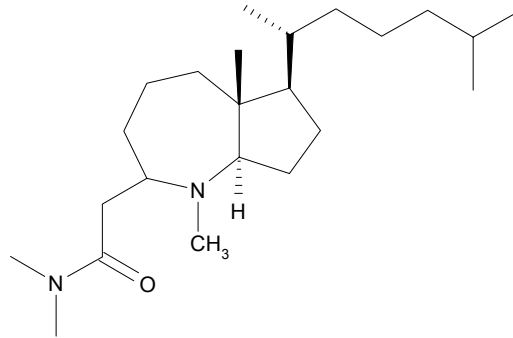


$EC_{50} \sim 2 \mu\text{g/ml}$

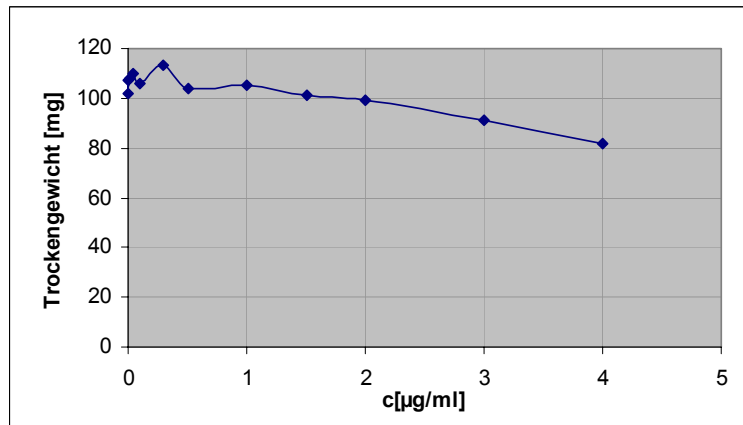
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $2 \mu\text{g/ml}$ :



(xxiii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-56

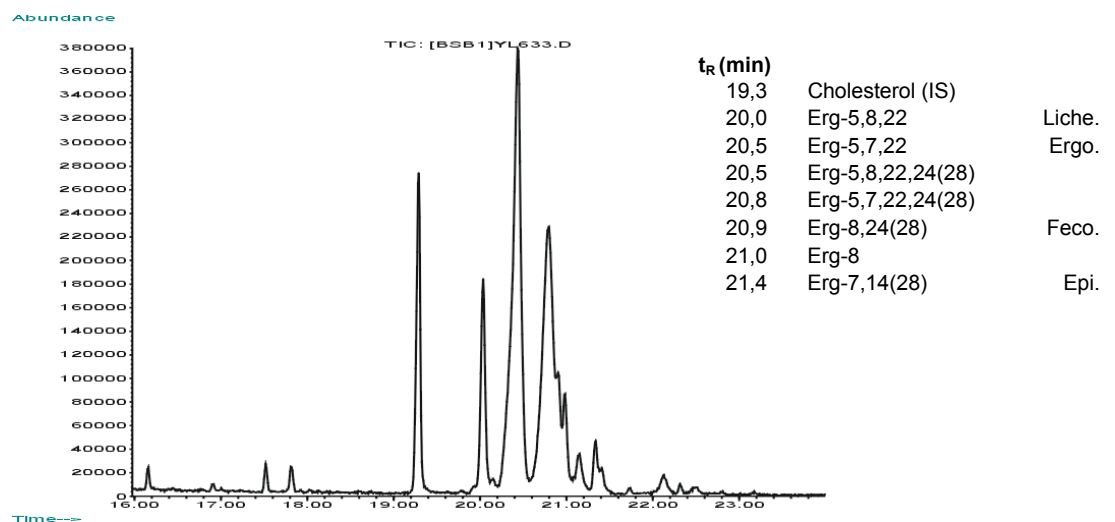
Y.I.	622K	623K	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633
NS-56 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	107	102	108	110	106	113	104	105	101	99	91	82

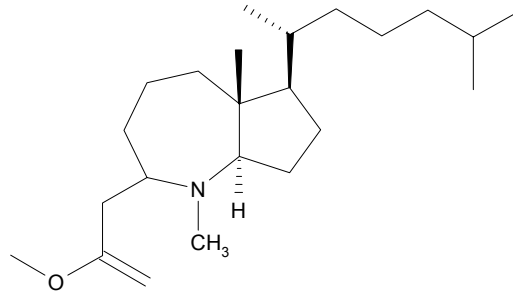


$EC_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$

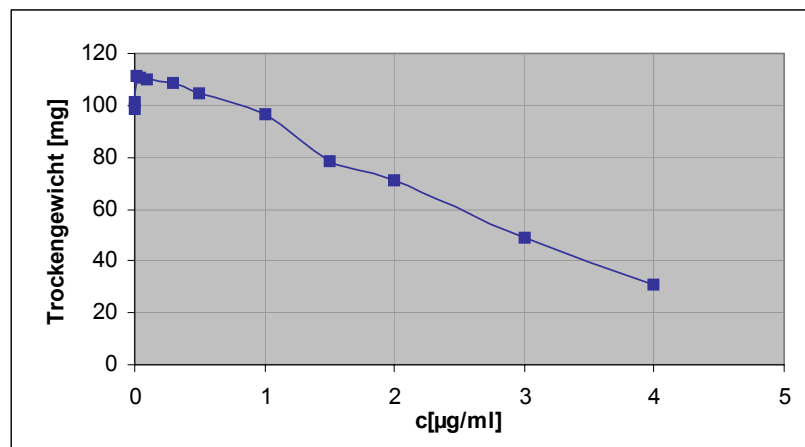
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g/ml}$ :



(xxiv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-57-I

Y.I.	402	403	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
NS-57-I [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	101,3	98,4	111,5	110,3	109,9	108,5	104,8	96,7	78,7	70,9	48,9	30,7

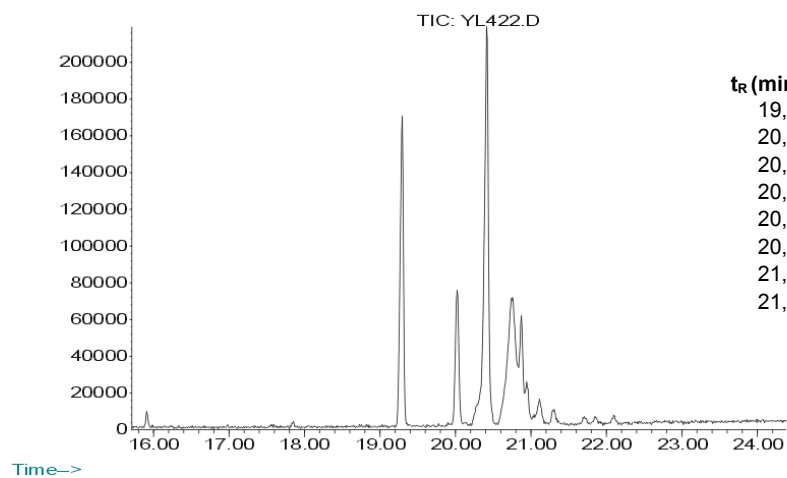


$EC_{50} \sim 3 \mu\text{g/ml}$

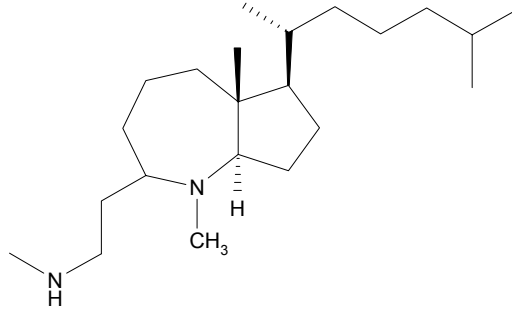
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $3 \mu\text{g/ml}$ :

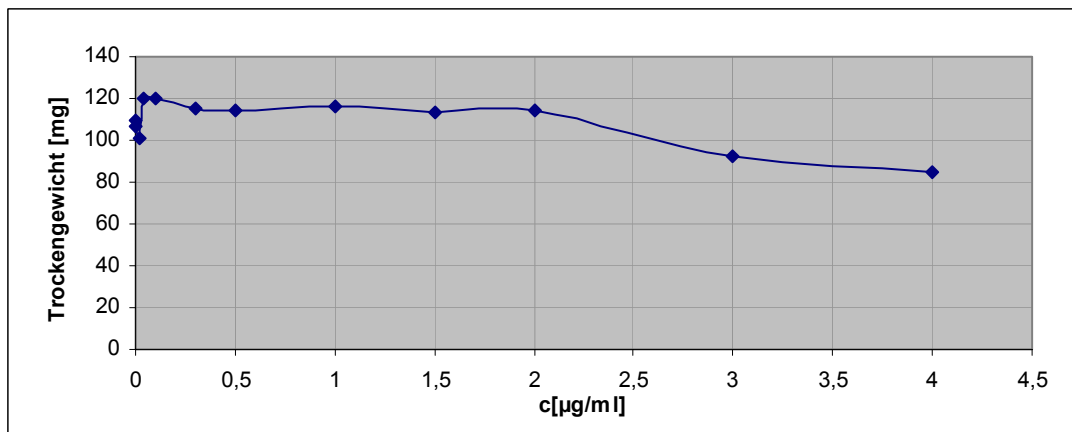
Abundance





(xxv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-58

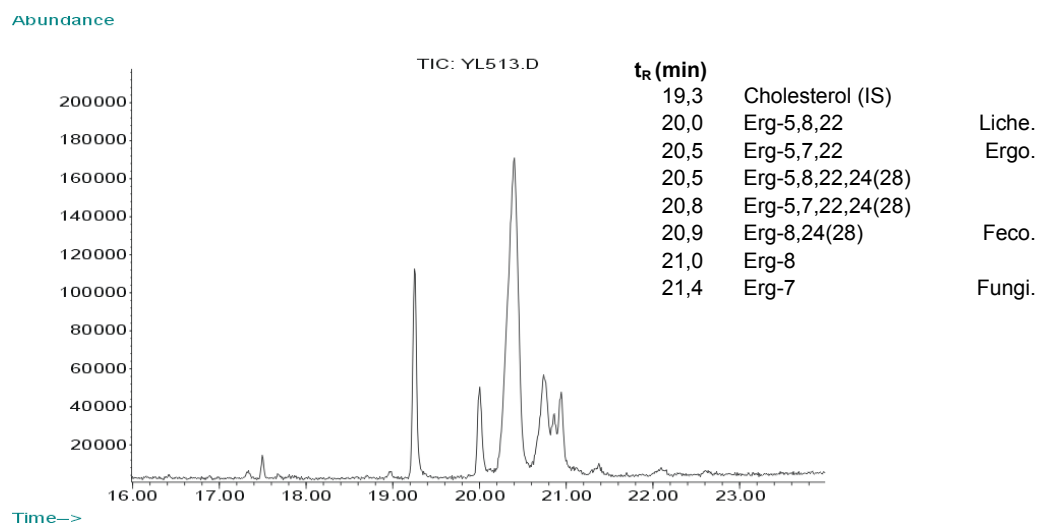
Y.l.	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513
NS-58 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	109,9	106,6	101,4	119,8	119,8	115	114,1	115,9	113	114,7	92,6	84,4

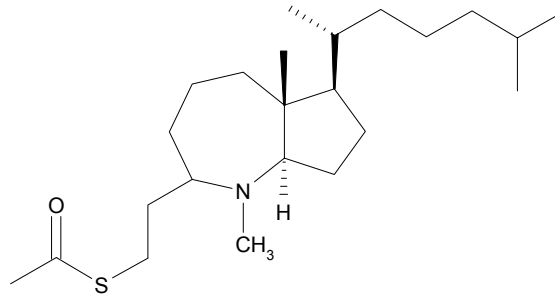


$EC_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$

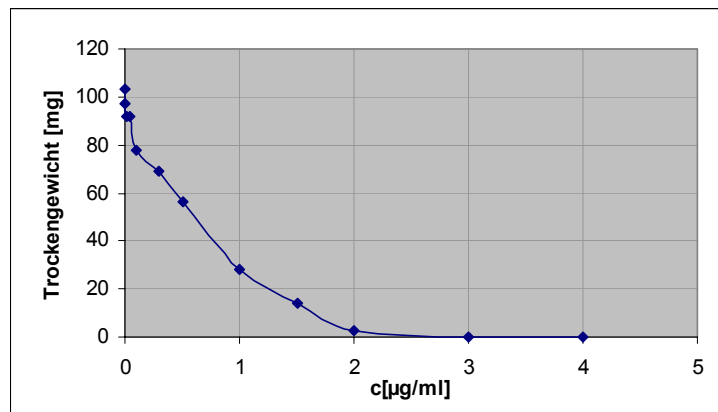
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g/ml}$ :



(xxvi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-62

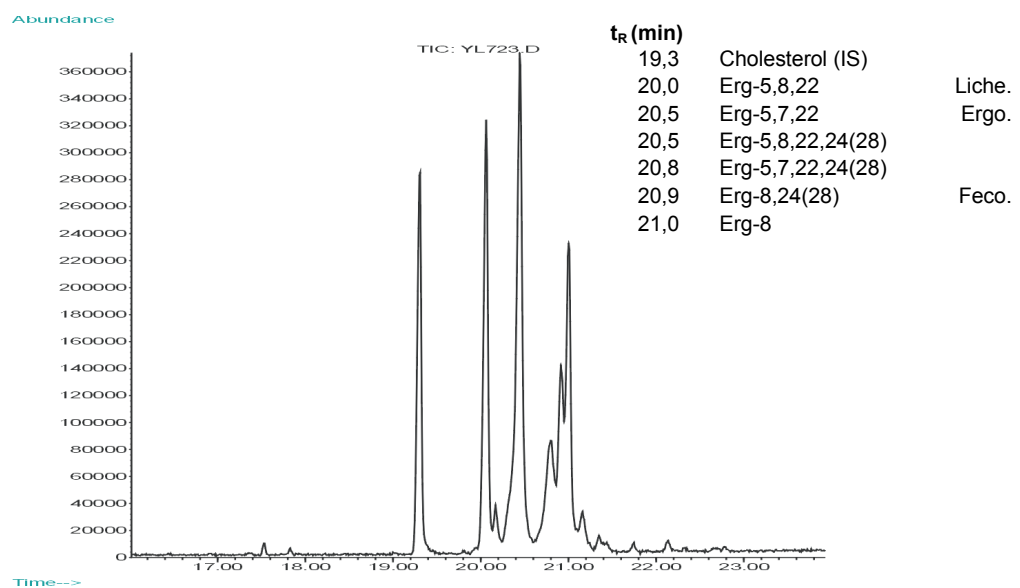
Y.I.	707K	708K	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728
NS-62 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	103	97	92	92	78	69	56	28	14	3	0	0

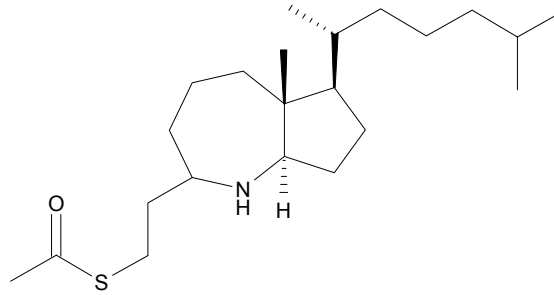


$EC_{50} \sim 0,5 \mu\text{g/ml}$

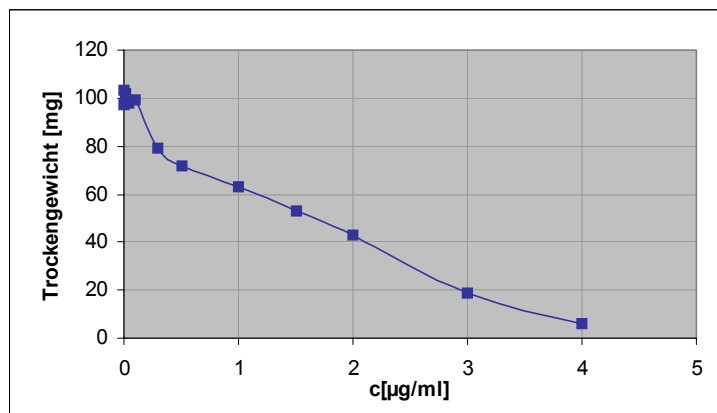
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $0,5 \mu\text{g/ml}$ :



(xxvii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-63

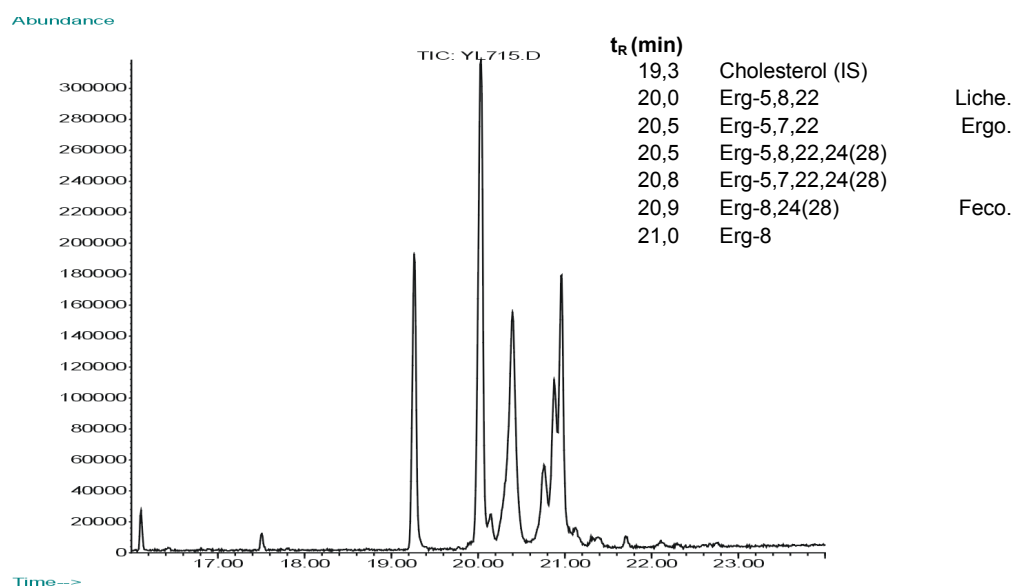
Y.I.	707K	708K	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718
NS-63 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	103	97	102	98	99	79	72	63	53	43	19	6

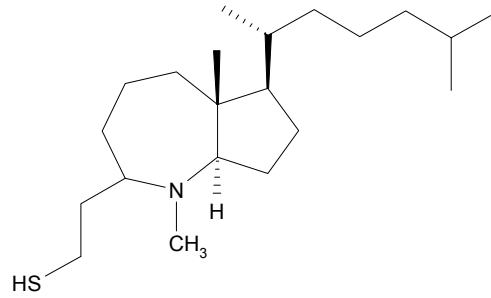


$EC_{50} \sim 1,5 \mu\text{g/ml}$

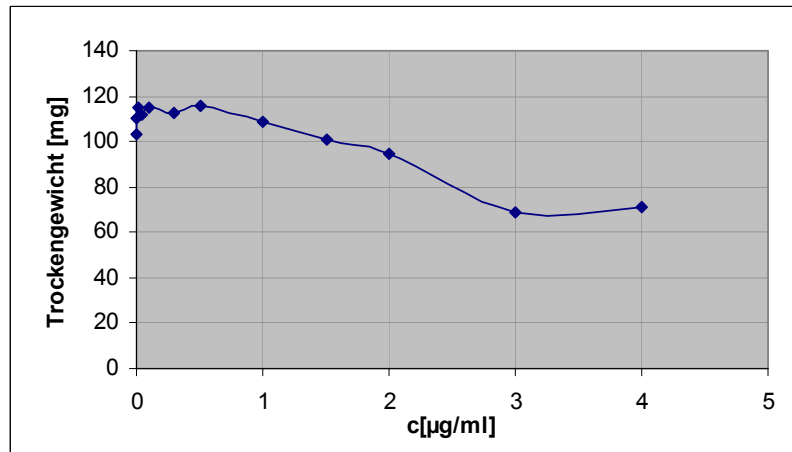
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $1,5 \mu\text{g/ml}$ :



(xxviii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-64

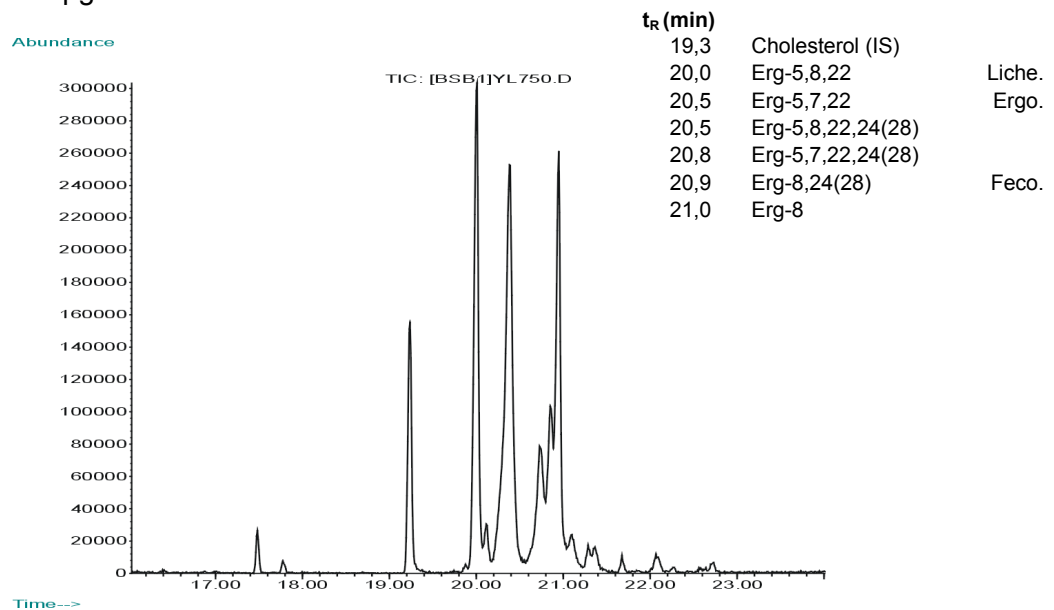
	Y.I.	707K	708K	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
NS-65 [ $\mu\text{g/ml}$ ]		0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]		103	110	115	112	115	113	116	109	101	95	69	71

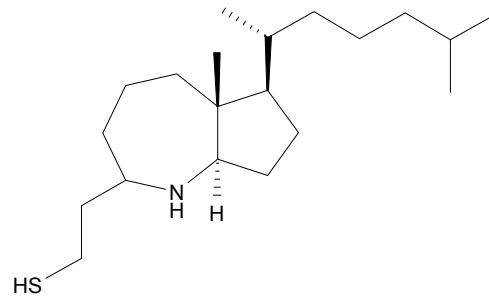


$EC_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$

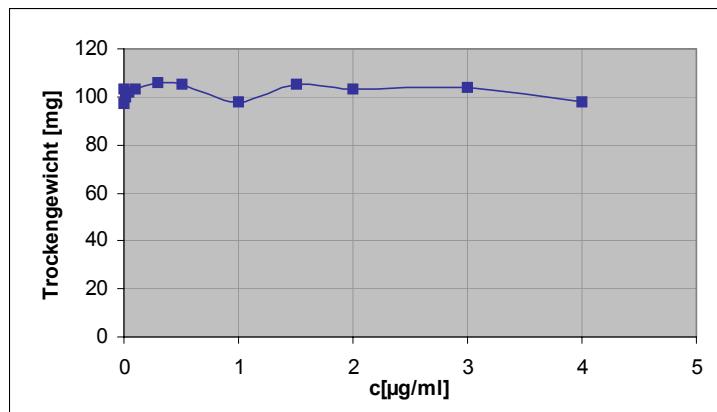
Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei  $4 \mu\text{g/ml}$ :



(xxix) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-65

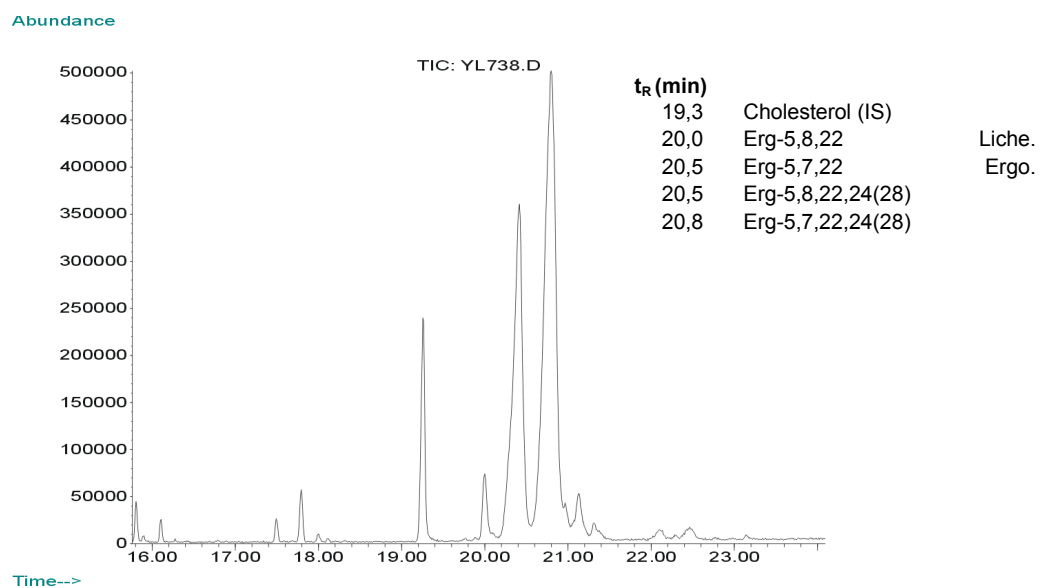
	Y.I.	707K	708K	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738
NS-65 [ $\mu\text{g/ml}$ ]		0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]		103	97	100	102	103	106	105	98	105	103	104	98



EC<sub>50</sub> : nicht feststellbar

Inhibitionstyp:  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor

Sterolpattern bei 4  $\mu\text{g/ml}$ :



(xxx) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit ausgewählten aktiven Verbindungen unter modifizierten Bedingungen

Ausgewählte Substanzen von Frau N. Salman wurden in Schüttelkultur (240 UPM, 28°C) inkubiert. Alle übrigen Parameter wurden beibehalten. Die Testung erfolgte bei den Konzentrationen, die bei Ruhekultur eine 50%ige Reduktion der Biomasse ergaben (EC<sub>50</sub>).

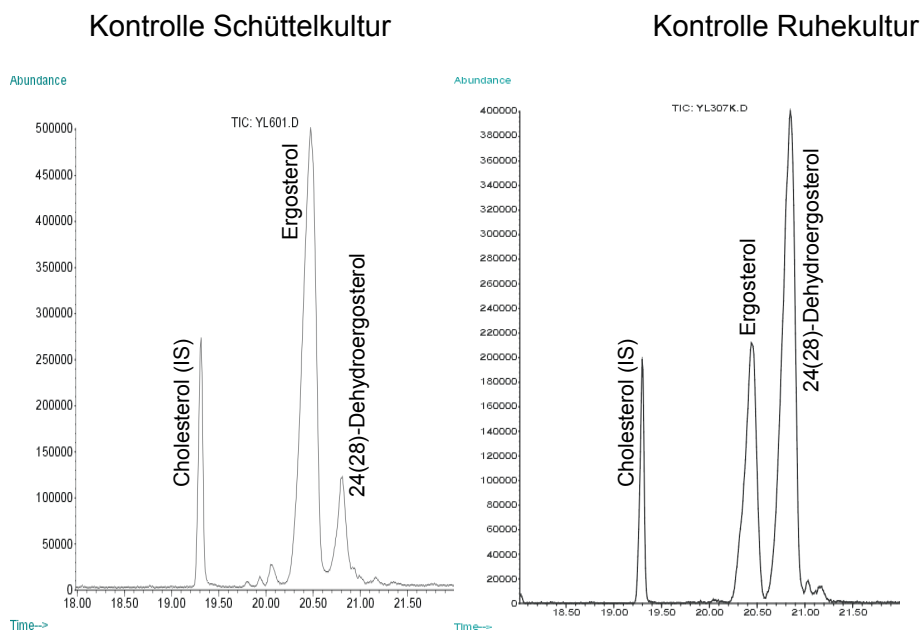
An den Auswaagen ist zu erkennen, daß das Wachstum größer ist, wenn eine regelmäßige Durchmischung des Mediums und erhöhte Sauerstoffversorgung während des Inkubierens gewährleistet ist.

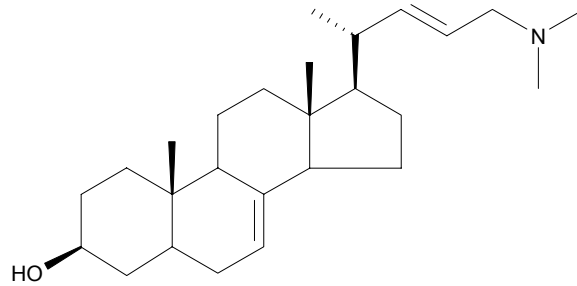
Gleichsam ist die Toleranz gegenüber Wirkstoffen höher – die in Ruhekultur ermittelten EC<sub>50</sub> bewirken hier keine Reduktion des Wachstums auf 50%!

Die gefundenen Sterolmuster nach SPE zeigen z.T. andere Intensitätsverhältnisse der Sterole untereinander (verglichen mit der Ruhekultur), die Inhibitionstypen konnten jedoch bestätigt werden.

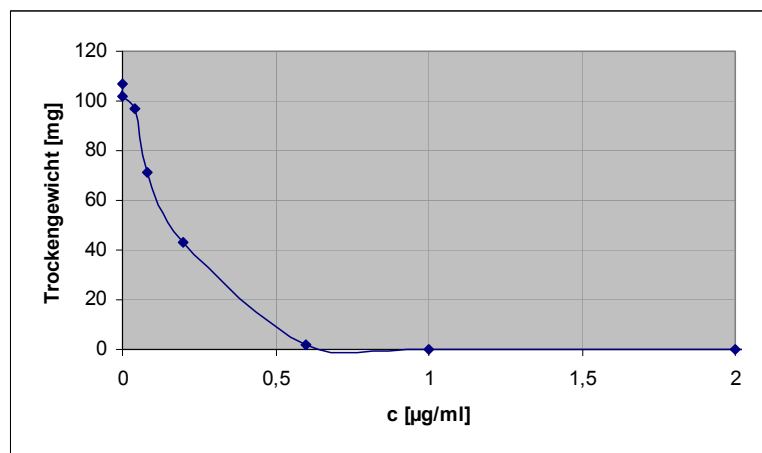
Substanz	c [µg/ml]	Auswaage
Kontrolle	---	238 mg
NS-20 Y.I.569	5,25	209 mg
NS-36 Y.I.571	1	189 mg
NS-41 Y.I.573	3	203 mg
NS-47 Y.I.575	4	171 mg
NS-53-I Y.I.579	1,5	221 mg
NS-54 Y.I.581	5	186 mg
NS-55 Y.I.583	2,5	198 mg
NS-57-I Y.I.585	3	163 mg
NS-58 Y.I.587	4	217 mg

Gegenüber den Ansätzen in Ruhekultur ist das Verhältnis von Ergosterol zu Ergosta-5,7,22,24(28) hier deutlicher zu Gunsten des Ergosterols verschoben.



(xxxi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-18

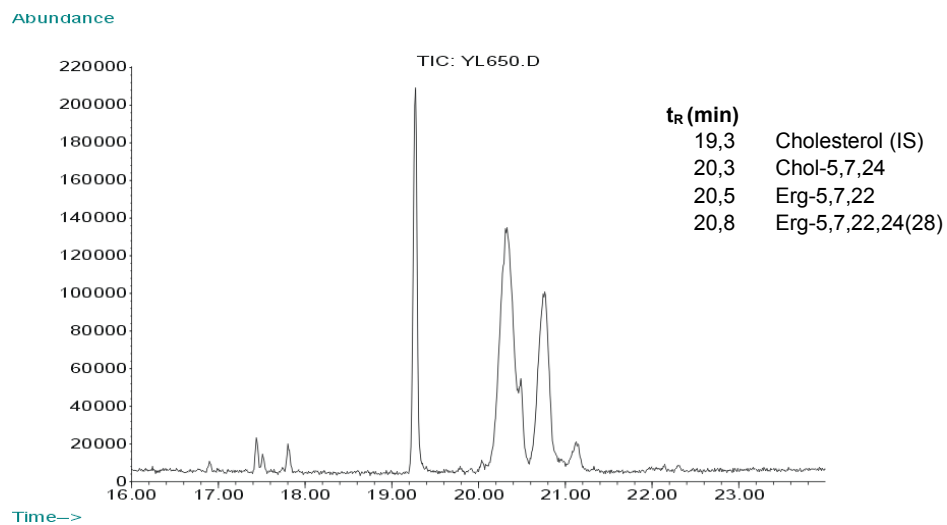
Y.l.	622K	623K	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657
MG-18 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,04	0,08	0,2	0,6	1	2	3	4	6	8
Trockengewicht [mg]	107	102	97	71	43	2	0	0	0	0	0	0

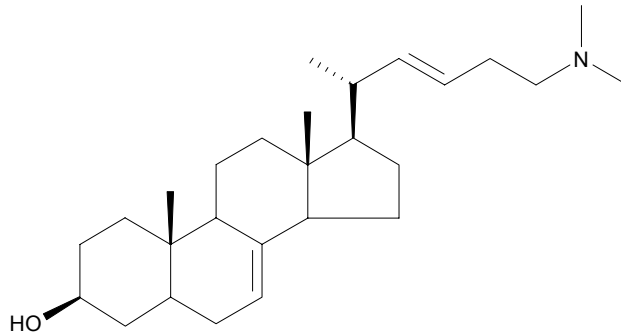


$EC_{50} \sim 0,2 \mu\text{g/ml}$

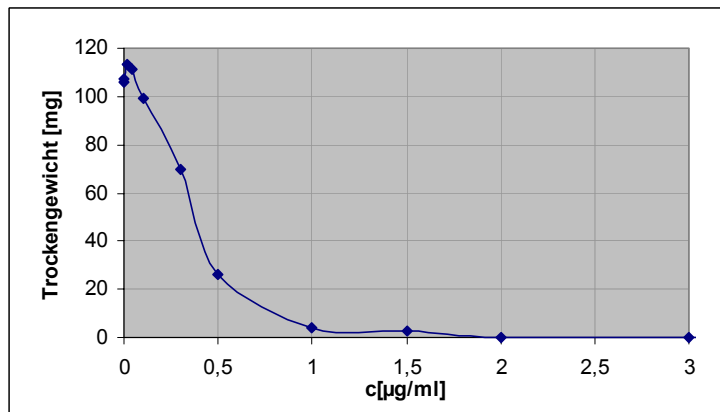
Inhibitionstyp: C-24-Methyltransferase-Inhibitor

Sterolpattern bei 0,2  $\mu\text{g/ml}$ :



(xxxii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-22

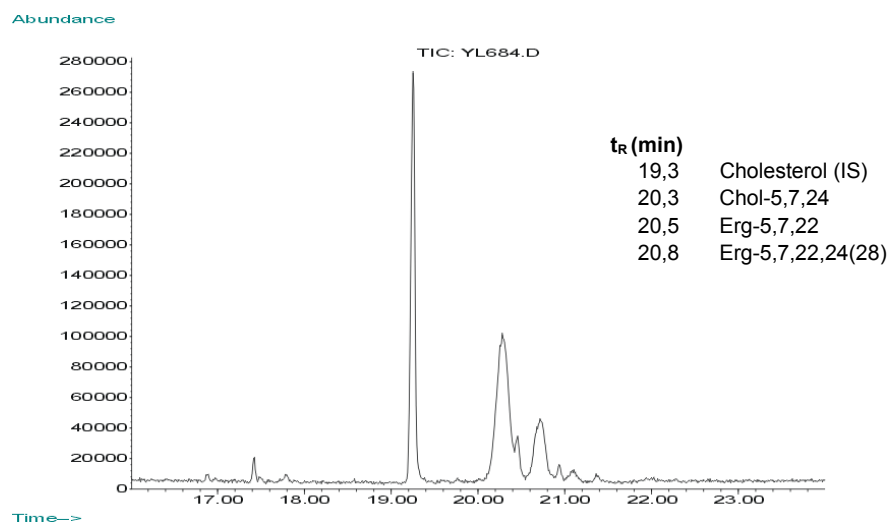
Y.l.	658K	659K	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689
MG-22 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	107	106	113	111	99	70	26	4,1	2,8	0	0	0



$EC_{50} \sim 0,4 \mu\text{g/ml}$

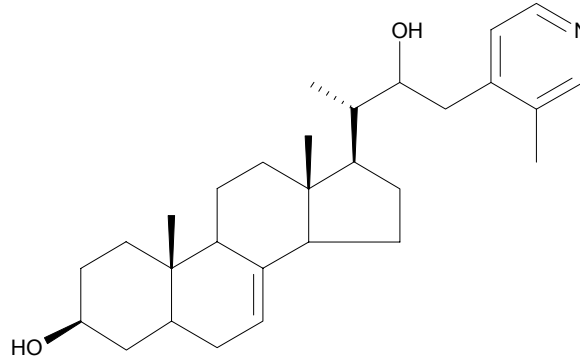
Inhibitionstyp: C-24-Methyltransferase-Inhibitor

Sterolpattern bei 0,5  $\mu\text{g/ml}$ :

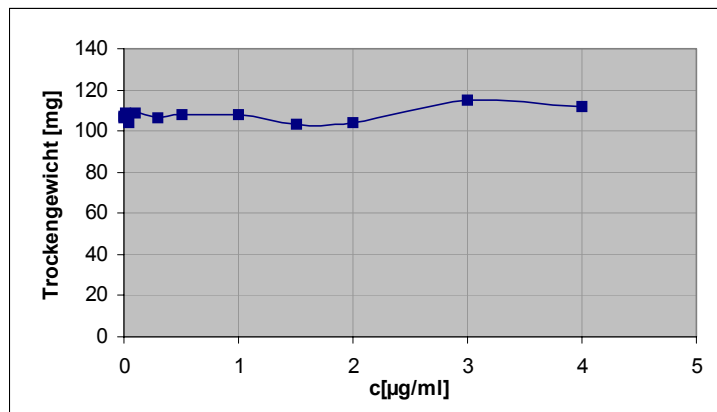


Ergo.



(xxxiii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-30

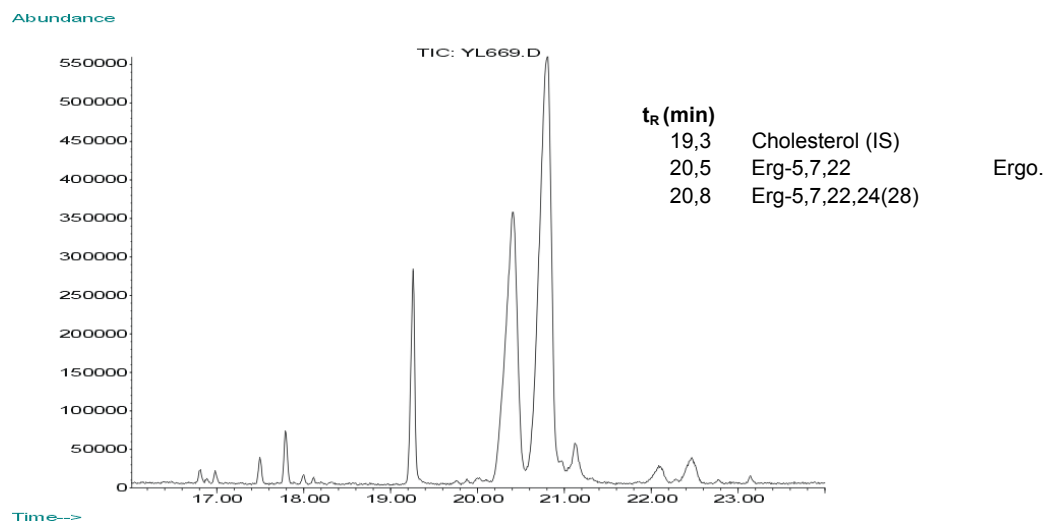
	Y.l.	658K	659K	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669
MG-30 [ $\mu\text{g/ml}$ ]		0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]		107	106	109	104	109	106	108	108	103	104	115	112

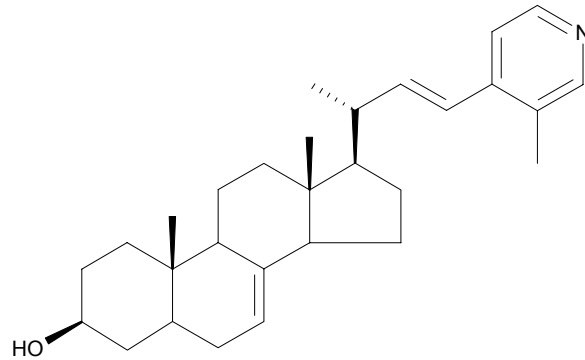


$EC_{50}$  : nicht feststellbar

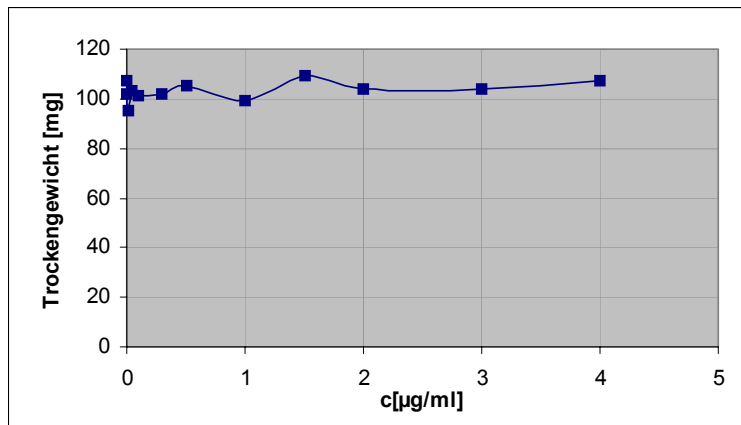
Inhibitionstyp: kein SBI

Sterolpattern bei 4  $\mu\text{g/ml}$ :



(xxxiv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-33

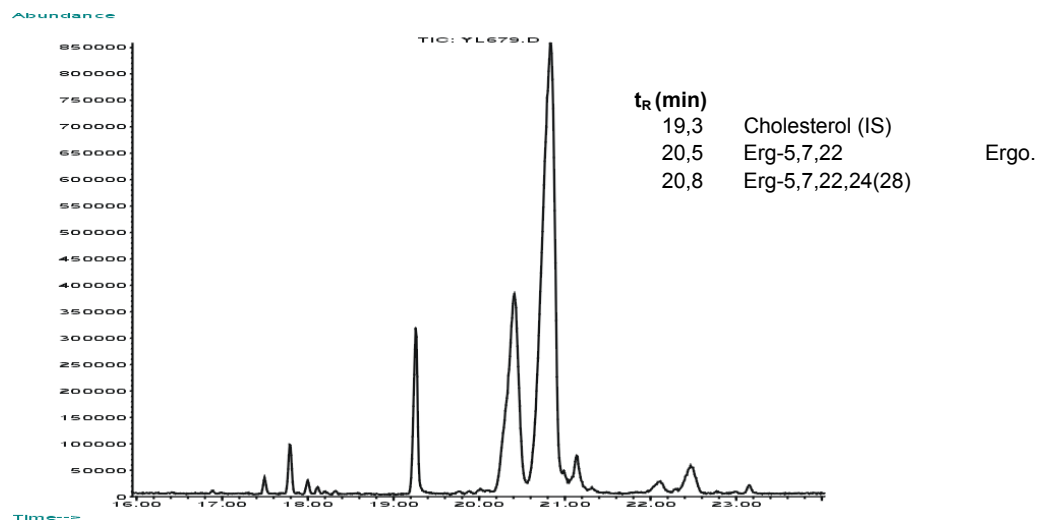
Y.l.	658K	659K	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679
MG-33 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,02	0,04	0,1	0,3	0,5	1	1,5	2	3	4
Trockengewicht [mg]	107	102	95	103	101	102	105	99	109	104	104	107

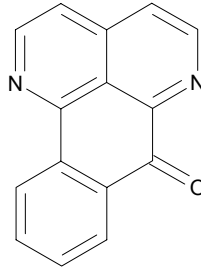


$EC_{50}$ : nicht feststellbar

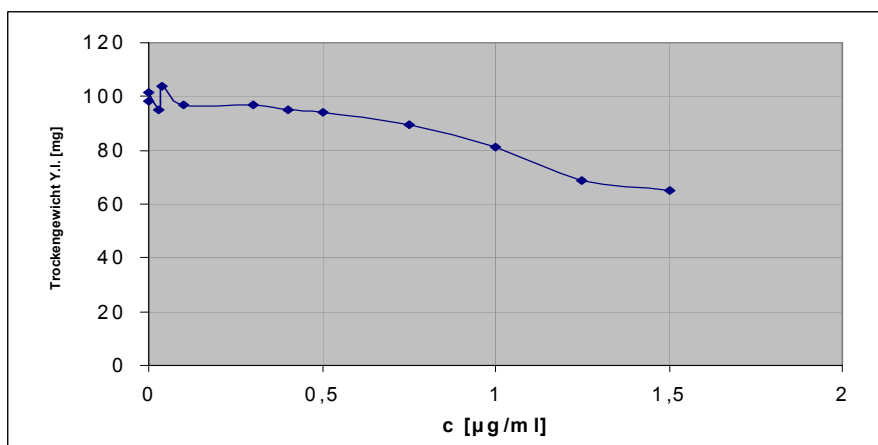
Inhibitionstyp: kein SBI

Sterolpattern bei 4  $\mu\text{g/ml}$ :



(xxxv) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Sampangin

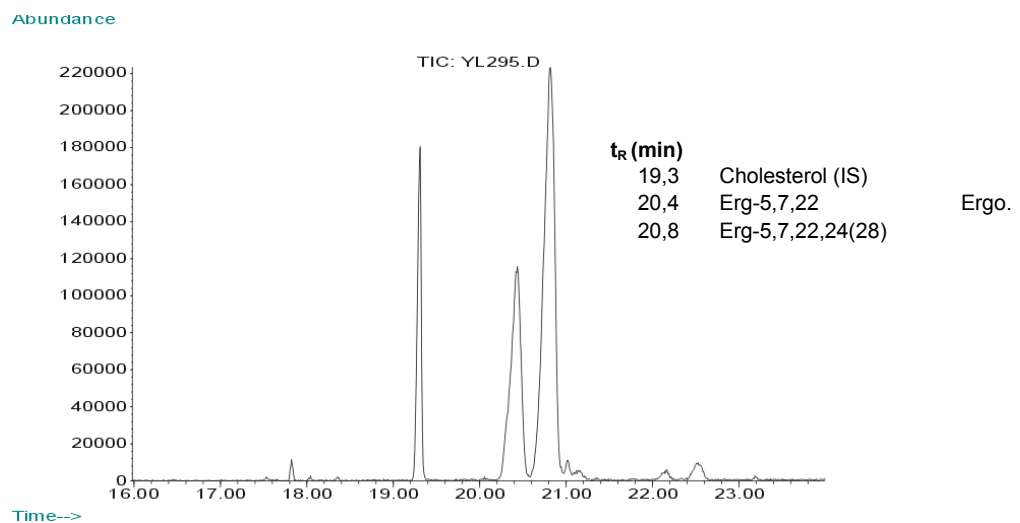
Y.l.	274	275	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295
Sampangin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0	0,03	0,04	0,1	0,3	0,4	0,5	0,75	1	1,25	1,5
Trockengewicht [mg]	98,1	101,4	94,9	103,9	97,1	96,8	94,9	94,1	89,5	81,2	68,6	65,3



$EC_{50} > 1,5 \mu\text{g/ml}$  (mangelnde Löslichkeit im Nährmedium verhindert höhere Dosierung)

Inhibitionstyp: kein SBI

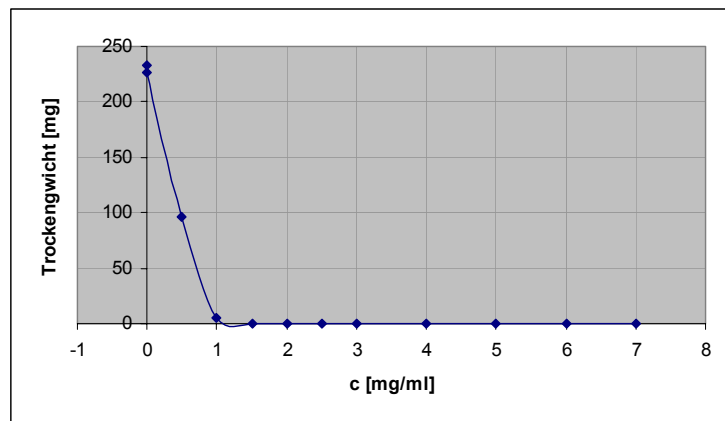
Sterolpattern bei  $1,5 \mu\text{g/ml}$ :



(xxxvi) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit TeebaumölHerkunft:

Prof. Dr. Jürgen Reichling, Institut für Pharmazeutische Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Y.l.	600K	601K	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611
Teebaumöl [mg/ml]	0	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7
Trockengewicht [mg]	233	227	96	5,2	0	0	0	0	0	0	0	0

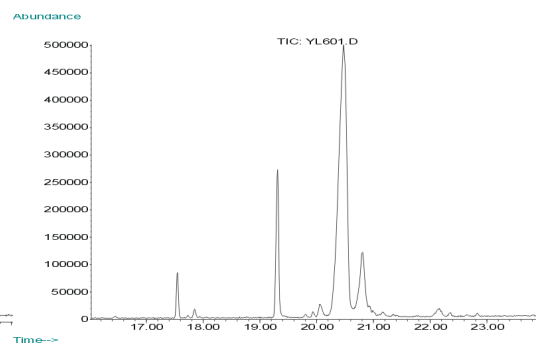
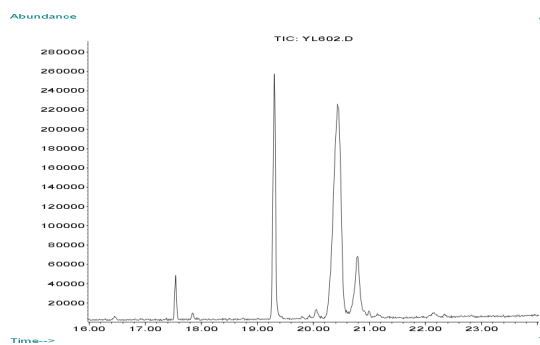


EC<sub>50</sub> ~ 0,5 mg/ml

Inhibitionstyp: kein SBI

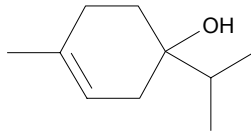
Sterolpattern bei 0,5 mg/ml:

gegenüber Kontrolle:



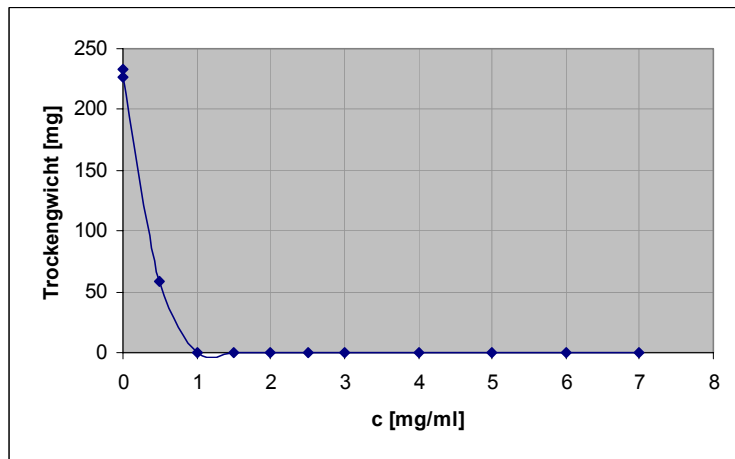
t <sub>R</sub> (min)	Compound
19,3	Cholesterol (IS)
20,5	Erg-5,7,22
20,8	Erg-5,7,22,24(28)

(xxxvii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Menthen-4-ol  
(Terpinen-4-ol)



Herkunft: siehe „Teebaumöl (xxxvi)“

Y.I.	600K	601K	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621
Menthen-4-ol [mg/ml]	0	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7
Trockengewicht [mg]	233	227	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0

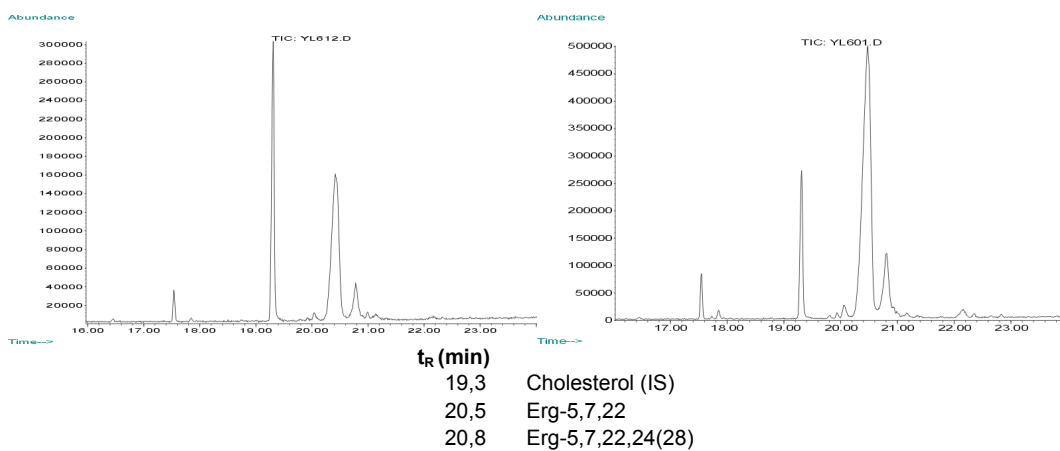


EC<sub>50</sub> ~ 0,3 mg/ml

Inhibitionstyp: kein SBI

Sterolpattern bei 0,5 mg/ml:

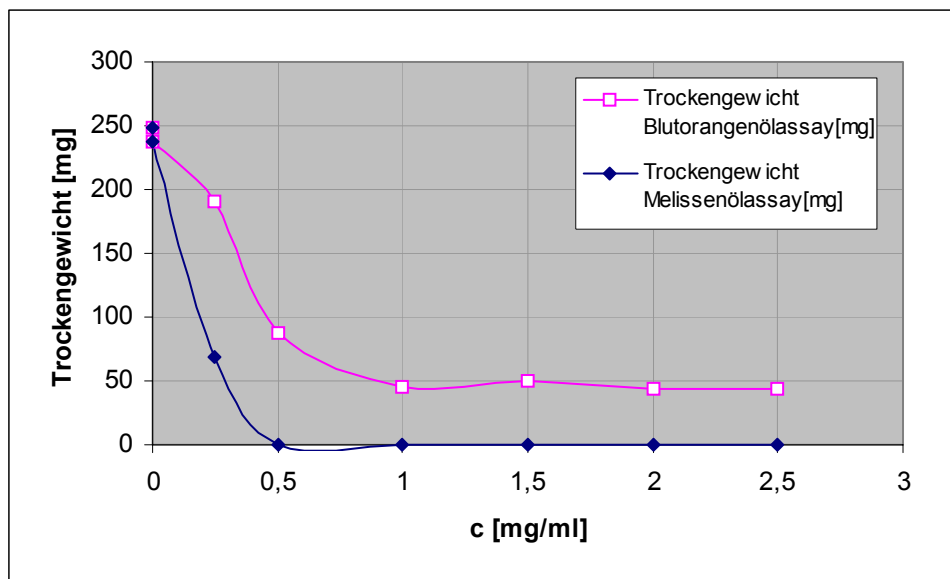
gegenüber Kontrolle:



(xxxviii) Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Melissenöl und Blutorangenöl

Herkunft: Melissenöl: Linden-Apotheke, 82024 Taufkirchen  
Blutorangen-Duftöl: Fa. Bergland, 87751 Heimertingen

g/ml]	0	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Y.I.	634K	635K	636	637	638	639	640	641
Trockengewicht Melissenölassay [mg]	249	237	68	0	0	0	0	0
Y.I.	634K	635K	642	643	644	645	646	647
Trockengewicht Blutorangenölassay [mg]	249	237	191	88	45	50	43	44



Inkubation erfolgte in Schüttelkultur

	Melissenöl	Blutorangenöl
EC <sub>50</sub>	~0,2 mg/ml (0,02%)	~0,4 mg/ml (0,04%)
Inhibitionstyp	Kein SBI	Kein SBI
Sterolpattern	Abundance TIC: YL636.D  Time-->	Abundance TIC: YL643.D  Time-->
bei 0,025% (Melissenöl) bzw. 0,05% (Blutorangenöl)		
t <sub>R</sub> (min)	19,3 Cholesterol (IS) 20,5 Erg-5,7,22 20,8 Erg-5,7,22,24(28)	
Bemerkungen		Bei der Aufarbeitung und SPE wurden auch Phytosterole aus dem Blutorangenöl extrahiert, die das eigentliche Muster verfälschten.

*(xxxix) Inkubation von Yarrowia lipolytica mit „Parfum“*

Die nachfolgenden Parfums wurden direkt dem Nährmedium zugegeben in den Mengen 10 µl, 20 µl, 40 µl, 60 µl und 80 µl, entsprechend dem auf das Gesamtvolumen bezogenen Anteil von 0,025%, ..... 0,2%. Durch Zugabe von Ethanol ad 80 µl wurde in allen Ansätzen ein Gesamtethanolgehalt von 0,2% eingestellt.

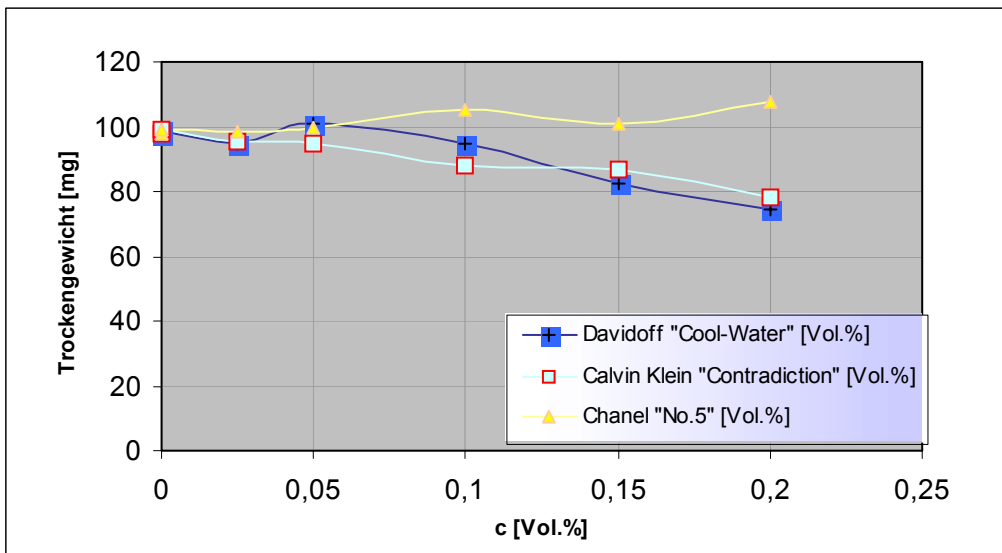
Y.I.	690K	691K	692	693	694	695	696
<b>Davidoff "Cool-Water" [Vol.%]</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
Trockengewicht [mg]	98	99,2	95	101	95	82	74

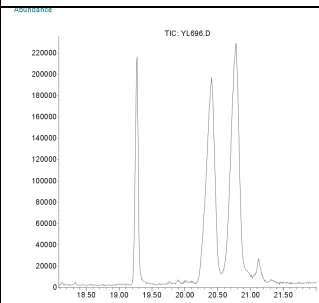
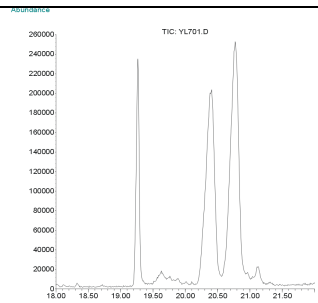
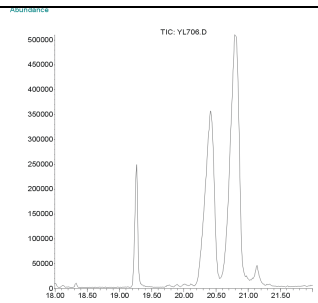
  

Y.I.	690K	691K	697	698	699	700	701
<b>Calvin Klein "Contradiction" [Vol.%]</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
Trockengewicht [mg]	98	99,2	95,1	94,9	88	87	78

Y.I.	690K	691K	702	703	704	705	706
<b>Chanel "No.5" [Vol.%]</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
Trockengewicht [mg]	98	99,2	98,6	99,7	105	101	108



	<b>Cool-Water</b>	<b>Contradiction</b>	<b>No.5</b>
EC <sub>50</sub>	> 0,2 Vol.-%	> 0,2% Vol.-%	Keine Reduktion feststellbar
Inhibitionstyp	Kein SBI	Kein SBI	Kein SBI
Sterolpattern bei 0,2 %			

t <sub>R</sub> (min)		
19,3	Cholesterol (IS)	
20,4	Erg-5,7,22	Ergo.
20,8	Erg-5,7,22,24(28)	

## 7 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> E. Gerard, *J. Pharm. Chim.* **1895**, 1, 601
- <sup>2</sup> L.W. Parks, *Crit. Rev. Microbiol.* **1978**, 6, 301
- <sup>3</sup> L.W. Parks, J.H. Crowley, F.W. Leak, S.J. Smith, M.E. Tomeo, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 34, 399
- <sup>4</sup> B.G. Adams, L.W. Parks, *J. Cell. Physiol.* **1967**, 70, 161
- <sup>5</sup> W.R. Nes; in *Isopentenoids in Plants: Biochemistry and Function*, (Hrsg.: W.D. Nes, G. Fuller, L. Tsai), **1984**, S. 325, Dekker, New York
- <sup>6</sup> E.I. Mercer, *Prog. Lipid. Res.*, **1993**, 32, 357
- <sup>7</sup> R.S. Burden, D.T. Cooke, G.A. Carter, *Phytochemistry* **1989**, 28, 1791
- <sup>8</sup> W.R. Nes in *Isopentenoids in Plants: Biochemistry and Function* (Hrsg.: W.D. Nes, G. Fuller, L. Tsai), **1984**, S. 433, Dekker, New York
- <sup>9</sup> E. Zinser, F. Paltauf, G. Daum, *J. Bacteriol* **1993**, 175, 2853
- <sup>10</sup> E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Aufl., **2001**, S. 831, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- <sup>11</sup> D. Berg, E. Regel, H.-E. Harenberg, M. Plempel in W. Meinhof, S. Nolting, *Bifonazol: Therapie von Dermatomykosen* **1984**, S. 17, Fachbuch-Verlagsges., Erlangen
- <sup>12</sup> R.T. Lorenz, W.M. Casey, L.W. Parks, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 6169
- <sup>13</sup> J.A. Urbina, S. Pekerar, H. Le, J. Patterson, B. Montez, E. Oldfield, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1238, 163
- <sup>14</sup> W.D. Nes, G.G. Janssen, F.G. Crumley, M. Kalinowska, T. Akihisa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 724
- <sup>15</sup> M. Ramgopal, K. Bloch, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, 80, 712
- <sup>16</sup> W.J. Pinto, R. Lozano, B.C. Sekula, W.R. Nes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 112, 47
- <sup>17</sup> R. Schneiter, B. Brügger, R. Sandhoff, G. Zellnig, A. Leber, M. Lampl, K. Athenstaedt, C. Hrastnik, S. Eder, G. Daum, F. Paltauf, F.T. Wieland, S.D. Kohlwein, *J. Cell Biol.* **1999**, 146, 741
- <sup>18</sup> A. Meister, C.W. Chiu, K.O. Henckel, *Lebensmittelchemie* **1999**, 53, 57
- <sup>19</sup> K.E. Bloch, *Crit. Rev. Biochem.* **1983**, 14, 47
- <sup>20</sup> L.J. Goad, T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, 1. Aufl., **1997**, S. 24, Chapman & Hall, London
- <sup>21</sup> R.J. Rodriguez, C. Low, C.D.K. Bottema, L.W. Parks, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 837, 336
- <sup>22</sup> N.D. Lees, M. Bard, D.R. Kirsch in E.J. Parish, W.D. Nes: *Biochemistry and function of sterols*, **1997**, S. 85, CRC Press Inc., New York
- <sup>23</sup> W.R. Nes, I.C. Dhanuka, W.J. Pinto, *Lipids* **1986**, 21, 102
- <sup>24</sup> Y. Yoshida, Y. Aoyama, *Biol. Chem.* **1984**, 259, 1655
- <sup>25</sup> W.D. Nes, D. Guo, W. Zhou, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 342, 68
- <sup>26</sup> R. Leber, K. Landl, E. Zinser, H. Ahorn, A. Spok, S.D. Kohlwein, F. Turnowsky, G. Daum, *Mol. Biol. Cell.* **1998**, 9, 375
- <sup>27</sup> W.D. Nes, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1529, 63
- <sup>28</sup> S.R. Parker, W.D. Nes, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1992**, 497, 111
- <sup>29</sup> P.F. Watson, M.E. Rose, S.W. Ellis, H. England, S.L. Kelley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 164, 1170
- <sup>30</sup> R.W. Topham, J.L. Gaylor, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 2319



- <sup>31</sup> T. Nishino, S. Hata, S. Taketani, Y. Yabusaki, H. Katsuki, *J. Biochem.* **1981**, *89*, 1391
- <sup>32</sup> D. Guo, A.T. Mangla, W. Zhou, M. Lopez, Z. Jia, S.D. Nichols, W.D. Nes in R. Bittman: *Subcellular Biochemistry Volume 28: Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*, **1997**, S. 89, Plenum Press, New York
- <sup>33</sup> R. Tiemann, D. Berg, W. Krämer, R. Pontzen, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **1997**, *50*, 29
- <sup>34</sup> N.S. Ryder in D. Berg, M. Plempel: *Sterol Biosynthesis Inhibitors*, **1988**, S. 151, EllisHorwood Ltd., Chichester (England)
- <sup>35</sup> F. Bracher in: *Lokale Pilzinfektionen*, Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer **2001**, Heft 62, S. 47
- <sup>36</sup> I. Abe, J.C. Tomesch, S. Wattanasin, G.D. Prestwich, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 279
- <sup>37</sup> P.G. Hartman, D. Sanglard, *Curr. Pharm. Design* **1997**, *3*, 177
- <sup>38</sup> H. Vanden Bosche in D. Berg, M. Plempel: *Sterol Biosynthesis Inhibitors*, **1988**, S. 79, EllisHorwood Ltd., Chichester (England)
- <sup>39</sup> T. Kato, Y. Kawase, *Agr. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 2379
- <sup>40</sup> D. Zakula, J.O. Capobianco, R.C. Goldman, *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, *39*, 261
- <sup>41</sup> H. Ji, W. Zhang, Y. Zhou, M. Zhang, J. Zhu, Y. Song, J. Lu, J. Zhu, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2493
- <sup>42</sup> E.I. Mercer in D. Berg, M. Plempel: *Sterol Biosynthesis Inhibitors*, **1988**, S. 120, EllisHorwood Ltd., Chichester (England)
- <sup>43</sup> R.I. Baloch, E.I. Mercer, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 663
- <sup>44</sup> R.I. Baloch, E.I. Mercer, T.E. Wiggins, B.C. Baldwin, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2219
- <sup>45</sup> D. Debieu, J. Bach, A. Lasseron, C. Malosse, P. Leroux, *Pestic. Sci.* **1998**, *54*, 157
- <sup>46</sup> M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 385
- <sup>47</sup> M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 605
- <sup>48</sup> T. Kuchta, C. Leka, P. Farkas, H. Bujdakova, E. Belajova, N.J. Russell, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1538
- <sup>49</sup> D. Debieu, J. Bach, M. Hougou, C. Malosse, P. Leroux, *Pest. Manag. Sci.* **2001**, *57*, 1060
- <sup>50</sup> A.P. Acuna-Johnson, A.C. Oehlschlager, A.M. Pierce, H.D. Pierce Jr., E.K. Czyzewska, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 821
- <sup>51</sup> C. Arnezeder, W.A. Hampel, *Lebensmittel- & Biotechnologie* **1991**, *5*, 217
- <sup>52</sup> L.W. Parks, C.D. Bottema, R.J. Rodriguez, T.A. Lewis, *Methods Enzymol.* **1985**, *111*, 333
- <sup>53</sup> R.A. Gonzales, L.W. Parks, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *489*, 507
- <sup>54</sup> H.-D. Belitz, W. Grosch, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Aufl., **1992**, S. 153, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York
- <sup>55</sup> W.R. Nes, *Methods Enzymol.* **1985**, *111*, 3
- <sup>56</sup> C. Arnezeder, W. Koliander, W.A. Hampel, *Anal. Chim. Acta* **1989**, *225*, 129
- <sup>57</sup> L.J. Goad, T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, 1. Aufl., **1997**, S. 149, Chapman & Hall, London
- <sup>58</sup> B. Arthighton-Skaggs, H. Jradi, T. Desai, C. Morrison, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 3332
- <sup>59</sup> L.J. Goad, T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, 1. Aufl., **1997**, S. 152, Chapman & Hall, London
- <sup>60</sup> J. Seibl, *Massenspektrometrie*, 1. Aufl., **1970**, S. 104, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M.
- <sup>61</sup> Graphik entnommen aus Schulungsmaterial der Firma Applied Biosystems zum API 2000
- <sup>62</sup> L.J. Goad, T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, 1. Aufl., **1997**, S. 197, S. 213, Chapman & Hall, London
- <sup>63</sup> W.K. Wilson, R.M. Sumpter, J.J. Warren, P.S. Rogers, B. Ruan, G.J. Schroepfer, Jr., *J. Lipid. Res.*, **1996**, *37*, 1529-1555

- <sup>64</sup> interne Arbeitsvorschrift der Bayer AG, entnommen aus einem Brief von Dr. R. Tiemann an Prof. Bracher
- <sup>65</sup> W. Back, *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil II*, 2000, S. 100, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg
- <sup>66</sup> <http://www.hauss.de/Mikrooekologie/PagesLaborHauss/Hefepilze.html>
- <sup>67</sup> <http://boku-is.boku.ac.at/abstract/search.details?verId=5226>
- <sup>68</sup> <http://www.globalgarden.com/Chile-Heads/Archives/vol.3/5969.html>
- <sup>69</sup> [http://www.idta.de/projekte/ve\\_en037.html](http://www.idta.de/projekte/ve_en037.html)
- <sup>70</sup> B.N. Ziogas, G. Oesterhelt, P. Masner, C.C. Steel, R. Furter, *Pestic. Biochem. Phys.* **1991**, 39, 74
- <sup>71</sup> J.C. Burbiel, *2-Azabicyclo[5.3.0]decane und weitere Azasteroidanaloga als neuartige Antimykotika*, Dissertationsschrift, München, **2001**

## Lebenslauf

### *Personalien:*

Jörg Mathias Müller

geboren am 02.10.1972 in München

verheiratet mit Petra Müller, geb. Nowak

### *Schulbildung:*

1979 – 1983

Grundschule Unterhaching

1983 – 1992

Gymnasium Unterhaching

Juli 1992

Abitur

in den Fächern Chemie (LK), Englisch (LK),  
Biologie , Geographie

### *Zivildienst:*

Nov.1992 – Jan.1994

Zivildienst in der ev.-luth. Kirchengemeinde Unterhaching

### *Studium und Ausbildung:*

Mai 1994 – Juni 1998

Studium der Lebensmittelchemie an der LMU München

April 1996: Vorexamen

Juni 1998: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Juli 1998 – Jan. 2002

Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. Dr. F. Bracher am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der LMU München

Seit Feb. 2002

Praktische Ausbildung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker mit 2. Staatsprüfung am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim