

**Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen
mariner Habitats und
Abbaureaktionen an Simocyclinon D8**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marko Gentsch

aus Hamburg

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. H. Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von Mai 2004 bis Juli 2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Isolierung, Charakterisierung und chemischen Derivatisierung von Naturstoffen. Viele der beschriebenen Verbindungen zeigen eine einzigartige biologische Aktivität, deren Ursache in einem komplexem Zusammenspiel zwischen der chemischen Struktur des Wirkstoffes und ihrem molekularen Angriffsziel zu finden ist.

Endophytische Pilze mariner Habitats stellen eine besonders viel versprechende Quelle für bioaktive Naturstoffe dar. In einem BMBF-Forschungsverbund wurde das aktive Prinzip ausgewählter Extrakte dieser Organismen bestimmt. Auf diese Weise gelang es, 13 zum Teil neue Sekundärstoffe zu isolieren, in ihrer Struktur aufzuklären und in Hinsicht auf ihre antibakteriellen, fungiziden, insektiziden, herbiziden und cytotoxischen Eigenschaften zu charakterisieren. Das Tetramsäurederivat CJ-21,058 aus *Phoma* sp. konnte mit Hilfe einer Kombination aus Tief-Temperatur-NMR-Experimenten und CD-Spektroskopie erstmalig in seiner absoluten Konfiguration bestimmt werden und zeigte ein für diese Verbindungsklasse ungewöhnlich breites Wirkspektrum. *Beauveria* sp. diente als Beispiel, um die Abhängigkeit der verwendeten Kultivierungsbedingungen auf die Bildung von fünf verschiedenen Pentaketiden zu untersuchen. Ausgehend von den Strukturen dieser Pentaketide konnte ein gemeinsamer PKS-Vorläufer vorgeschlagen werden. Das aus *Nodulisporium* sp. erhaltene 7-O-Desmethylazamonosporascon stellt einen neuen Sekundärstoff dar, der zusammen mit fünf weiteren, ebenfalls neuen 7-O-Desmethyl-Sauerstoff-Analoga gebildet wurde, wie LC-MS Untersuchungen zeigten.

Der Gyrase-Inhibitor Simicyclinon D8 wurde einem chemischen Abbau unterzogen. Hintergrund dieser Arbeiten waren Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung, um die Selektivität dieser Wirkung mit einzelnen Strukturteilen in Verbindung zu bringen. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung der O-Acylbindung zur D-Olivose-Einheit unter Verwendung von methanolischer Ammoniaklösung als Base selektiv möglich ist. Für das hierdurch erzeugte Aminocoumarinderivat, welches noch die Decatetraendicarbonsäure enthält, konnte keine signifikante Hemmung der Gyrase nachgewiesen werden.

Abstract

This thesis deals with the isolation, characterization und chemical derivatization of natural products. Most of the described metabolites show a high potential biological activity which is the result of a complex interaction between the chemical structure of the agent and its molecular target.

A very promising source for bioactive natural products is presented by the unexplored area of endophytic fungi. According to a BMBF-research association, the active principles of selected extracts from endophytic fungi could be determined. By this approach 13 partly new secondary metabolites could be isolated, structure elucidated and tested for antibacterial, antifungal, phytotoxic and cytotoxic properties. The absolute configuration of the tetramic acid derivative CJ-21,058, isolated from *Phoma sp.*, could be assigned by a combination of deep temperature NMR-experiments and CD-spectroscopy for the first time. In contrast to other tetramic acids the isolated compound showed an unusual broad spectrum of biological activities. The fermentation of *Beauveria sp.* exemplified the influence of different cultivation conditions on secondary metabolism. Five Pentaketids, biosynthetically derived from a hypothetical common precursor, could be identified. 7-*O*-desmethylazamonosporascone from *Nodulisporium sp.* was isolated for the first time and is produced beside five also new oxygen-analogues of this compound deduced by LC-MS.

Chemical degradation of simocyclinone D8, an inhibitor of bacterial gyrase, has been carried out in order to explore structure activity relationships of this modular arranged natural product. For this purpose a selective cleavage of the *O*-acylic linkage at the sugar moiety D-olivose was established. Application of a methanolic ammonia solution as base led to the desired molecule fragments. The resulting aminocoumarine derivative, which still contains the decatetraene dicarboxylic acid moiety, showed no significant inhibition of gyrase.

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil

1. Einleitung	1
1.1 Sekundärstoffe aus Pilzen	1
1.2 Die Biosynthese der pilzlichen Sekundärstoffe	3
1.3 Dereplikation.....	11
1.4 Aufgabenstellung	14
2. Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen	15
2.1 Das BMBF-Verbundprojekt.....	15
2.2 Stammauswahl	19
3. Sekundärstoffe aus Braunschweiger Stämmen	21
3.1 Stamm BS 6612	21
3.1.1 Screening und Kultivierung	21
3.1.2 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe	21
3.1.3 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe	22
Aphidicolin (25).....	22
3.1.4 Biosynthese von Aphidicolin (25).....	23
3.1.5 Biologische Aktivität von Aphidicolin (25).....	26
3.2 Pleospora sp. Stamm BS 6631	27
3.2.1 Screening und Kultivierung	27
3.2.1 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe	27
3.2.2 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe	28
Stemphol (28).....	28
3.1.4 Biosynthese von Stemphol (28)	29
3.1.5 Biologische Aktivität von Stemphol (28).....	30
3.3 Beauveria sp. Stamm BS 6750	31
3.3.1 Vorangegangene Arbeiten.....	31
3.3.2 Kultivierung und Aufarbeitung	31
3.3.3 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus P-Kolben (Bio+).....	34
Cephalosporolid G (46).....	34
Cephalosporolid C (45).....	38
Decarestrictin C ₃ (49) und C ₄ (30).....	38
Rebeccamycin (31)	42
Aphidicolin (25).....	43
Cerebrosid B (32).....	43
3.3.5 Zur Biosynthese der isolierten Pentaketide.....	45
3.3.6 Zur biologischen Aktivität der Pentaketide.....	48
3.3.8 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Sekundärstoffspektrum	49

3.4	<i>Phoma sp.</i> Stamm BS 6771	50
3.4.1	Chemisches und biologisches Screening.....	50
3.4.2	Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe.....	51
3.4.3	Strukturaufklärung der Sekundärstoffe	51
	Tetramsäurederivat CJ-21,058 (50)	51
3.4.4	Die Substanzklasse der Setin-Antibiotika.....	56
4.	Sekundärstoffe aus Göttinger Stämmen.....	67
4.1	<i>Chaetomium sp.</i> Stamm Gö 212.....	68
4.1.1	Screening und Kultivierung	68
4.1.2	Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe.....	68
4.1.3	Charakterisierung der Sekundärstoffe.....	69
	Koji-Säure (59)	69
4.1.4	Relevanz des isolierten Sekundärstoffes.....	69
4.2	<i>Nodulisporium sp.</i> Stamm Gö 223	72
4.2.1	Screening, Kultivierung und Ausarbeitung.....	72
4.2.2	Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe.....	72
4.2.3	Charakterisierung der Sekundärstoffe.....	73
	7- <i>O</i> -Desmethyl-azamonosporascon (72)	73
	5-Carboxymellein (60).....	76
4.2.4	Weitere Hexaketide aus <i>Nodulisporium sp.</i> Gö 223	78
4.2.5	Biologische Aktivität und Biosynthese der Hexaketide.....	79
4.2.6	Biologische Aktivität und Biosynthese von 5-Carboxymellein (60).....	81
5.	Häufig isolierte Metabolite.....	83
6.	Diskussion der Sekundärstoffproduktion endophytischer Pilze	87
7.	Abbaureaktionen an Simocyclinon D8	91
7.1	Die Substanzklasse der Simocyclinone.....	91
7.2	Die Biosynthese der Simocyclinone	92
7.3	Zur biologischen Aktivität der Simocyclinone	94
7.4	Abbaureaktionen	97
7.4.1	Vorversuche	98
7.4.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	101
7.4.3	Optimierung der Trennung.....	104
7.4.4	Charakterisierung der Spaltprodukte.....	105
7.4.5	Zur biologischen Aktivität der Spaltprodukte.....	106
7.5	Diskussion der Testergebnisse	107
8.	Zusammenfassung der Ergebnisse	109

B. Experimenteller Teil

9.	Instrumentelle Analytik	113
10.	Chromatographie	114
11.	Mikrobiologische Methoden und Geräte.....	118
12.	Kultivierung, Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe	120
12.1	Stamm BS 6612.....	120
12.2	<i>Pleospora sp.</i> Stamm BS 6631	121
12.3	<i>Beauveria sp.</i> Stamm BS 6750.....	121
12.4	<i>Phoma sp.</i> Stamm BS 6771	122
12.5	<i>Chaetomium sp.</i> Stamm Gö 212.....	123
12.6	<i>Nodulisporium sp.</i> Stamm Gö 223	124
13.	Derivatisierungen	126
14.	Charakterisierung der Sekundärstoffe.....	128
14.1	Stamm BS 6612.....	128
14.2	<i>Pleospora sp.</i> Stamm BS 6631	129
14.3	<i>Beauveria sp.</i> Stamm BS 6750.....	130
14.4	<i>Phoma sp.</i> Stamm BS 6771	135
14.5	<i>Chaetomium sp.</i> Stamm Gö212.....	136
14.6	<i>Nodulisporium sp.</i> Stamm Gö223	137
15.	Abbaureaktionen an Simocyclinon D8	142
15.1	Vorversuche	142
15.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	143
15.3	Charakterisierung der Spaltprodukte.....	145
C.	Literaturverzeichnis	148

A. Theoretischer Teil

1. Einleitung

1.1 Sekundärstoffe aus Pilzen

Pilze sind wie Bakterien und Pflanzen dazu in der Lage, ausgehend vom Primärstoffwechsel, Substanzen zu bilden, die für das Wachstum und Überleben der Spezies nicht von essentieller Bedeutung sind. Diese Sekundärstoffe haben sich durch einen evolutionären Zwang entwickelt und ermöglichen den Produzenten die Interaktion mit seiner Umwelt¹. Auf welche Weise dies geschieht, ist von ebenso großer Vielfalt wie die strukturelle Diversität der meist niedermolekularen Substanzen oder wie das Erscheinungsbild der Pilze selbst. Das Spektrum der produzierten Sekundärstoffe ist charakteristisch für eine einzelne Spezies oder zumindest eine kleine Gruppe von eng verwandten Pilzen². Es entsteht ein molekularer Fingerabdruck, der zudem von der Stufe der morphologischen Differenzierung des Pilzes abhängig ist und für die taxonomische Bestimmung genutzt werden kann. Die zuerst entdeckte Funktion der Sekundärstoffe liegt in der Abwehr konkurrierender Organismen bei der Nutzung von Lebensraum und Nährstoffen. Durch die Produktion von herbiziden, insektiziden, fungiziden oder antibakteriellen Stoffen erlangt der Produzent einen entscheidenden Vorteil, der sowohl den metabolischen als auch genetischen Aufwand für die Bereitstellung der Substanz überwiegt. Andere Sekundärstoffe zeigen hingegen eine wesentlich subtilere biologische Aktivität. Ähnlich den Insekten und Säugetieren kommunizieren Pilze über chemische Botenstoffe (Pheromone) und erkennen auf diese Weise andere Individuen der gleichen Spezies³.

Während die meisten Pilze als Destruenten in abgestorbenem organischen Material leben und so einen wichtigen Beitrag zur Humusbildung leisten, bevorzugen es einige Gattungen in Gemeinschaft mit anderen Organismen zu leben. Diese Symbiose kann so weit gehen, dass z.B. bei endophytischen Pilzen das Wachstum und die Fortpflanzung im Inneren einer Pflanze ablaufen⁴. Darüber, ob die Pflanze einen Nutzen oder Schaden von diesem Zusammenleben hat, entscheidet letztlich die Sekundärstoffproduktion des Pilzes. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass pilzliche Cyclodextrine bei Pflanzen die Produktion eigener Pflanzenschutzmittel (Phytoalexine) steigern und somit eine gemeinsame Koexistenz von Wirt und Parasit fördern (Mutualismus)⁵. Für den Befall von Pflanzen durch pathogene Pilze ist bekannt, dass diese erst durch wirtsspezifische Toxine dazu in der Lage sind die

wachsgeschützte Oberfläche der Pflanze zu durchdringen⁶. Anschließend wird durch das Einwirken von nekrotischen Substanzen und Verdauungsenzymen das Gewebe zersetzt⁷. Andere pilzliche Sekundärstoffe haben einen verheerenden Einfluss auf höhere Lebewesen. Beispielsweise kann das vom phytopathogenen Pilz *Aspergillus flavus* produzierte Mykotoxin Aflatoxin Nekrosen und Leberkarzinome auslösen⁸. Darüber, welche Funktion diese Gifte für die Pilze besitzen, wird heute, zumindest im Falle des Aflatoxins, noch immer spekuliert.

Pilzliche Sekundärstoffe beeinflussen ebenfalls das Leben der Menschen. So wurde bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts die antibakterielle Wirkung der β -Lactame entdeckt und seitdem ausgiebig genutzt und zu synthetischen Präparaten wie z. B. dem Ampicillin (**1**) weiterentwickelt⁹. Lovastatin diente als Inspiration für die Entwicklung der synthetischen Statine, die als HMG-CoA-Inhibitoren den Cholesterinspiegel senken und unter anderem in der Therapie von Fettstoffwechselstörungen Verwendung finden¹⁰. Ein bekannter Vertreter dieser Therapeutika ist *Lipobay*[®] (**2**), das jedoch aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen 2001 vom Markt genommen wurde¹¹. In diesem Janusgesicht liegt ein weiteres Charakteristikum der pilzlichen Sekundärstoffe, denn viele weisen neben einer therapeutisch nutzbaren ebenfalls eine deutlich toxische Wirkung auf. So führten Ergot-Alkaloide im Mittelalter zu flächendeckenden Vergiftungen durch den Verzehr von Getreide, welches mit dem Mutterkorn (*Secale cornutum*) infiziert war¹². Dabei ist die Grenze zwischen Gift und Heilmittel häufig nur marginal. Eine kleine Änderung der Dosis oder eine einfache chemische Modifikation kann die Wirkung einer Substanz entscheidend verändern. So führte z.B. die Einführung eines Bromatoms in das Ergolin-Grundgerüst des Mutterkorn-Peptidalkaloids Ergocryptin zu dem in der Parkinson-Therapie eingesetzten Bromocriptin (**3**)¹³.

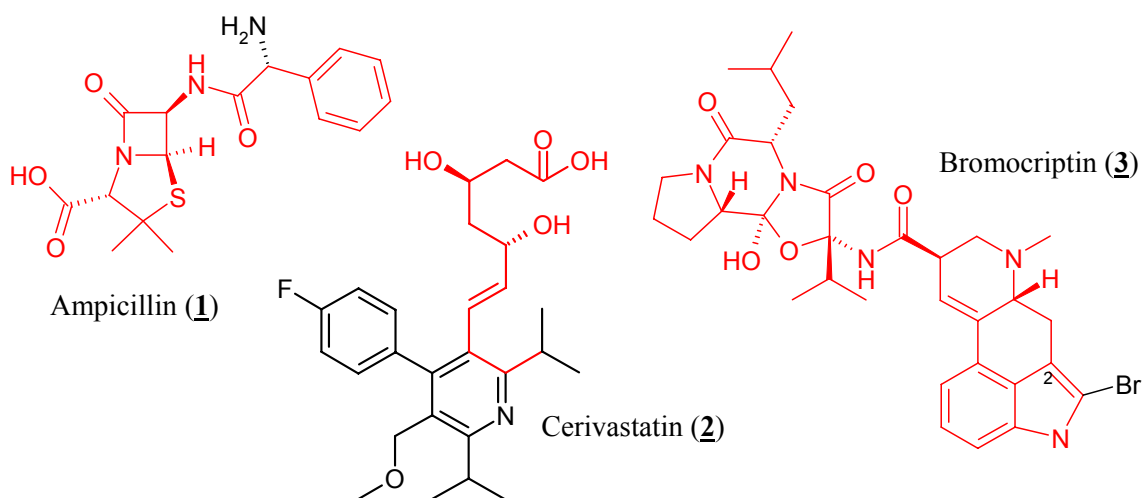


Abbildung 1: Von pilzlichen Sekundärstoffen abgeleitete Therapeutika. Die mit den Naturstoffen identischen Strukturelemente sind rot gezeichnet.

Die Suche nach neuen pilzlichen Naturstoffen hat allein zwischen den Jahren 1993 und 2001 zu über 1500 Verbindungen geführt, von denen ca. die Hälfte eine biologische Aktivität aufweist¹⁴. Doch zeichnen sich diese Verbindungen nicht nur durch ihre physiologischen Wirkungen, sondern ebenfalls durch zum Teil einzigartige Strukturen aus. Das wissenschaftliche Interesse am Sekundärstoffwechsel der Pilze ist daher ungebrochen. Besonders in den letzten Jahren zeigte sich durch die Weiterentwicklung der molekularen Biologie, Bioinformatik und Genetik, dass das biosynthetische Potential der Pilze längst noch nicht vollständig erfasst worden ist¹⁵. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass bisher nur ein Bruchteil der potentiellen Sekundärstoffe entdeckt wurde.

1.2 Die Biosynthese der pilzlichen Sekundärstoffe

Neben der Erkennung der physiologischen Aktivität ist es ebenfalls von Nutzen, Kenntnisse über die Biogenese von Sekundärstoffen zu erhalten. Viele durch die Biosyntheseforschung entdeckte Reaktionen verlaufen aufgrund der Beteiligung von Enzymen sehr komplex und zudem hoch selektiv. Vielerorts konnten die Prinzipien dieser Reaktionen auf die chemische Synthese im Reagenzglas übertragen werden¹⁶. Eine bewährte Möglichkeit die Biosynthese zu entschlüsseln ist die Zugabe von isopenmarkierten Grundbausteinen des Primärstoffwechsels zu dem für die Kultivierung des Mikroorganismus verwendeten Nährmedium¹⁷. Durch die Analyse der aus diesen Fermentationen gewonnenen Naturstoffe können Isopenmarkierungen wiedergefunden und damit eine Beteiligung der gefütterten Stoffe an der Biosynthese nachgewiesen werden. Ein neuerer Ansatz liegt in der Untersuchung des Genoms der Mikroorganismen¹⁸. Durch intensive Forschung ist es heute möglich, ausgehend von der DNA-Sequenz vorherzusagen, welche Enzyme für die Biosynthese genutzt werden und wie die chemische Struktur des von ihnen erzeugten Naturstoffs möglicherweise aussieht. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die für diese Enzyme codierenden Gene bei Pilzen in einem zusammenhängenden Cluster auf der DNA lokalisiert sind¹⁹. Häufig befindet sich in diesen Abschnitten ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch die Produktion des jeweiligen Sekundärstoffs steuert²⁰. Das durch diesen regulatorischen Abschnitt codierte Protein besteht in vielen Fällen aus einem binuklearen $Zn(II)_2Cys_6$ -Cluster, der ausschließlich in Pilzen zu finden ist. Typisch für diese DNA-bindenden Proteine ist, dass diese an palindromische Sequenzen in den Promotorabschnitten des Biosynthese-Genclusters binden und so die Expression der benötigten Enzyme auslösen.

Die jahrzehntelange Forschung hat ein im ersten Moment erstaunliches Ergebnis hervorgebracht. Trotz der enormen strukturellen Vielfalt können die Sekundärstoffe der Pilze aufgrund ihrer Biosynthese in vier Gruppen eingeteilt werden: Polyketide, Peptide, Terpene und Alkaloide²¹. Einige Naturstoffe werden zudem über eine Kombination dieser vier grundsätzlichen Biosynthesewege gebildet, wodurch die Diversität dieser Verbindungen unerschöpflich zu sein scheint. Im Folgenden werden die wesentlichen Prinzipien der zu diesen Substanzklassen führenden Stoffwechselwege vorgestellt, sowie einige für die Biosyntheseforschung relevante Details erläutert.

Polyketide:

Die Polyketide stellen den größten Teil der pilzlichen Metaboliten. Sie werden über eine Polyketidsynthase (PKS) vom Typ-I gebildet, einem multifunktionalen Enzym, das ähnlich wie die Fettsäure-Synthase der Eukaryonten mehreren funktionellen Untereinheiten (Domänen) enthält²². Beide Enzyme kondensieren kurzkettige Carbonsäuren wie Essigsäure und Malonsäure (**4**) in Form der Coenzym A (CoA)-Ester zu Kohlenstoffketten unterschiedlicher Länge. Während bei der Biosynthese der Fettsäuren eine vollständige Reduktion der β -Kohlenstoffatome erfolgt, ist diese bei Polyketiden optional. Für die Funktion der pilzlichen PKS sind daher nur drei Domänen essentiell: Das Acyl-Carrierprotein (ACP), die Acyltransferase (AT) und die β -Ketoacyl-Synthase (KS). Durch die AT wird zunächst ein Malonyl-CoA auf eine freie Thiol-Gruppe am Phosphopantetheinarm des ACPs und ein Acetyl-CoA an ein Cystein im aktiven Zentrum der KS übertragen. Durch die Aktivität der KS erfolgt eine Claisen-Kondensation des Acetylrests mit dem C-2-Atom der Malonyleinheit, wobei dieses decarboxyliert wird. Die aus der Fettsäure-Biosynthese bekannten und für die Reduktion der β -Ketoacyl-Verbindung verantwortlichen Domänen Keto-Reduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoyl-Reduktase (ER) sind nicht in allen PKS-Enzymen der Pilze enthalten. Ein Großteil der direkten Produkte der pilzlichen PKS-Enzyme zeigt somit eine hohe Sauerstoff-Substitution. Für die Verlängerung um eine weitere Einheit wird das kondensierte Produkt durch die AT wiederum auf die KS übertragen und ein neuer Reaktionszyclus wird durch die Bindung eines weiteren Malonyl-CoAs an das ACP eingeleitet. Häufig findet man in den für die PKS codierenden DNA-Abschnitt ebenfalls weitere Gene. Methyltransferasen (MT) sind für die Methylierung des zum Thioester α -ständigen Kohlenstoffatoms verantwortlich. Cyclasen (CYC) katalysieren den Ringschluss der vollständigen Kette, die anschließend häufig durch eine Thioesterase (TE) vom Enzym abgelöst wird.

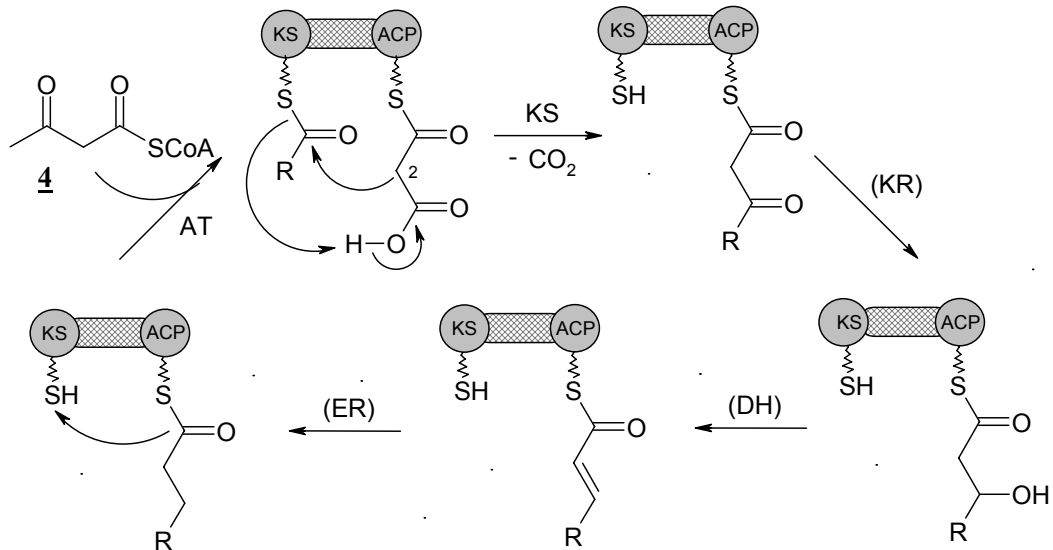


Abbildung 2: Die Reaktionssequenz der Polyketidsynthese. Die an der Reduktion des β -Kohlenstoffatoms beteiligten Enzyme KR, DH und ER werden bei jedem Durchgang nur optional genutzt (R = wachsende Kette).

Die pilzliche PKS vom Typ-I zeigt große Unterschiede zu den aus anderen Organismen bekannten Polyketidsynthasen. Die Bildung der Kette wird durch ein einzelnes multifunktionelles Enzym katalysiert indem die funktionellen Untereinheiten wiederholt (iterativ) genutzt werden. Dabei müssen nicht alle Domänen bei jedem Zyklus aktiv werden, so dass unterschiedliche Oxidationsstufen erreicht werden können. Im Kontrast hierzu ist die bakterielle PKS vom Typ-I modular aufgebaut, d. h. für jede Kettenverlängerung wird ein eigener Enzymkomplex genutzt, der zudem aus separaten Domänen besteht. Aus Bakterien und Pflanzen sind ebenfalls PKS-Enzyme der Typen II und III bekannt, die bisher bei Pilzen nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Diversität der pilzlichen Polyketide entsteht hauptsächlich durch die Anzahl der iterativen Verknüpfungen und die nachträgliche Modifikationen der durch die PKS gebildeten Kette. Während der späten Biosynthese können weitere Funktionalität eingeführt oder Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen vollzogen werden. Man findet nur selten pilzliche Polyketide, die aus einer offenen Kette oder Makrocyclen bestehen, da häufig eine Kondensation zu polycyclischen, häufig auch aromatischen Verbindungen erfolgt.

Die Faltung der Polyketidkette, die für den Ringschluss nötig ist, stellt einen weiteren Unterschied zur bakteriellen Polyketidsynthese dar. Für tetracyclischen Verbindungen gibt es zahlreiche Vertreter aus dem Reich der Pilze und Bakterien, so dass diese gut zur

Peptide:

Die Biosynthese der makromolekularen Proteine erfolgt an den Ribosomen der Zelle durch die Verknüpfung von proteinogenen Aminosäuren entsprechend der Vorlage eines RNA-Stranges. Im Gegensatz dazu bilden sich peptidische Sekundärstoffe ohne eine solche Blaupause und unter Verwendung von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren. Die hierfür verantwortlichen Nicht-Ribosomalen-Peptid-Synthasen (NRPS) sind ähnlich der PKS aus funktionellen Domänen aufgebaut²⁴. Erneut findet sich ein Phosphopanthethein-Arm, der für die Bindung der Intermediate am Peptidyl-Carrier-Protein (P) zuständig ist. Die für die Verknüpfung der Aminosäuren benötigte Aktivierung der Aminosäuren erfolgt an einer Adenylierungs-Domäne (A). Im Anschluß wird unter Beteiligung von Kondensations-Domänen (C) eine Amidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren gebildet und das fertige Peptid durch eine Thioesterase (TE) abgespalten. Für die Biosynthese der Peptide werden diese Domänen nicht iterativ genutzt, so dass hier ein modularer (vgl. PKS) Aufbau nötig ist. Die strukturelle Vielfalt der Peptide wird durch die Verwendung ungewöhnlicher Aminosäuren, wie z. B. Aminobuttersäure, und durch Variation der Kettenlängen sowie der anschließenden Prozessierung erreicht. Wie bei den Polyketiden erfolgt häufig eine Cyclisierung der NRPS-Produkte.

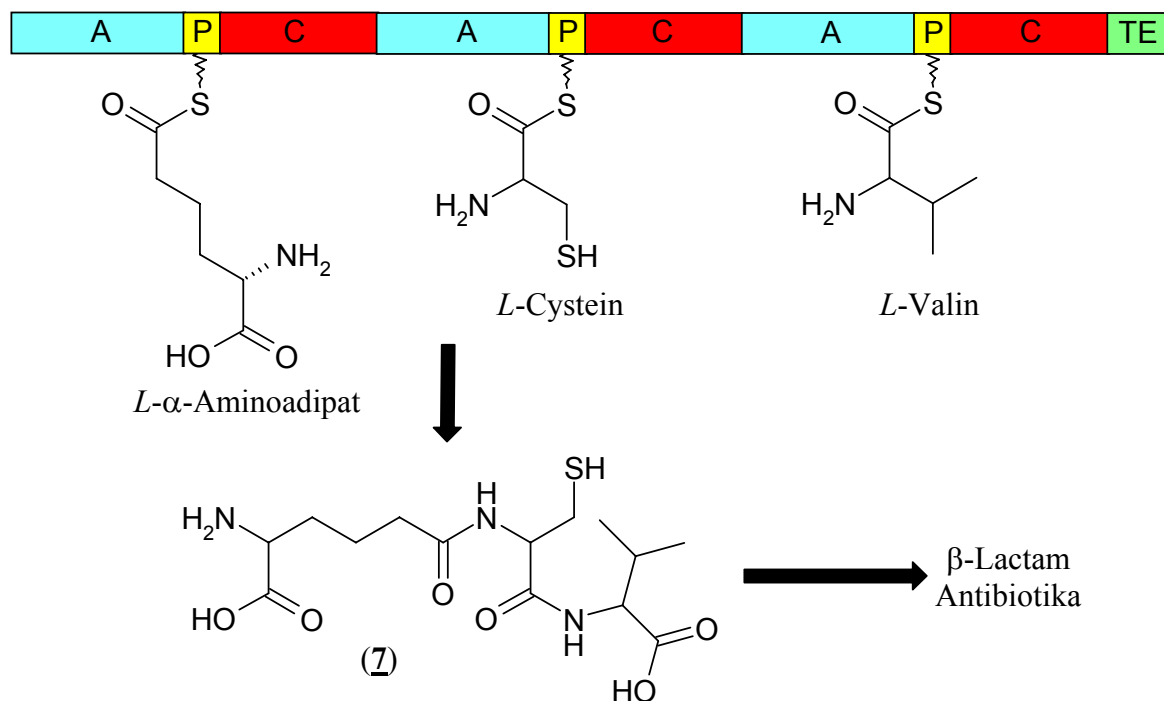


Abbildung 4: Die δ -(L-aminoädpipyl)-L-Cysteinyl-D-Valin (ACV)-Synthetase ist eine trimodulare nicht-ribosomale Peptid-Synthase und katalysiert den ersten Schritt in der β -Lactam-Biosynthese. Im Rahmen der Kondensation des Tripeptids erfolgt eine Isomerisierung des L-Valins zu D-Valin. Das durch die TE freigesetzte ACV (7) wird nun in der späteren Biosynthese zu Isopenicillin N cyclisiert²⁵.

Terpene:

Alle Terpene werden durch Verknüpfung der verzweigten und ungesättigten Isoprene (C_5 -Körper) erhalten und können anhand der Anzahl der verwendeten Einheiten klassifiziert werden²⁶. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP, **14**) bzw. dessen Isomer Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP, **13**). Durch die Kondensation von zwei Isopreneinheiten gelangt man zu Geranyl-Pyrophosphat (GPP, **8**), dem zentralen Intermediat aller Monoterpene (C_{10} -Körper). Sesquiterpene (C_{15} -Körper) leiten sich von dem nach Kopplung mit einem weiteren IPP (**13**) erhaltenen Farnesyl-Pyrophosphat (FPP, **9**) ab. Ein weiteres Molekül IPP (**13**) liefert Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP, **10**) und somit den C_{20} -Körper der Diterpene.

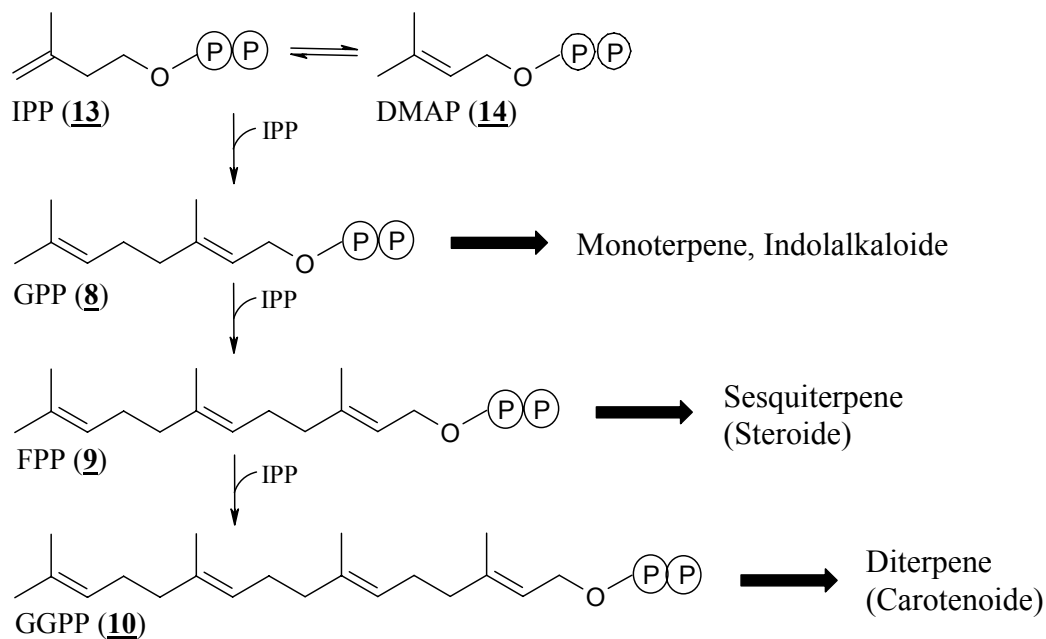


Abbildung 5: Aufbau der Terpenvorläufer aus IPP (**13**) und DMAPP (**14**) sowie die aus der Zahl der Einheiten abgeleitete Klassifizierung. In Klammern sind wichtige Endprodukte des Primärstoffwechsels angegeben.

Bedeutend für biosynthetischen Untersuchungen bei Terpenen ist, dass die hauptsächliche Biosynthese der Isopreneinheiten bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien überwiegend von Acetat ausgeht. Eine zweistufige Kondensation von drei Molekülen Acetyl-CoA führt zu β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **11**). In einer weiteren mehrstufigen Reaktion wird HMG-CoA zunächst zu Mevalonsäure (**12**) reduziert und anschließend durch Phosphorylierung und Decarboxylierung in IPP (**13**) bzw. DMAPP (**14**) überführt. Fütterungsexperimente mit $[1-^{13}C]$ Acetat liefern daher eine Markierungen an den Kohlenstoffatomen C-1 und C-3 von **13**.

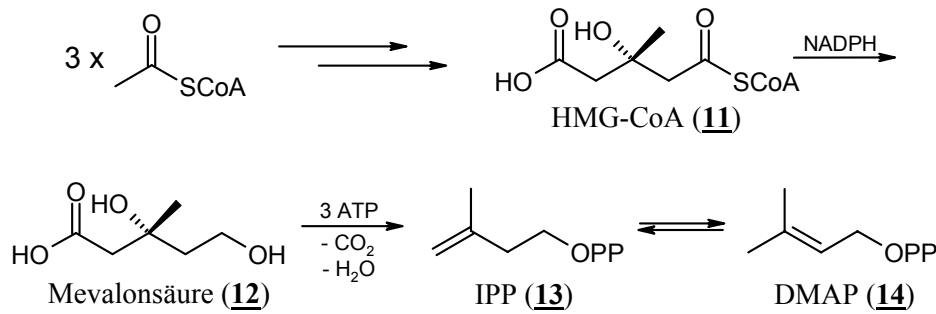


Abbildung 6: Biosynthese der Isopreneinheiten über den Mevalonatweg.

Für Pflanzen, Grünalgen und Bakterien ergibt sich jedoch ein zum Mevanolatweg alternativer Biosynthesepfad, der bisher nicht in Pilzen entdeckt werden konnte²⁷. Eine Thiaminpyrophosphat-vermittelte Kondensation von Pyruvat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat ergibt 1-Desoxy-*D*-xylulose-5-phosphat (DOX), welches durch Umlagerung und Reduktion in 2-*C*-Methyl-*D*-erythritol-4-phosphat (MEP) überführt werden kann. Nach einer weiteren Umlagerung bildet sich aus diesem IPP (**13**). Die Fütterung von [1-¹³C]Acetat ergibt durch die anaplerotische Bildung von Pyruvat eine Isotopenanreicherung des Kohlenstoffatoms an Position 4 von **13**.

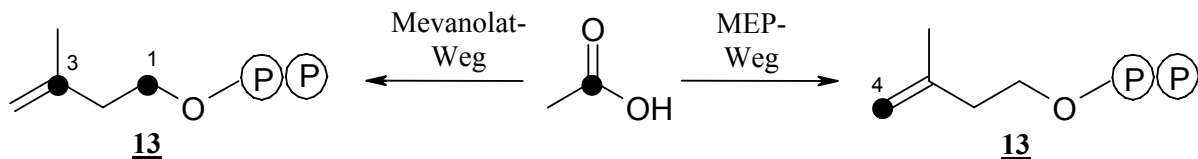


Abbildung 7: Die Position der nach Fütterung von [1-¹³C]Acetat erhaltenen Markierung in IPP (**13**) ist abhängig davon, ob der Organismus dieses bevorzugt über Mevanolat oder 2-*C*-Methyl-*D*-erythritol-4-Phosphat (MEP) bildet.

Dieser Sachverhalt kann genutzt werden um anhand der Markierungen Rückschlüsse auf die späte Biosynthese der Terpene zu ziehen. Denn die vielfältige Struktur der Terpene entsteht vor allem durch die individuelle enzymatische Cyclisierung dieser ubiquitären Intermediate. Für viele Sekundärstoffe erfolgt nicht nur ein einfacher Ringschluss der Polyprenyldiphosphate, sondern zusätzlich können auch Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts eintreten. Erneut findet nach der Cyclisierung häufig eine Modifikation des Grundgerüsts statt, indem Sauerstoffatome, Methylgruppen oder acylisch gebundene organische Reste eingeführt werden²⁸.

Alkaloide:

Obwohl die Biosynthese der Alkaloide die Stoffwechselwege der Peptide und Terpene verbindet, werden diese als eigenständige Stoffklasse angesehen. Für die Verknüpfung der Aminosäuren bzw. Peptide mit den Terpeneinheiten sowie für weitere Modifikationen werden Enzyme genutzt, die in keinem der anderen Biosynthesewege zu finden sind. Für gewöhnlich handelt es sich bei pilzlichen Alkaloiden um Indolalkaloide. Die Verknüpfung von *L*-Tryptophan (**15**) mit DMAPP (**14**) durch die Dimethylallyl-Tryptophan (DMAT)-Synthase stellt den gemeinsamen Initiationsschritt dieser Verbindungen dar. Das so erhaltene DMAT (**16**) kann nun weiteren Prenylierungen unterzogen oder mit weiteren Aminosäuren versehen werden. Während für viele Alkaloide die Biosynthese noch nicht vollständig aufgeklärt ist, liefern die Mutterkorn-Alkaloide einen guten Einblick in die für die Bildung dieser komplexen Sekundärstoffe nötigen Reaktionen. Die Bildung des Peptid-Alkaloids Ergotamin in *Clavipes purpurea* sei hier als repräsentatives Beispiel dargestellt²⁹. Ausgehend von DMAT (**16**) wird zunächst eine Methylgruppe an der α -Aminogruppe eingeführt und anschließend über mehrere Oxidationsschritte und Cyclisierungen Agroclavin (**17**) gebildet. Die anschließende Oxidation der Methylgruppe am Kohlenstoffatom in Position 8 und die Verschiebung der Doppelbindung ergibt *D*-Lysergsäure (**18**), das zentrale Intermediat aller Ergot-Alkaloide. Für die Bildung von Ergotamin (**19**) wird dieses durch eine NRPS aktiviert und mit einem von einer weiteren NRPS gebildeten cyclischen Tripeptid aus *L*-Alanin, *L*-Phenylalanin und *L*-Prolin verknüpft.

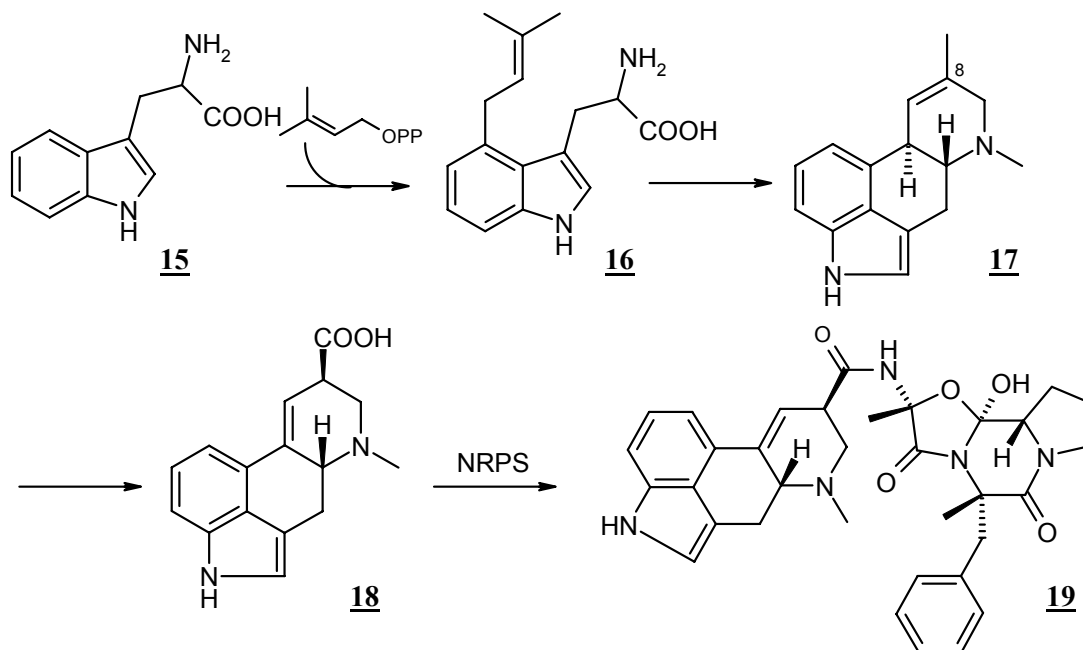


Abbildung 8: Die Biosynthese von Ergotamin (**19**) in *Claviceps purpurea*.

1.3 Dereplikation

Für die agrarchemische und pharmazeutische Industrie stellen Sekundärstoffe eine wichtige Quelle biologisch aktiver Substanzen dar, da sie als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe genutzt werden können. Im Zuge des technischen Fortschritts wurden vollautomatisierte Methoden entwickelt und so eine immer schnellere Analyse von komplexen Sekundärstoffmischungen und Reinsubstanzen ermöglicht. Das Ergebnis dieser Bemühungen spiegelt sich in den über 250000 natürlichen und semisynthetischen Substanzen wieder, die in der aktuellen Ausgabe des *Dictionary of Natural Products* verzeichnet sind. Doch trotz des immer größer werdenden Probendurchsatzes stagniert die Zahl der jährlich identifizierten Naturstoffe mit wirklich neuartigen Strukturen seit Beginn der Naturstoffforschung in den 1960er Jahren. Zwischen 1960 und 1980 wurden allein aus Streptomycceten ca. 75 neue Antibiotika pro Jahr entdeckt, bis zum Jahr 2000 hat sich diese Zahl auf bereits auf ca. 20 verringert³⁰. Durch das *High-Troughput-Screening* und standardisierte Bioassays werden tausende Extrakte von Pflanzen oder Mikroorganismen auf ihre physiologische Aktivität überprüft. Durch evolutionäre Zusammenhänge gibt es jedoch wiederkehrende Motive bei den biologisch aktiven Naturstoffen, so dass nur wenige der aktuell isolierten Substanzen über eine völlig neuartige Struktur verfügen. Aus diesem Grund ist es nötig die Strategien und Methoden für die Suche nach neuen Naturstoffen immer wieder zu hinterfragen und zu optimieren.

Die Effizienz der Naturstoffforschung kann durch eine möglichst frühzeitige Dereplikation, d. h. Identifikation bereits bekannter Verbindungen, entscheidend verbessert werden, da so der Arbeitsaufwand für die Isolierung und Strukturaufklärung von Reinsubstanzen minimiert werden kann. Das hierzu verwendete Standardverfahren ist die Analyse der Extrakte durch eine Kopplung von Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), UV-Spektrometrie (DAD) und Massenspektrometrie (MS), kurz LC-MS³¹. Auf diese Weise ist es möglich einzelne Substanzen anhand ihrer Retentionszeiten, UV-Spektren und Molmassen zu charakterisieren und mit bereits bekannten Verbindungen zu vergleichen. In der Praxis birgt dieses Verfahren jedoch viele Tücken³². Es gibt keine öffentlich zugängliche oder kommerzielle Datenbank, in der die HPLC-Chromatogramme mit den MS-Spektren der bekannten Sekundärstoffe korreliert sind, so dass ein Abgleich mit den erhaltenen Daten nur eingeschränkt möglich ist. Die an den Universitäten verwendeten internen LC-MS-Datenbanken beinhalten meist nur eine kleine Auswahl hauseigener Substanzen und haben

somit eine geringe Aussagekraft. Ein weiteres Problem liegt in den verwendeten Massenspektrometern. Meist wird durch den Einsatz von Quadrupol-Ionenfallen in den Massenspektrometern nur die nominelle, also ganzzahlige Masse der Substanzen erfasst, so dass die Suche in den kommerziellen Datenbanken zu zahlreichen Treffern führt und die Gefahr falscher Identifikation besteht. Die Ionisierung erfolgt in der Regel durch *electrospray-ionization* (ESI) oder *atmospheric pressure ionization* (API), wodurch nur eine geringe substanzcharakteristische Fragmentierung der Ionen erreicht wird³³.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten die Dereplikation mittels LC-MS zu verbessern. Die Bestimmung der akkuraten Masse einer Substanz mit *time-of-flight* (TOF)- oder *fouriertransformation-ioncyclotronresonance* (FT-ICR)-MS ermöglicht die Berechnung der Summenformeln und gestattet somit eine eindeutigere Suche in kommerziellen Datenbanken. Auch bei der Verfügbarkeit von Daten konnten erste Fortschritte erzielt werden. Von J. SMEDSGAARD et. al. wurden 474 Mycotoxine mittels LC-MS analysiert und die resultierenden Retentionszeiten, UV-Spektren, akuraten Massen und Ionenmuster veröffentlicht³⁴. Durch die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) kann der Informationsgehalt der Massenspektren so erhöht werden, dass die Dereplikation nur aufgrund massenspektrometrischer Verfahren möglich ist. Durch die Kombination von drei hintereinander geschalteten Quadrupol-Ionenfallen gelingt eine MS-Charakterisierung der Einzelkomponenten des Extrakts. Zunächst wird die gesamte Probe ionisiert und der erste Massenanalysator so eingestellt, dass nur Ionen einer definierten Masse passieren können. In der zweiten Ionenfalle wird das selektierte Ion durch einen Elektronenstoß fragmentiert und im dritten Gerät auf seine Masse analysiert. Ein Vergleich der erhaltenen Fragment-Ionen mit Referenzdaten ermöglicht in der Regel eine eindeutige Identifikation³⁵.

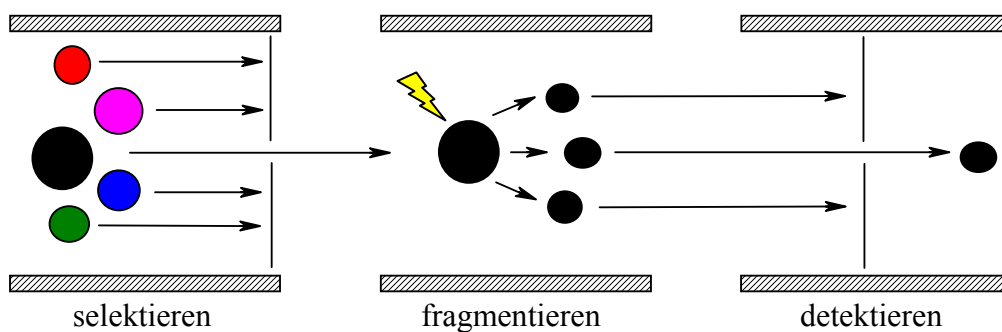


Abbildung 9: Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie durch die Kombination von drei Quadrupol-Ionenfallen.

Die neusten Entwicklungen im Bereich der Dereplikation beruhen auf einer Kombination der HPLC mit der bis dato nur für die Strukturaufklärung von Reinsubstanzen genutzten NMR-Spektroskopie (LC-NMR). Hier werden die Extrakte per HPLC fraktioniert und durch NMR-Spektroskopie eine Strukturaufklärung der Substanzen im μg -Maßstab ermöglicht³⁶. Der instrumentelle Anspruch dieses Verfahren ist jedoch sehr hoch und erfordert eine weitere Optimierung der eingesetzten HPLC- und NMR-Techniken. Im Bereich der Massenspektrometrie bietet sich durch eine Erweiterung der Tandem-MS um zusätzliche Fragmentierungsschritte (MS^n) eine Erhöhung der Aussagekraft³⁷.

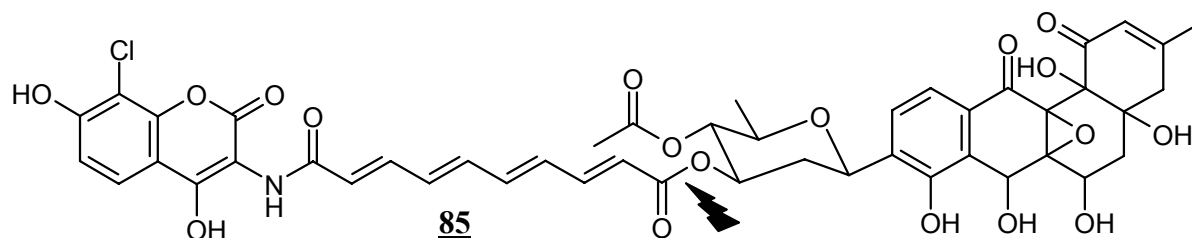
Die Fortschritte im Bereich der Genomforschung könnten in absehbarer Zeit die Dereplikation enorm erleichtern. Schon heute ist es möglich, ausgehend von einer Sequenzierung des Genoms, vorherzusagen welche Naturstoffklassen von einem Organismus produziert werden können, da die Sequenz auf Homologie zu bekannten PKS-, NRPS-, und DMATS-Genen überprüft werden kann. Falls es gelingen sollte auch die an der späten Biosynthese der Naturstoffe beteiligten Enzyme zuverlässig vorherzusagen, könnte die Aussagekraft der LC-MS-Analytik deutlich erhöht werden, da gezielt nach Biosyntheseprodukten gesucht werden könnte. Da jedoch viele dieser Enzyme, wie z.B. Methyltransferasen, Oxidoreduktasen oder Acyltransferasen, nicht exklusiv vom Sekundärstoffwechsel genutzt werden stellt dies heute ein ungelöstes Problem dar. Solange es nicht gelingt ausgehend vom Gencluster die exakte Struktur eines Naturstoffs vorherzusagen, ist eine Überprüfung der tatsächlichen Sekundärstoffproduktion und damit eine möglichst zuverlässige Dereplikation unabdingbar.

1.4 Aufgabenstellung

Den Mittelpunkt dieser Arbeit bildet die Isolierung, Derivatisierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen. Ein besonderes Augenmerk gilt hierbei der biologischen Aktivität der untersuchten Verbindungen.

Im ersten Teil sollen endophytische Pilze bearbeitet werden, die im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes aus verschiedenen marinen Habitaten isoliert wurden. Zielsetzung des Projekts ist die Suche nach neuen Sekundärstoffen mit einer für den Pflanzenschutz relevanten biologischen Aktivität. Unter Beteiligung von Arbeitskreisen der Universitäten in Braunschweig (*Prof. Dr. H.-J. AUST / PD Dr. B. SCHULZ, Institut für Mikrobiologie*), Paderborn (*Prof. Dr. K. KROHN, Organische Chemie*) und Göttingen (*Prof. Dr. A. ZEECK, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie*) sowie die chemischen Industrie (*BASF AG, Ludwigshafen*) erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit ein umfangreiches chemisches und biologisches Screening der isolierten Organismen. Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings sollten auffällige Stämmen erneut kultiviert werden, um in Frage kommende Sekundärstoffe zu isolieren. Die chemische Struktur der Metaboliten sollte mittels UV-, IR- und NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie bestimmt werden. In Zusammenarbeit mit der BASF AG war eine Überprüfung der herbiziden, insektiziden und fungiziden Eigenschaften der Reinsubstanzen geplant, während die antibakterielle Wirkung durch eigene Agardiffusionstest überprüft werden sollte.

Im zweiten Teil geht es um den bakteriellen Sekundärstoff Simocyclinon D8 (**85**), welcher über einen einzigartigen Wirkmechanismus die bakterielle Gyrase hemmt. Im Gegensatz zu anderen Gyrase-Inhibitoren blockiert **85** das *N*-terminale Ende der Untereinheit A und verhindert auf diese Weise eine Bindung des Enzyms an die DNA. Ziel der Arbeiten war es, die von der Arbeitsgruppe FIEDLER (*Institut für Mikrobiologie, Tübingen*) zur Verfügung gestellte Reinsubstanz durch den Einsatz chemischer Verfahren selektiv an der Esterbindung zwischen der Decatetraendocarbonsäure und der D-Olivoose zu spalten.



Anhand der erhaltenen Spaltprodukte sollte überprüft werden, ob die inhibitorische Wirkung von **85** auf das mit einer Decatetraendisäure verknüpfte Aminocoumarin zurückzuführen ist.

2 Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen

2.1 Das BMBF-Verbundprojekt

Der immer währende Bedarf an neuen Sekundärstoffen führte in den letzten Jahren verstärkt zur Untersuchung von Mikroorganismen aus schwer zugänglichen Quellen. Vor allem der Lebensraum Meer mit seiner enormen Biodiversität zeigte, dass er über einen schier unerschöpflichen Pool bisher unbekannter Mikroorganismen und damit potentiell neuer Sekundärstoffen verfügt³⁸. Dieses biosynthetische Potential wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) zum Anlass genommen den Forschungsschwerpunkt „Marine Naturstoffforschung“ ins Leben gerufen.

Neben der Suche, Isolierung und Charakterisierung neuer Werk- und Wirkstoffe lag das besondere Augenmerk auf der Förderung einer effektiven und nachhaltigen Verzahnung zwischen Wissenschaft und Wirtschaft. Zielsetzung des Teilprojekts „Endophytische Pilze aus Algen und Pflanzen verschiedener Meeresbiotope“ (Förder-Kennzeichen 03F0360A), aus dem ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Mikroorganismen stammt, ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz. Durch die enge Zusammenarbeit universitärer Arbeitskreise mit der chemischen Industrie sollen Leitstrukturen anhand biologischer und chemischer Screeningverfahren identifiziert und davon ausgehend kommerziell nutzbare Produkte entwickelt werden.

Endophytische Pilze stehen in vielfältiger Interaktion mit ihrem Wirt und sind daher prädestiniert für die Isolierung von Sekundärstoffen, die über eine in Hinblick auf den Pflanzenschutz relevante biologische Aktivität verfügen. Die bekanntesten Vertreter dieser Pilze stellen Nutzpflanzenschädlingen wie *Phytophthora infestans* (Kartoffelfäule)³⁹ oder *Blumeria graminis* (echter Mehltau)⁴⁰ dar. Diese pathogenen Pilze produzieren phytotoxische Sekundärstoffe, die bei genauer Kenntnis über deren Wirkung als Herbizide eingesetzt werden könnten. Doch können Pflanzen auch einen Vorteil durch das symbiotische Zusammenleben mit einem Pilz erlangen. Durch die pilzliche Sekundärstoffproduktion erhält die Wirtspflanze einen effektiven Schutz gegen Schädlinge aus dem Reich der Insekten oder gegen pathogene Pilze. Das Anwendungspotential dieser Naturstoffe und die Eignung endophytischer Pilze als Quelle liegen auf der Hand. Zudem war über die Zusammensetzung des Sekundärstoffspektrums von Endophyten aus diesem Habitat bisher nur wenig bekannt, so dass man einen hohen Anteil neuer Verbindungen erwarten konnte.

Die bei einem solchen Projekt auftretenden Fragestellungen sind interdisziplinär und erfordern ein breites Spektrum an technischen Voraussetzungen. Für die Isolierung und Kultivierung der Pilze bedarf es mikrobiologischer Kenntnisse. Die Analytik der Extrakte sowie Aufreinigung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe macht eine chemisch orientierte Herangehensweise erforderlich. Um die potentielle Wirkung der Extrakte und Reinsubstanzen zu bestimmen, wurden pflanzenpathologische Techniken angewendet. Des Weiteren ist die anfallende Zahl der zu untersuchenden Proben so groß, dass ein möglichst hoher Grad der Automatisierung für die biologischen Testierung nötig ist. Die Bewältigung dieser Aufgaben gelang durch die Kooperation von Arbeitskreisen der Universitäten in Braunschweig (*Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.-J. AUST / PD Dr. B. SCHULZ, Institut für Mikrobiologie*), Paderborn (*Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. KROHN, Organische Chemie*) und Göttingen (*Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. ZEECK, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie*) mit der chemischen Industrie, repräsentiert durch die BASF AG in Ludwigshafen. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte unter Nennung der ausführenden Projektmitglieder grob skizziert.

A) Isolierung der Pilze, taxonomische Bestimmung (*AK AUST/SCHULZ, AK ZEECK*)

Die Isolierung der endophytischen Pilze erfolgte nach einem von SCHULZ ET. AL. entwickelten Verfahren⁴¹ aus Meeresalgen und Pflanzen, die in Küsten- und Brackwasserregionen gesammelt worden waren. Die Oberfläche der Probe wurde mit Ethanol sterilisiert und anschließend in 2-5 mm große Stücke zerteilt, die als Inokulum für Agarplatten verwendet wurden. Nach mehrtägiger Kultivierung bei 25°C erfolgte die Vereinzelung der entstandenen Kolonien durch mehrfache Überimpfung und Verdünnungsaustrieche. Anschließend wurden die Pilze taxonomisch untersucht und bestimmt.

B) Kultivierung sowie biologisches/chemisches Screening der Isolate

(*AK AUST/SCHULZ, AK ZEECK*)

Die Fermentation der Isolate erfolgte in Schüttel-, Ruhe-, und Festphasenkulturen. Aufgrund des marinen Ursprungs wurde durch optionale Zugabe von Kochsalz zu den verwendeten Medien überprüft, inwiefern sich diese an ihren Lebensraum angepasst hatten. Ein erster Vergleich der biologischen Aktivitäten und chemischen Vielfalt der Extrakte in Abhängigkeit von den verwendeten Kultivierungsbedingungen wurde genutzt um diese zu optimieren.

C) Isolierung und Strukturaufklärung von Reinsubstanzen (AK KROHN, AK ZEECK)

Die im biologischen oder chemischen Screening auffälligen Extrakte wurden im Folgenden auf ihre Sekundärstoffzusammensetzung untersucht. Die Reinsubstanzen wurden durch die Kombination unterschiedlicher Trennverfahren (Schwerkraftchromatographie, HPLC etc.) gewonnen und ihre Struktur durch analytische Methoden wie HR-Massenspektrometrie, UV-, IR-, und NMR-Spektroskopie ermittelt. Das genaue Vorgehen ist den entsprechenden Unterkapiteln dieser Arbeit zu entnehmen.

D) Bestimmung der biologischen Aktivität von Extrakten und Reinsubstanzen (BASF)

Die Extrakte wurden auf ihre fungiziden Eigenschaften gegen eine Auswahl phytopathogener Pilze und bei ausreichender Menge ebenfalls auf ihre insektizide Wirkung überprüft. Um die Identifikation der aktiven Komponenten zu erleichtern erfolgte eine automatisierte Trennung mittels HPLC und separate Testung der erhaltenen Fraktionen im Mikromaßstab (Mikrotests). Anhand der Korrelation von Aktivität und Retentionszeiten konnte somit die aktive Verbindung einem Polaritätsbereich zugeordnet werden. Um das tatsächliche Potenzial der Reinsubstanzen zu bestimmen sollte nach ihrer Isolierung die Aktivität bestätigt und ihre Konzentrationsabhängigkeit bestimmt werden. Neben den Mikrotests wurde bei größeren Probenmengen eine Testung auf weitere fungizide und herbizide Wirkungen im Gewächshaus durchgeführt. Aus einigen Extrakten wurde ausschließlich aufgrund der Ergebnisse des chemischen Screening Sekundärstoffe isoliert. Diese Reinsubstanzen wurden einer erneuten Testung auf ihre biologische Aktivität unterzogen. Eine detaillierte Auflistung der zur biologischen Testung verwendeten Zielorganismen in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

E) Chemische Synthese und Strukturvariation (AK KROHN)

Für die kommerzielle Nutzung eines Wirkstoffs ist häufig eine fermentative Herstellung aufgrund der aufwendigen Trennverfahren nicht möglich. Aus diesem Grund sollte für interessante Strukturen eine chemische Synthese entwickelt und zudem durch Variation der Struktur das Spektrum der verfügbaren Substanzen erweitert werden. Auch die neu erzeugten synthetischen Derivate wurden den unter D beschriebenen Testverfahren zugeführt.

Tabelle 1: Testorganismen für die Bestimmung der insektiziden bzw. herbiziden Wirkung von Extrakten und Reinsubstanzen.

Insekten		Schadpflanzen	
Wiss. Name	Deut. Bezeichnung	Wiss. Name	Deut. Bezeichnung
<i>Anthonomus grandis</i>	Baumwollkapselrüssler	<i>Abutilon theophrasti</i>	Samtpappel
<i>Certitis capitata</i>	Mittelmeerfruchtfliege	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Ackerfuchsschwanz
<i>Heliothis virescens</i>	Eulenfalter	<i>Avena fatua</i>	Flughafer
<i>Megoura viciae</i>	Bohnenblattlaus	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Hühnerhirse
		<i>Sataria faberi</i>	Fabers Borstenhirse
		<i>Seraria italica</i>	Kolbenhirse

Tabelle 2: Testorganismen und verwendete Wirtspflanzen für die Bestimmung der fungiziden Wirkung von Extrakten und Reinsubstanzen gegen phytopathogene Pilze.

Wissenschaftlicher Name	Wirtspflanze	verursachte Krankheit
<i>Phytophthora infestans</i>	Tomate/Kartoffel	Kraut- und Knollenfäule
<i>Alternaria solani</i>	Tomate	Dürrfleckenkrankheit
<i>Botrytis cinerea</i>	Paprika/Tomate	Grauschimmel
<i>Pyricularia oryzae</i>	Reis	Reisbrand
<i>Erysiphe segetum</i>	Weizen	Getreidemehltau
<i>Puccinia recondita</i>	Weizen	Braunrost
<i>Septoria tritici</i>	Weizen	Blattdürre des Weizens
<i>Septoria nodorum</i>	Weizen	Blatt und Spelzenbräune
<i>Pyrenophora teres</i>	Gerste	Netzfleckenkrankheit der Gerste

Standard-Set für Mikrotests: *P. infestans*, *B. cinerea*, *P. oryzae*, *S. tritici*

Standard-Set für Gewächshaus-Versuche: *P. infestans*, *A. solani*, *B. cinerea*, *E. segetum*,

P. recondita, *S. nodorum*, *P. teres*

Die Zuständigkeit für die vorgestellten Tätigkeiten war nicht immer klar vorgegeben, so dass z. B. die Isolierung der Pilzstämmen großteils in Braunschweig z.T. aber auch in Göttingen erfolgte. Eine detaillierte Verteilung der Aufgaben und die nötige Korrespondenz zwischen den Projektteilnehmern ist Abbildung 10 zu entnehmen.

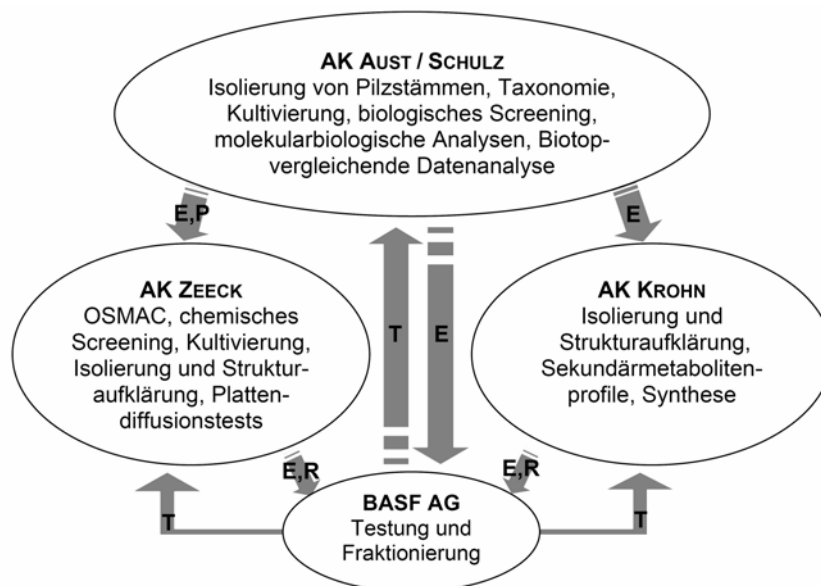


Abbildung 10: Arbeitsaufteilung im Verbundprojekt (E = Extrakte, R = Reinsubstanzen, P = Pilzstämmen, T = Testergebnisse).

2.2 Stammauswahl

Im Rahmen dieser Arbeit galt es eine Reihe von Pilzen zu bearbeiten, die im Vorfeld bereits sowohl einem chemischen als auch biologischen Screening unterzogen worden waren⁴². Die Kultivierung der Stämme erfolgte in der Regel in Schüttelkulturen (Erlenmeyerkolben mit Schikanen), Ruhekulturen (P-Kolben) und in Festphasenkultur (Biomalz-Agar, DiGe). Im biologischen und chemischen Screening auffällige Stämme sollten im größeren Maßstab (4 – 5 L) erneut unter den jeweiligen Bedingungen kultiviert werden. Aufgabe war es die aktiven Komponenten der Extrakte zu isolieren, ihre Struktur aufzuklären und die biologische Aktivität zu bestätigen. Im Falle der im chemischen Screening besonders auffälligen Extrakte erfolgte auch bei fehlender biologischer Aktivität eine Bearbeitung. Isolierte Reinsubstanzen sollten erneut der biologischen Prüfung zugeführt werden. In Tabelle 3 wird eine Übersicht über die verfügbaren und tatsächlich bearbeiteten Stämme gegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die Screeningergebnisse der verfügbaren Stämme aus dem BMBF-Projekt. Der Sekundärstoffe der **fett** hervorgehobenen Stämme werden in dieser Arbeit beschrieben.

Stamm – Nr.	Taxonomische Einordnung	Wirtspflanze	Festphasenkulturen				Screening der...			
			Festphasenkulturen		Schüttelkulturen		Ruhekulturen			
			chem.	biol.	chem.	biol.	chem.	biol.		
BS 6612	nicht bestimmt	<i>Fucus serata</i> (Braunalge)	o	-	+	F	+	I+		
BS 6618	<i>Drechslera sp.</i>	<i>Elymus arenarius</i> (Strandroggen)	o	-						
BS 6631	<i>Pleospora sp.</i>	<i>Galium verum</i> (Echtes Labkraut)	o	-	-	-	+	I		
BS 6666	<i>Drechslera sp.</i>	<i>Artemisia vulgaris</i> (Gemeiner Beifuss)	+	I	-	H				
BS 6687	<i>Phoma sp.</i>	<i>Trifolium arvensis</i> (Hasenklee)	o	-						
BS 6689	nicht bestimmt	<i>Conyza Canadensis</i> (Kanad. Berufskraut)	o	-	o/-	F, (I)				
BS 6750	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Vicia oracca</i> (Wicke)	+	-	+	-	+	-		
BS 6769	<i>Phomopsis sp.</i>	<i>Salix viminalis</i> (Hanf-/Korbweide)	+	-	+	-	+	F		
BS 6771	<i>Phoma sp.</i>	<i>Salix viminalis</i> (Hanf-/Korbweide)	+	F, H	-	-	-/o	-		
BS 6829	<i>Phoma sp.</i>	<i>Trifolium arvensis</i> (Hasenklee)	+	-	-	-	+	F		
Gö 212	<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Hypnea cervicornis</i> (Rotalge)			+	F				
Gö 223	<i>Nodulisporium sp.</i>	<i>Hypnea cervicornis</i> (Rotalge)			+	-				

Einstufung im biologischen Screening: - = nicht interessant / o = eingeschränkt interessant / + = interessant

Einstufung im biologischen Screening: - = keine Aktivität / F = fungizid / I = insektizid / H = herbizid;

3. Sekundärstoffe aus Braunschweiger Stämmen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Pilze wurden im Braunschweiger Arbeitskreis von Prof. Dr. H.-J. AUST und PD Dr. B. SCHULZ aus Pflanzen bzw. Algen isoliert (siehe Tabelle 3). Das chemische Screening erfolgte durch J. BITZER im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. ZEECK an der Universität Göttingen (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie). Auf die Ergebnisse des biologischen und chemischen Screenings wird bei der Beschreibung der einzelnen Stämme näher eingegangen.

3.1 Sekundärstoffe aus Stamm BS 6612

3.1.1 Screening und Kultivierung

Bei dem phylogenetisch nicht bestimmten Stamm BS 6612 handelt es sich um einen aus den Blättern des Sanddorns (*Hyppophae rhamnoides*) isolierten Endophyten. Das in P-Kolben und Schüttelkulturen durchgeführte chemische Screening, stellte diesen Stamm als interessant heraus. Die Kultivierung in P-Kolben führte bei allen Medien zur Produktion einer polaren Substanz mit einem R_f -Wert von 0.24, die UV-Licht (254 nm) löscht und ebenfalls eine schwache Fluoreszenz (366 nm) zeigt. Nachweißreaktion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 , oder Orcin ergibt eine violette bzw. schwarze Färbung. Auch im biologischen Screening war der Stamm auffällig. Der von der BASF durchgeführte Mikrottest der P-Kolben-Extrakte ergab eine insektizide Komponente mit Wirkung gegen *Anthonomous grandis*, *Certitis capitata* und *Heliothis virescens* bei einer Retentionszeit von 28 bis 29 Minuten.

3.1.2 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

Für die Isolierung der aktiven Komponente erschien besonders eine Kultivierung in P-Kolben lohnenswert. Bei Verwendung von G20 als Nährmedium und Zugabe von Kochsalz (33 g/L) zeigte sich ein besonders reichhaltiges Sekundärstoffspektrum. Der Stamm wurde im 5 L-Maßstab kultiviert und der Ethylacetat-Extrakt des Kulturfiltrats sowie der Aceton-Extrakt des Myzels für die weiteren Arbeiten verwendet. Eine erste Separation wurde durch Waschen des KF-Extraktes mit Aceton erreicht. Der unlösliche Bestandteil zeigte nach Aufnahme in Methanol/Chloroform keine interessanten Verbindungen und wurde daher verworfen. Der Aceton-lösliche Teil wurde aufgrund seiner geringen Menge (64.5 mg) an Sephadex LH-20 (Aceton) chromatographiert. Nur eine Fraktion der Rohproduktsäule war mengenmäßig zur weiteren Aufreinigung geeignet und enthielt die bereits im chemischen Screening auffällige Komponente mit $R_f = 0.24$. Durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol, isochratisch 6:1) konnten 7.7 mg **25** in Form eines farblosen Feststoffes erhalten werden. Die

Chromatographie des Myzel-Extrakts an Kieselgel (Chloroform/Methanol, Gradient: 95:5 → 4:1) ergab neben stark angereichertem Ergosterol (**73**) keine Fraktionen, die im Vergleich zum Kulturfiltrat neue Substanzen in ausreichender Menge enthielten. Durch weitere Trennung an Sephadex LH-20 (Aceton) konnten weitere 4.6 mg **25** isoliert werden.

3.1.3 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe

Aphidicolin (**25**)

Die Substanz fällt im Dünnschichtchromatogramm durch ihr violettes Anfärbeverhalten gegenüber Anisaldehyd/H₂SO₄ auf. Im UV-Licht zeigt sie weder starke Absorption bei 254nm noch Fluoreszenz bei 366 nm. Durch ein hochaufgelöstes ESI-Massenspektrum ergibt aus dem Molekülpeaks bei $m/z = 361.234954 [M+Na]^+$ die Summenformel C₂₀H₃₄O₄. Das ¹H-NMR-Spektrum in Methanol-*d*₄ zeigt im Bereich der sauerstoffs substituierten Methin- und Methylengruppen fünf Signale einfacher Intensität zwischen $\delta_H = 3.61$ und 3.30. Im übrigen aliphatischen Bereich sind insgesamt 19 Protonen zu verzeichnen, wobei es zu einer teilweisen Überlagerung der Resonanzen kommt. Klar ersichtlich ist die Präsenz von zwei Methylgruppen, die als Singulets bei $\delta_H = 1.01$ bzw. 0.72 auftreten. Der gesättigte Charakter dieser Verbindung spiegelt sich auch im ¹³C-NMR-Spektrum wieder. Es sind weder Signale für Carbonylgruppen noch für olefinische Kohlenstoffatome zu erkennen. Vier Resonanzen bei $\delta_C = 77.26, 75.62, 72.08$ und 68.74 repräsentieren die O-substituierten Kohlenstoffatome. Zwischen $\delta_C = 50.31$ und 24.15 liegen Signale für 14 Kohlenstoffatome. Die Methylgruppen erscheinen bei $\delta_C = 17.97$ und 15.62 und vervollständigen die Zahl der Kohlenstoffatome. Eine mit diesen Ergebnissen in den Naturstoff-Datenbanken *AntiBase*⁴³ und *Dictionary of Natural Products*⁴⁴ durchgeführte Suche legt nahe, dass es sich um ein tetracyclisches Diterpenoid handelt, genauer um ein Tetrol der Aphidicolane bzw. Kaurane. Die Grundgerüste dieser Verbindungen unterscheiden sich in der Größe der Ringe C und D.

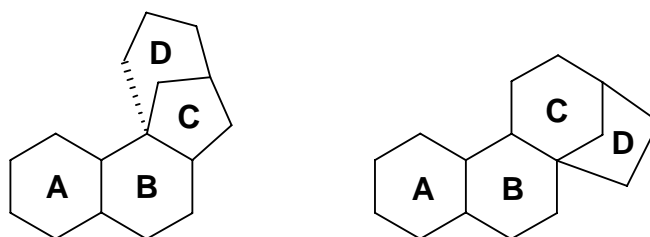
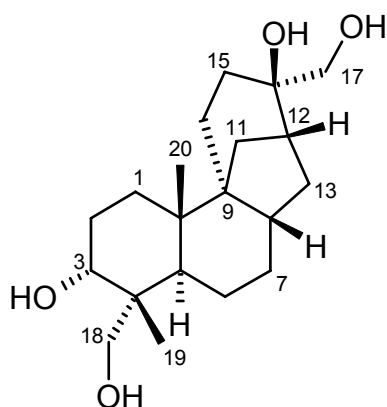


Abbildung 11: Das Grundgerüst der Aphidicolane und Kaurane.

Eine genauere Betrachtung der ^1H -, ^{13}C - und 2D-NMR-Daten und Vergleich mit der Literatur ergibt für die isolierte Substanz eine sehr gute Übereinstimmung mit $3\alpha,16\beta,17,18$ -Aphidicolanetretol (**25**, Aphidicolin)⁴⁵. Ausschlaggebend ist neben den chemischen Verschiebungen die durchgehende COSY-Korrelationen der Protonen des Rings C bei $\delta_{\text{H}} = 2.14$ (12-H), 2.02 (8-H), 1.83 (11- H_a), 1.77 (13- H_a), 1.37 (11- H_b) und 0.99 (13- H_b). Durch Analyse der Kopplungskonstanten und Vergleich der Drehwerte kann auch die absolute Konfiguration des Aphidicolins (**25**) bestätigt werden⁴⁶.

3.1.4 Biosynthese von Aphidicolin



Aphidicolin (**25**)

Der Naturstoff wurde ursprünglich aus *Cephalosporium aphidicola* isoliert und konnte später auch in drei weiteren Pilzen gefunden werden⁴⁷. Die Klärung der Biosynthese dieses komplexen Diterpens war Ziel umfangreicher Arbeiten und ist heute fast vollständig verstanden. Fütterungsexperimente mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat und $[2-^{14}\text{C}-4\text{R}-^3\text{H}]$ Mevalonat haben gezeigt, dass die Kohlenstoffatome C-1, C-7, C-15 und C-18 aufgrund der fehlenden Satelliten in den ^{13}C -NMR-Spektren aus dem radiomarkierten Mevalonat stammen. Alle anderen Signale

zeigen die für den $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat-Einbau typischen Kopplungen. Das Einbaumuster von markiertem Acetat und Mevalonat in den Diterpenvorläufer Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) (**10**) ist hinreichend bekannt⁴⁸ (vgl. Abbildung 12). Somit werden Rückschlüsse auf die für die Bildung von **25** durchlaufende Reaktionssequenz möglich⁴⁹. Durch die Markierung an C-18 und die β -Stellung der Methylgruppe an C-10 kann für die Cyclisierung von Ring A der erwartete sesselartige Übergangszustand von **10** bewiesen werden. Statt des durch die Radiomarkierung der vier Mevalonate erwartete $^3\text{H}:^{14}\text{C}$ -Verhältnis von 4:4 kann in **25** nur ein Verhältnis von 3:4 nachgewiesen werden. Folglich kommt es während der Biosynthese zum Verlust eines Tritiumkerns, was durch die Oxygenierung an C-3 verständlich wird. Da die anderen drei ^3H -Atome erhalten bleiben, muss das ursprünglich an C-9 gebundene Tritium einer Umlagerung unterzogen worden sein. Betrachtet man die Struktur von **25** und vergleicht diese mit GGDP (**10**), so wird das Ziel der H-Umlagerung deutlich. C-8 ist in **10** quartär und trägt nach der Cyclisierung ein β -ständiges Proton. Durch diesen Sachverhalt ist es möglich die Knüpfung der Ringe B und C nachzuvollziehen. In Analogie zur Biosynthese des Pleuromutulins⁵⁰ erfolgt die Cyclisierung von Ring B vermutlich über einen bootähnlichen

Übergangszustand und ergibt folglich eine β -Stellung von 9-H. Das im Zuge der Knüpfung von Ring C entstehende Kation an C-8 stabilisiert sich im Sinne einer Wagner-Meerwein-Umlagerung durch Wanderung von 9-H und ergibt das Pimaradien-Kation (**20**). Die ^{14}C -Markierung an C-15 liefert den entscheidenden Hinweis für die Cyclisierung von Ring D. Würde der Angriff der Vinylgruppe an C-9 nicht von der β -Seite erfolgen, müsste die Markierung nicht an C-15 sondern an C-12 zu finden sein. Das aufgrund der letzten Cyclisierung an C-12 entstandene Kation stabilisiert sich durch eine weitere sigmatrope Umlagerung der C-8/C-11-Brücke sowie Abspaltung eines Protons von C-17 und ergibt Aphidicolin (**21**). Zusammengefasst ergibt sich der in Abbildung 12 dargestellte und von ADAMS & BU'LOCK vorgeschlagene und später verifizierte⁵¹ Mechanismus für die frühe Biosynthese von **25**.

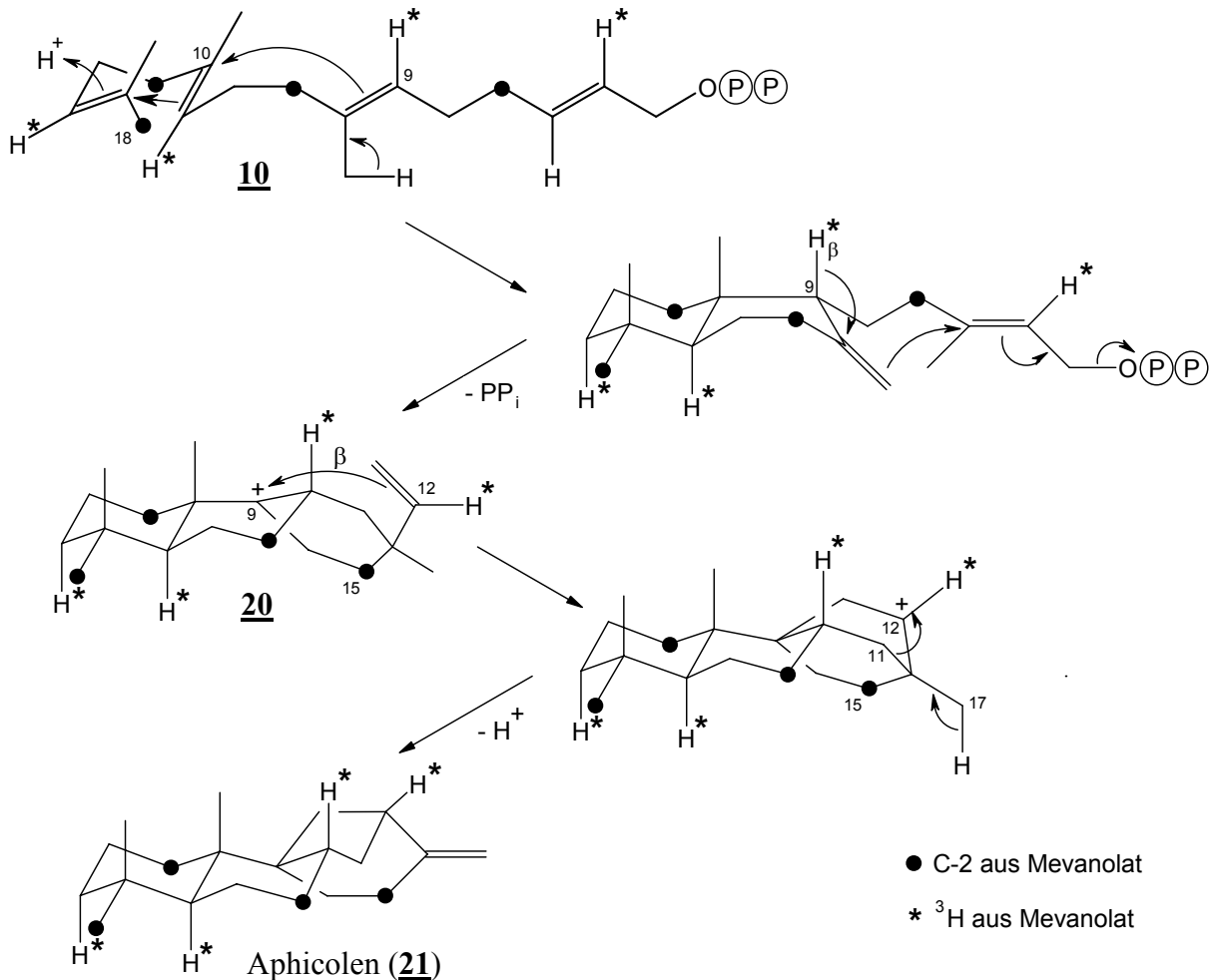


Abbildung 12: Cyclisierung der Ringsysteme und Markierungen aus $[2\text{-}^{14}\text{C}\text{-}4R\text{-}^3\text{H}]$ - Mevalonat bei der Bildung des Aphidicolin-Grundgerüsts Aphidicolin (**21**). Die Nummerierung der Kohlenstoffatome für die Intermediate entspricht dem Endprodukt Aphidicolin (**25**).

Im Rahmen der späten Biosynthese muss eine Oxygenierung der Kohlenstoffatome an Position 3, 16, 17 und 18 durchgeführt werden. Durch die Isolierung von Aphicolan-16 β -ol (**22**) wurde klar, dass die Einführung des ersten Sauerstoffatoms durch eine elektrophile Addition von Wasser an die exocyclische Doppelbindung ablaufen muss. Die Reihenfolge der verbleibenden Oxidationen blieb lange Zeit unklar, da eine Identifikation der anderen Intermediate durch das breite Sekundärstoffspektrum von *Phoma betae* PS-13 erschwert wurde. Erst zwei Dekaden später konnten SAKAMURA et. al. durch Zugabe von verschiedenen Cytochrom P-450 Inhibitoren zu Kultivierungsansätzen von *Phoma betae* PS-13 bzw. ATCC 24797 die Beteiligung von spezifischen Hydroxylasen nachweisen⁵². Durch die Hemmstoffe vereinfachte sich das Spektrum der Sekundärstoffe, da die Akkumulation einer Reihe ebenfalls oxygenierter Nebenkomponenten ebenfalls stark unterdrückt wurde.

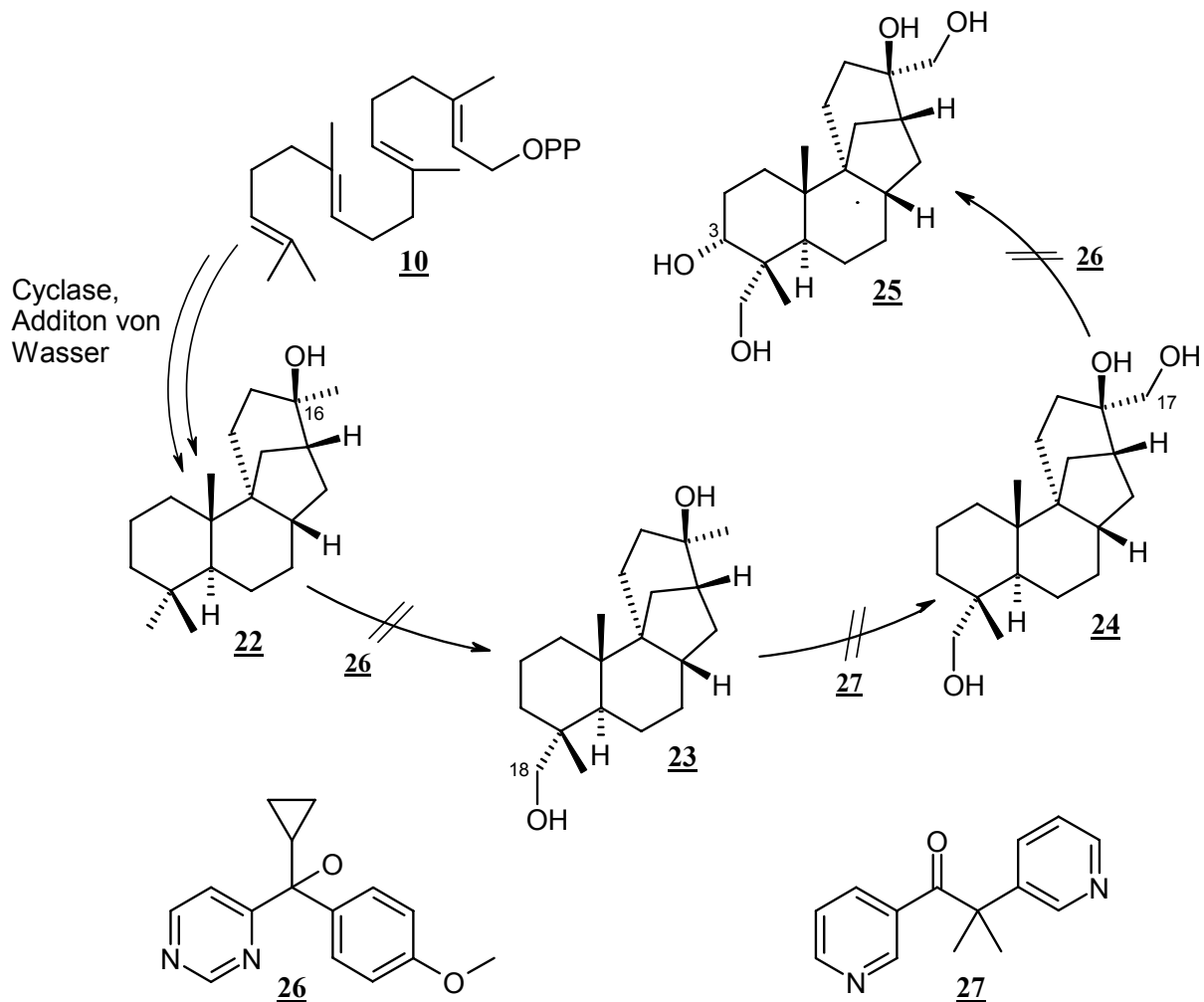


Abbildung 13: Die durch die Cytochrom P-450 Inhibitoren Ancymidol (**26**) und Metyrapon (**27**) blockierten Schritte der späten Biosynthese von Aphidicolin (**25**).

Wurde Ancymidol (**26**) während der Kultivierung von PS-13 appliziert konnte das 3-Monodesoxy-Analogon (**24**) sowie Aphicolan-16 β -ol (**22**) isoliert werden. Zugabe von Metyrapon (**27**) zu Kulturen von ATCC 24797 lieferte das fehlende Didesoxy-Analogon (**23**). Die Desoxy-Analoga **24** und **22** konnten durch Fütterung von [1-¹⁴C]Acetat und gleichzeitiger Gabe von Ancymidol (**26**) auch in radiomarkierter Form erhalten werden. Bei weiteren Fütterungsexperimenten gelang der Einbau dieser markierten Vorläufer in **25**, was deren Stellung innerhalb der Biosynthesesequenz bestätigt.

3.1.5 Biologische Aktivität von Aphidicolin

Neben seinem einzigartigen Kohlenstoffgerüst zeigt Aphidicolin (**25**) auch eine Reihe von interessanten biologischen Aktivitäten. Am meisten genutzt wird die antimittotische Wirkung durch reversible und spezifische Inhibierung der eukaryotischen DNA Polymerase α und δ ⁵³. Die so induzierte Störung der Replikation findet bei der Erforschung der Onko- und Kanzerogenese auf genetischer Ebene Verwendung. Unter Einwirkung von **25** kultivierte Zellen neigen zur vermehrten Ausbildung von fragile-sites (FS) auf den Chromosomen. Diese an spezifischen Stellen lokalisierten FSs, die häufig mehrere tausend DNA-Basen umfassen, neigen zur Ausbildung von Lücken, Abrissen oder triradialen Formen bei in der Metaphase befindlichen Chromosomen. Die genetischen Funktionen der Abschnitte in denen sich fragile-sites befinden sind zum größten Teil noch nicht bekannt. Durch die erhöhte genetische Instabilität in diesen Bereichen wird davon ausgegangen, dass sie im unmittelbaren Zusammenhang mit der Tumorentstehung stehen. Dank Aphidicolin **25** und seiner inhibitorischen Wirkung auf die DNA-Polymerasen gelang es in ausreichender Menge FS-haltige Chromosomen in verschiedenen Krebszelllinien zu exprimieren und auf ihre Veränderungen zu untersuchen. Im menschlichen Genom haben Forscher bisher zwischen 100 und 110 Regionen als FS identifiziert, von denen einige nur sehr selten vorkommen und andere bei fast jedem Individuum zu finden sind. Die häufigste und am besten untersuchte Stelle ist FRA3B, die oft in Zellen verschiedener solider Tumoren verändert ist⁵⁴. Sie ist die aktivste FS, die man im menschlichen Genom gefunden hat. In dieser Region liegt das Gen FHIT (fragile histidine triad), das vermutlich in intakter Form als Tumorsuppressor die Krebsentstehung verhindert. Für FRA3B konnte gezeigt werden, dass bei an Brust-, Eierstock- oder Lungenkrebs erkrankten Patienten und ihren Verwandten ersten Grades ein erhöhter Anteil dieser FSs vorliegt⁵⁵. Des Weiteren wird für **25** eine antivirale Wirkung gegenüber *Herpes simplex* beschrieben. Aufgrund der insektiziden Eigenschaften der im

Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Extrakte von Stamm BS 6612, könnte das Wirkspektrum dieser Substanz erweitert werden. Die Ergebnisse der bei der BASF angeforderten Tests stehen leider zu diesem Zeitpunkt noch aus. Eine antibakterielle Wirkung konnte in den durchgeführten Plattendiffusionstest nicht beobachtet werden.

3.2 Sekundärstoffe aus *Pleospora* sp. Stamm BS 6631

3.2.1 Screening und Kultivierung

Das chemische Screening des aus echtem Labkraut (*Gallium verum*) isolierten Endophyten Stamm BS 6631 wurde von Dr. J. BITZER in P-Kolben durchgeführt. Es wurden die Medien 1158, SGG, Biomalz sowie G20 jeweils mit und ohne Zusatz von 33 g/L Kochsalz verwendet. Der Stamm zeigte besonders in 1158 und Biomalz ein ähnliches aber interessantes Sekundärstoffmuster. Der Salzgehalt hatte keinen Einfluss auf die Sekundärstoffproduktion. Besonders auffällig waren zwei im mittleren Polaritätsbereich ($R_f = 0.61$ und 0.32) liegende Zonen, die im UV bei 254 nm absorbierten, bei 366 nm grün fluoreszierten und mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 orange anfärbten. Die Extrakte der in P-Kolben durchgeführten Kultivierungen wurden von der BASF auf ihre insektiziden Eigenschaften überprüft und ergaben Aktivität gegen alle vier Testorganismen. Die durchgeführten Mikrotests lieferten keine weiteren biologischen Aktivitäten. Ein aus Braunschweig angeforderte Agarkultur (12 L, Biomalz) zeigte erneut das schon aus den P-Kolben bekannte Spektrum an Sekundärstoffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden versucht die Zusammensetzung des Extrakts der Festphasenkultur zu ermitteln.

3.2.1 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

Der Extrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent Chloroform/Methanol 19:1) so fraktioniert, dass eine optimale Antrennung der beiden beschriebenen Zonen erreicht wurde. Die Fraktion, welche die lipophilere Komponente enthielt wurde einer Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Dichlormethan/Methanol 1:1) unterzogen und lieferte 12.5 mg **28** in reiner Form sowie 53.4 mg Ergosterol (**73**). Eine weitere Trennung der Fraktion, welche die polarere Komponente enthielt, konnte mittels der gängigen Verfahren nicht durchgeführt werden. In Methanol, Aceton und Chloroform/Methanol 1:1 zeigte sich keine ausreichende Löslichkeit um eine Trennung an Sephadex LH-20 durchzuführen. Es wurde daher erneut an Kiesel (Chloroform/Methanol 85:15) chromatographiert, wobei sich die Zielsubstanz vollständig zersetzte.

3.2.2 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe

Stemphol (**28**)

Die isolierte Substanz konnte in Form leicht gelblicher Nadeln erhalten werden. Durch UV-Löschung bei 254 nm, grüner Fluoreszenz bei 366 nm und Orangefärbung gegenüber Anisaldehyd/H₂SO₄ ist sie im Dünnschichtchromatogramm leicht zu identifizieren. Eine Bestimmung der Molmasse (236 g/mol) gelingt mittels EI-Massenspektrometrie. Im ¹H-NMR-Spektrum zeigt sich neben einem aromatischen Singulett ($\delta_{\text{H}} = 6.20$) für zwei Protonen das stark verbreiterte Singulett von zwei austauschbaren Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 4.89$. Im Hochfeldbereich erscheinen zwei Methylengruppen, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 2.54$ bzw. 2.43 dem aromatischen System benachbarten sein müssen und zu Triplett aufgespalteten sind. Fünf weitere Methylengruppen werden in Form von Quintetts bei $\delta_{\text{H}} = 1.54$, 1.49 und 1.38 sowie ein durch ein Sextett ($\delta_{\text{H}} = 1.27$) überlagertes Quintett bei $\delta_{\text{H}} = 1.31$ detektiert. Die Triplett bei $\delta_{\text{H}} = 0.88$ und 0.92 stammen von zwei Methylgruppen. Das ¹³C-NMR-Spektrum deutet zunächst auf insgesamt zwölf Kohlenstoffatome hin. Für einige Resonanzen werden relativ zu den anderen Signalen sehr hohe Integrale angegeben, was unter Beachtung der Molmasse die chemische Äquivalenz von mindestens drei Kernen andeutet. Die aromatischen Signale ergeben eine symmetrische Substitution des Aromaten, da bei $\delta_{\text{C}} = 154.7$ und 108.2 für 1,3-Dihydroxybenzole (Resorcine) typische Signale zweifacher Intensität detektiert werden⁵⁶. Eine zweifache Alkylsubstitution des Aromaten wird durch die im Vergleich zum Resorcin bei etwas erhöhter Frequenz sichtbaren Kohlenstoffatome ($\delta_{\text{C}} = 142.5$ und 112.8) suggeriert. Die acht Signale im aliphatischen Bereich des ¹³C-NMR-Spektrums stehen im Einklang mit den im Protonenspektrum sichtbaren Methylen- und Methylgruppen, wobei die Resonanz bei $\delta_{\text{C}} = 14.1$ beide Methylgruppen repräsentiert. Die Suche nach Resorcinen in den Naturstoff-Datenbanken^{43, 44} ergibt unter Beachtung der angenommen fünfzehn Kohlenstoffatome noch kein eindeutiges Ergebnis, da in der Literatur sowohl ein 2-Butyl-5-pentyl- (**28**) als auch ein 2-Hexyl-5-propyl-resorcin (**30**) beschrieben werden. Erst durch ein ¹H/¹H-COSY-Experiment gelingt es, die Länge der Alkylreste als Butyl- und Pentylrest zu bestimmen. Für die Bestätigung der Regiochemie kann die im EI-Massenspektrum beobachtete Fragmentierung genutzt werden. H. ACHENBACH und W. KOHL haben für 2,5-dialkylierte Resorcine die Schlüsselfragmente des primären (**28a**) und sekundären Zerfalls (**28b**) anhand mechanistischer Überlegungen vorhergesagt und experimentell betätigt (vgl. Abbildung 14).

Durch das Auftreten der EI-Fragmente von $m/z = 193$ (β -Spaltung) und 180 (β -Spaltung und Umlagerung) handelt es sich somit eindeutig um Stempchol (**28**), dem 2-Butyl-5-pentyl-Resorcin⁵⁷.

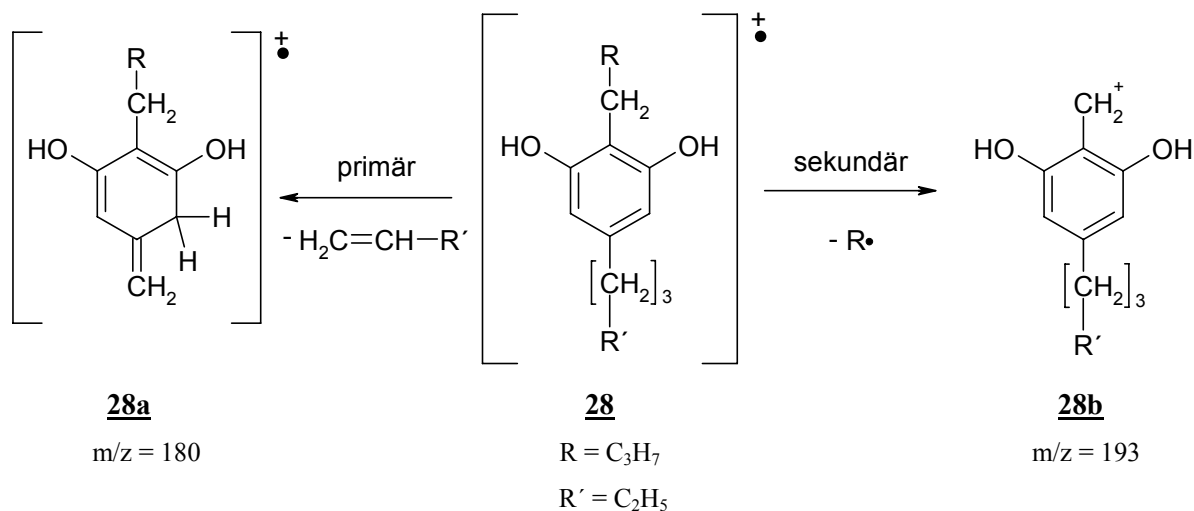


Abbildung 14: Primäre und sekundäre EI-Fragmentierung 2,5-dialkylierter Resorcine.

3.1.4 Biosynthese von Stempchol

Die Biosynthese der 2,5-dialkylierten Resorcine in verschiedenen *Pseudomonas* Spezies ist ausführlich untersucht worden. Aufgrund von Fütterungsexperimenten mit $[2-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}_3]$ Acetat und dessen Einbau in 2-Hexyl-5-propyl-resorcin (**29**) wurde lange Zeit angenommen, dass diese Verbindung durch eine ungewöhnliche Kopf-an-Kopf-Kondensation von zwei Polyketidketten gebildet wird⁵⁸. Eine genauere Untersuchung des für die Synthese von **29** verantwortlichen Genclusters hat jedoch den Fettsäuremetabolismus als Quelle der Kohlenwasserstoffketten ergeben⁵⁹. Entscheidend für diese Hypothese ist die strukturelle Homologie zum Acyl-Carrier-Protein (ACP) sowie zur β -Ketoacyl-ACP-Synthase III. Fütterungsexperimente mit $[1,2,3,4-^{13}\text{C}_4]$ Caprylsäure (**30**) dienten als weiterer Beweis für die Richtigkeit dieser Annahmen. Für die Biosynthese des 2-Hexyl-5-propyl-Resorcins muss der enzymatischen Kopf-an-Kopf-Kondensation (*DarA*) eine Kettenverlängerung bzw. β -Oxidation der Caprylsäuren vorgeschaltet sein, um das beobachtete Einbaumuster zu erhalten (siehe Abbildung 15). Die für die Kettenverlängerung erforderlichen Enzyme (*DarB*, *DarC*) konnten ebenfalls innerhalb des Genclusters belegt werden. Ungeklärt bleibt jedoch ob die kürzere Fettsäurekette während der Cyclisierung an ACP gebunden ist oder als CoenzymA-Ester vorliegt.

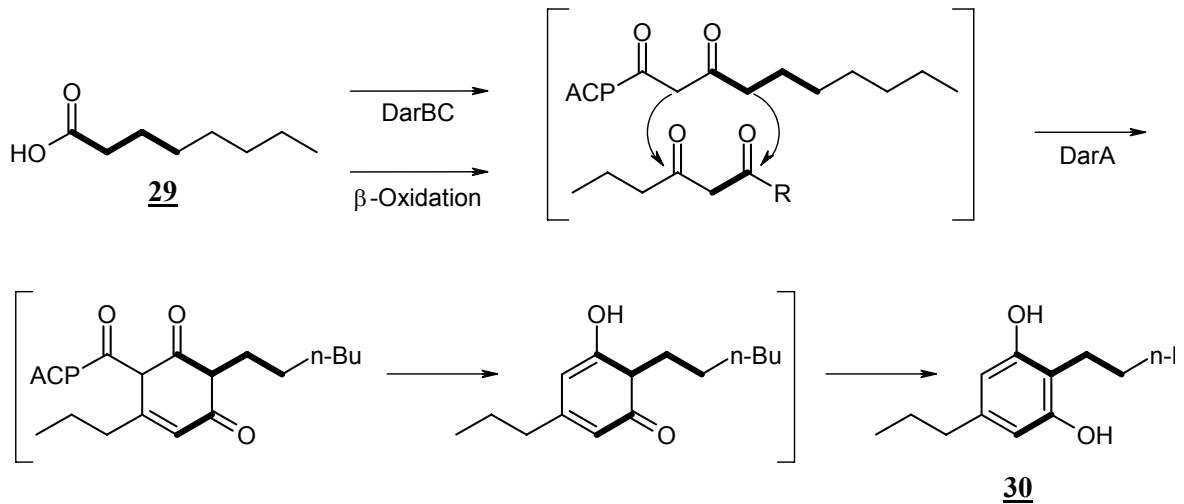


Abbildung 15: Biosynthese von 2-Hexyl-5-propyl-Resorcin (**TO2**) in *Pseudomonas* und Einbaumuster (fett dargestellte Bindungen) nach Fütterung von [1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]-Kaprilsäure (**TO3**). R = ACP bzw. SCoA

Auf die Biosynthese des Pilzmetaboliten Stemphol (**28**) kann die aus Bakterien bekannte Biosynthese 2,5-dialkylierter Resorcine nicht ohne Vorbehalt übertragen werden. Die durch *DarB* und *DarC* katalysierten Schritte sind im Falle von **28** nicht nötig. Hier führt eine Kopf-an-Kopf-Kondensation zweier β -Ketocaprylsäuren bereits zum gewünschten Produkt. Da es ausschließlich zur Bildung des 2-Butyl-5-pentyl-Derivates kommt und die Kettenlänge und Position der Alkylreste einen Aufbau aus Acetyl-CoA über einen Zwei-Ketten-Mechanismus nahe legt, ist eine enzymatische Steuerung der Cyclisierung von essentieller Notwendigkeit und legt eine Analogie zur bakteriellen Biosynthese nahe. Ohne Kenntnisse über den verantwortlichen Gencluster erscheinen PKS-Vorläufer als Quelle der zu kondensierenden Ketten als plausible Erklärung, zumal ein Großteil der Sekundärstoffe aus Pilzen über diesen Biosyntheseweg gebildet wird (vgl. Einleitung).

3.1.5 Biologische Aktivität von Stemphol

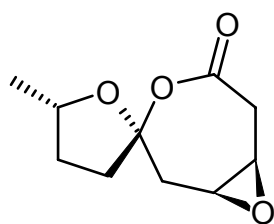
Diese Substanz wurde erstmals aus Festphasenkultivierungen des imperfekten Pilzes *Stemphylium majusculum*⁶⁰ isoliert, konnte jedoch auch in anderen *Stemphylium* Spezies nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Rapspflanzen auf das von diesen pathogenen Pilzen produzierte Stemphol (**28**) durch Ausbildung von der Wurzelhals- und Stängelfäule (*Phoma lingam*) ähnlichen Läsionen reagieren⁶¹. Es wurde festgestellt, dass **28** als Auto-Inhibitor das Wachstum seines eigenen Produzenten hemmt und antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) aufweist. Das Wirkspektrum wird durch die Hefe *Schizosaccharomyces pombe* und den filamentösen

Pilz *Mucor hiemalis* auf fungizide Eigenschaften erweitert. Die antibiotische Wirkung des isolierten **28** wurde durch Plattendiffusionstests bestätigt und ergab eine schwache Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* (Hemmhof: 14 mm) und *Bacillus subtilis* (Hemmhof: 10 mm). Eine Testung der Reinsubstanz durch die BASF war aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht möglich. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die im Mikrotest der Extrakte gefundene insektizide Wirkung auf diese Substanz zurückgeführt werden kann.

3.3 Sekundärstoffe aus *Beauveria* sp. Stamm BS 6750

3.3.1 Vorangegangene Arbeiten

Der Endophyt *Beauveria* sp. Stamm BS 6750 wurde aus *Vicia oracca* (Wicke) isoliert. Er zeigte abhängig von den Kultivierungsbedingungen im chemischen Screening ein sehr vielfältiges Spektrum an Sekundärstoffen. Die Kultivierung erfolgte in Schüttel- und P-Kolben unter Verwendung der üblichen Nährmedien sowie auf Biomalz Agarplatten. Das von der BASF durchgeführte biologische Screening der Extrakte lieferte weder im Herbizid- noch im Fungizid- bzw. Insektizidtest eine Wirkung. Dennoch wurde der Extrakt der Agar-Kulturen auf seine chemische Zusammensetzung überprüft und ergab mit Beauveriaspirolid (**47**) eine bis dato in der Literatur nicht bekannte Verbindung. **47** zeigte auch in Form der Reinsubstanz keine biologische Aktivität, zeichnet sich jedoch durch die ungewöhnliche Struktur aus. Bei **47** handelt es sich um ein pentaketidisches Spiroketal-Lacton, welches durch



Beauveriaspirolid (**FF1**)

die Kombination eines Fünf- und Siebenrings über ein einzigartiges Grundgerüst verfügt. Die Epoxidfunktion ist für diese Art von Verbindung ebenfalls nur bei **47** bekannt. Die relative Stereochemie wurde durch eine sorgfältige Auswertung der vicinalen Kopplungskonstanten und der NOESY-Korrelationen als ($3R^*$, $4S^*$, $6R^*$, $9R^*$) bestimmt.

3.3.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Bei den in P-Kolben durchgeführten Kultivierungen zeigte sich ein zum Agarextrakt sehr unterschiedliches Metabolitenspektrum, wobei der Salzgehalt der verwendeten Medien einen Einfluss auf die relativen Mengen der Sekundärstoffe ausübte (Abbildung 16). Aufgrund der neuartigen Struktur von (**47**) erschien die Suche nach weiteren bisher unbekanntem

Verbindungen in den Extrakten chancenreich zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine erneute Kultivierung in P-Kolben unter Verwendung verschiedener Nährmedien durchgeführt. Es galt zu überprüfen, ob es unter diesen Bedingungen ebenfalls zur Produktion von (47) kommt bzw. welche alternativen Sekundärstoffe auftreten

Für die P-Kolben Fermentation von Stamm. BS 6750 fanden die Medien Bio+ und SGG Verwendung. Es wurden jeweils 5 L Kulturbrühe angesetzt und für 30 Tage bei 30 °C in der Dunkelheit inkubiert. Zur Aufarbeitung wurden Kulturfiltrat und Myzel separiert und mit Ethylacetat bzw. Aceton extrahiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend lyophilisiert. Kulturfiltrat- und Myzelextrakt wurden mittels LC-MS (HPLC B, Programm B, Säule B) auf ihre Zusammensetzung überprüft. Beauveriaspirolid (47) konnte in keinem der Extrakte nachgewiesen werden.

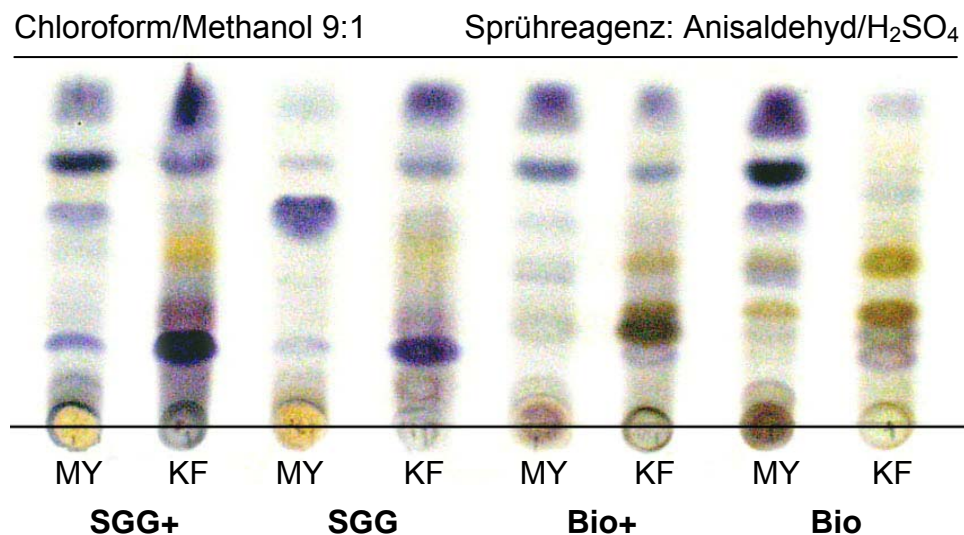


Abbildung 16: Dünnschichtchromatogramm der Extrakte aus P-Kolben-Kulturen von *Beauveria sp.* BS 6750 in P-Kolben. (MY = Myzel, KF = Kulturfiltrat).

P-Kolben Fermentation im Nährmedium Bio+

Auffällig an den LC-MS Experimenten war die Diskrepanz zur Anzahl der im Dünnschichtchromatogramm erkennbaren Sekundärstoffe. Trotz einer relativ hohen Konzentration (5 mg/mL, Injektionsvolumen 20 µL) waren in den Chromatogrammen nur wenige Metaboliten sichtbar. Der Extrakt des Kulturfiltrats zeigte im UV-Chromatogramm lediglich zwei größere Peaks. Bei $R_t = 5.64$ min wurde eine Verbindungen mit inhomogenen m/z -Werten von 305 (negativer Modus) bzw. 183 (positiver Modus) detektiert. Dem Peak mit $R_t = 12.10$ min kann eine unbekannte Verbindung der Molmasse 308 g/mol zugeordnet werden. Wie die spätere Auftrennung der Extrakte gezeigt hat, scheint es sich bei diesen

Verbindungen nur um Nebenkomponenten zu handeln, die über einen stark UV-Licht absorbierenden Chromophor verfügen und sich in der nachgeschalteten ESI-MS gut detektieren lassen. Keine der beiden Substanzen konnte in ausreichender Menge isoliert werden. Die später aus den Extrakten isolierten Pentaketide stellen die Hauptprodukte des Sekundärstoffwechsels von Stamm BS 6750 in diesem Medium dar, lassen sich aber aufgrund ihrer unscheinbaren UV-Spektren und schlechten Ionisierbarkeit in den LC-MS-Analysen nicht nachweisen. Das LC-MS-Spektrum des Myzelextraktes liefert keine zur Auswertung geeigneten Daten.

Die Trennung des Kulturfiltrat-Extrakts erfolgte zunächst durch Chromatographie an Kieselgel, als Eluent diente ein Chloroform/Methanol-Gradient (9:1 → 4:1). Diejenigen der erhaltenen sieben Fraktionen, welche dünnschichtchromatographisch interessante Sekundärstoffe zeigten, wurden durch Gelchromatographie weiter aufgereinigt. Trennung der dritten Fraktion an Sephadex LH-20 (Dichlormethan/Methanol 1:1) ergab 35.7 mg **45**. Die vierte Fraktion wurde zunächst mit Methanol anschließend mit Aceton als Eluenten wiederholt an Sephadex LH-20 aufgereinigt und lieferte 44.3 mg **46**. Die Trennung des Myzelextrakts an Kieselgel ergab erwartungsgemäß außer 378.0 mg Ergosterol (**73**) keine weiteren Sekundärstoffe.

P-Kolben Fermentation im Nährmedium SGG

Mittels LC-MS-Analytik wurde versucht eine Produktion von Beauveriaspirolid (**47**) nachzuweisen. In keinem der Extrakts konnte **47** identifiziert werden. Auffällig waren im Extrakt des Kulturfiltrats hingegen die bei $R_t = 16.1$ min im negativen ESI-Modus zu erkennende Ionen mit $m/z = 568$ und 1139 . Das UV-Spektrum des dazu gehörenden Substanz-Peaks zeigte Adsorptionsmaxima bei 238, 293, 314, 362 und 390 nm und lieferte somit erste Hinweise auf die Produktion von Rebecamycin (**31**). Die Auswertung der LC-MS-Chromatogramme des Myzelextrakts ergab keine Hinweise auf vorhandene Sekundärstoffe. Das ebenfalls aus dem Kulturfiltrat isolierte Aphidicolin sowie das aus dem Myzelextrakt stammende Cerebrosid B (**32**) sind in den LC-MS-Chromatogrammen nicht zu erkennen, da sie ebenso wie die Cephalosporolide **45** und **46** UV-Licht kaum adsorbieren und nur schwach durch ESI ionisierbar sind.

Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel mit einem Chloroform/Methanol Gradienten chromatographiert (9:1 → 4:1). Die Fraktion ($R_f = 0.43$) mittlerer Polarität zeigte eine unter UV-Licht (366 nm) starke gelbe Fluoreszenz und ergab nach erneuter Chromatographie an Kieselgel (CEM1, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 10:5:1) und abschließender Reinigung an Sephadex LH-20 (Chloroform/Methanol 1:1) 1.3 mg des gelben Feststoffs **31**. Die geringe Ausbeute ist nicht repräsentativ für die Gesamtmenge des im Extrakt vorhandenen **31**. Aufgrund der schlechten Löslichkeit, besonders in Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol, zeigte die Trennung eine starke Unschärfe. Die tatsächliche Produktion kann aufgrund der Auswaage der stark angereicherten Fraktionen auf ca. 20 mg geschätzt werden. Aus der polaren Fraktion konnten durch zweifache Trennung an Sephadex LH-20 (MeOH bzw. Chloroform/Methanol 1:1) 3.3 mg des bereits aus Stamm BS 6612 bekannten Aphidicolins (**25**) isoliert werden. Die Rohproduktsäule des Myzelextrakts wurde analog zum Kulturfiltrat durchgeführt. Die Fraktionierung der Rohproduktsäule ergab neben Ergosterol (**73**) ein hydrophiles Substanzgemisch mit einer im Dünnschichtchromatogramm erst nach Färbung mit Anisaldehyd/H₂SO₄ sichtbaren Zone ($R_f = 0.18$). Diese Fraktion ergab nach Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Chloroform/Methanol 1:1) 15.9 mg des farblosen Feststoffs (**32**).

3.3.3 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus P-Kolben (Bio+)

Cephalosporolid G (**46**)

Der farblose Feststoff zeigte im Dünnschichtchromatogramm kaum Absorption von UV-Licht bei 254 nm, fluoresziert jedoch bei 366 nm und färbt mit Anisaldehyd/H₂SO₄ in der Wärme braun an. ESI und EI-MS lieferten kein aussagekräftiges Massenspektrum. Durch DCI-MS gelang die Bestimmung der Molmasse von 216 g/mol anhand der Ammonium-Addukte bei $m/z = 234 [M+NH_4]^+$ und $450 [2M+NH_4]^+$. Durch die Messung eines ¹H-NMR-Spektrums in Methanol-*d*₄ wurde die Präsenz von 14 Protonen nachgewiesen. Drei Signale einfacher Intensität lagen bei $\delta_H = 5.03$, 4.29 und 4.19, detektiert. Zwischen $\delta_H = 2.58$ und 1.98 lagen acht weitere Resonanzen einfacher Intensität und bei $\delta_H = 1.21$ das Signal einer Methylgruppe. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigte 10 Kohlenstoffatome von denen zwei mit Verschiebungen von $\delta_C = 171.5$ bzw. 212.2 Carbonyle repräsentieren. Die Analyse des HSQC-NMR-Spektrums ergab drei sauerstoff-gebundene Methingruppen ($\delta_C = 73.5$, 70.4 und 67.6), drei Methylengruppen ($\delta_C = 41.2$, 37.0 und 34.9) sowie eine Methylgruppe ($\delta_C = 19.7$).

Durch Auswertung der COSY-Korrelationen konnten diese Gruppen zu zwei Fragmententen verbunden werden, deren Verknüpfung über eine Lacton- und Ketofunktion sich aus HMBC-Korrelationen ergab (Abbildung 17). Dies führte zu einer zehngliedrige Makrolidstruktur mit OH-Gruppen in Position 3 und 4.

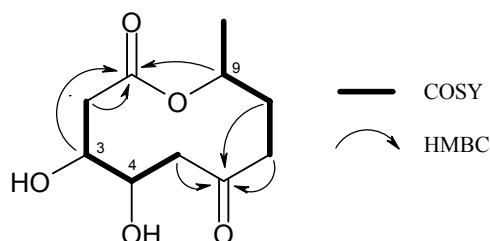


Abbildung 17: Konstitution und ausgewählte COSY- / HMBC-Korrelationen von **46**.

In der Literatur sind zwei Verbindungen dieser Konstitution bekannt, die sich durch Konfiguration an C-4 unterscheiden. Während Cephalosporolid G (**46**) eine $3S,4R,9R$ -Konfiguration mit *syn*-Anordnung der vicinalen Hydroxygruppen aufweist⁶², stehen die Hydroxygruppen in Cephalosporolid C (**45**) *anti* zueinander ($3S,4S,9R$)⁶³. Die in der Literatur angegebenen Drehwerte und NMR-Daten in Chloroform ließen sich nicht reproduzieren, weshalb die Konfiguration der stereogenen Zentren auf andere Weise bestimmt werden musste. Durch Auswertung der Kopplungskonstanten ergaben sich Hinweise auf die relative Stellung der OH-Gruppen. Das an C-4 befindliche Proton ($\delta_H = 4.29$) ist zu einem Dublett von Dublett aufgespalten und koppelt mit den diastereotopen Protonen an C-5 mit $^3J = 11.5$ Hz ($\delta_H = 2.58$) bzw. $^3J = 5.0$ Hz ($\delta_H = 2.68$). Für die Kopplung mit 3-H ($\delta_H = 4.19$) konnte eine Kopplungskonstante von 1.5 Hz bestimmt werden. Für das leicht verbreiterte Dublett von Triplet von 3-H ergaben sich neben der genannten zwei weitere Kopplungen von $^3J = 11.0$ Hz und 2.0 Hz. Das zehngliedrige Makrolidgerüst dieser Verbindungen weist eine hohe konformative Beweglichkeit auf. Nach Karplus kann zwischen 3-H und 4-H ein H-C-C-H-Bindungswinkel von ca. 60° bzw. 105° bestimmt werden⁶⁴. Dies deutet auf eine *syn*-Stellung der OH-Gruppen hin, wie sie beim Cephalosporolide G (**46**) zu finden ist.

Die relative Konfiguration von **46** wurde bisher durch Vergleich der Kopplungskonstanten mit dem durch Röntgenstrukturanalyse und Totalsynthese konfiguratив bestätigt Cephalosporolid C **45** abgeleitet. Um die absolute Konfiguration von **46** abzusichern, wurde eine von MOSHER *et. al.* für chirale sekundäre Alkohole etablierte Methode angewendet⁶⁵. Nach der separaten Veresterung des Alkohols mit einem enantiomerenreinen Derivat der

Mandelsäure und ihrem Enantiomer werden die ^1H -NMR-Spektren des so erhaltenen Diastereomerenpaares verglichen. Aufgrund der guten kommerziellen Verfügbarkeit wurde das Säurechlorid der (*R*)- bzw. (*S*)- α -Methoxy- α -trifluormethyl- α -phenyllessigsäure (MTPA) verwendet. Durch den kegelförmigen anisotropen Effekt der so eingeführten Phenylgruppe kommt es zu einer Abschirmung der räumlich nahen Protonen.

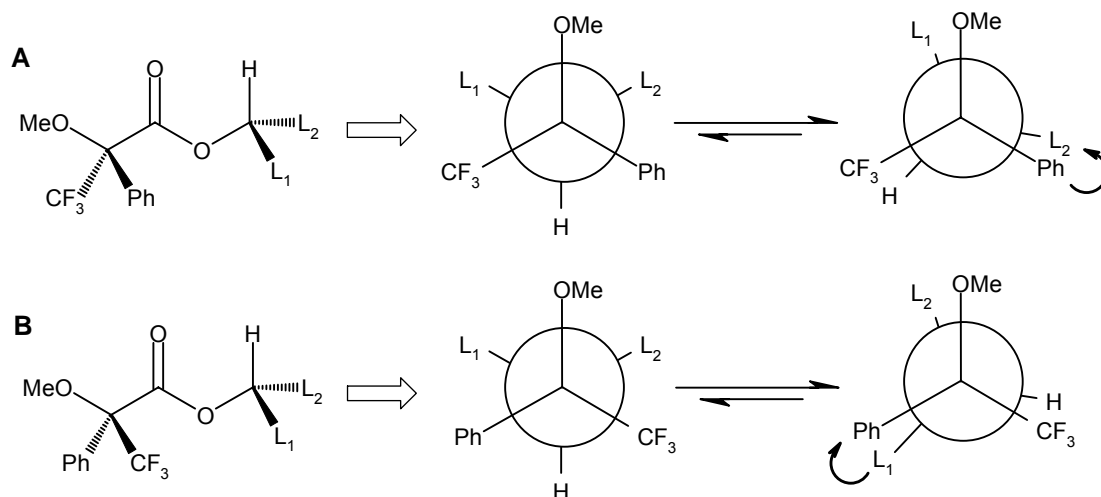


Abbildung 18: Bevorzugte Konformation der Mosher-Ester und die resultierende Abschirmung. **A:** (*R*)-MTPA, **B:** (*S*)-MTPA.

Laut einer Reihe von Berechnungen für die Energien und Populationen der möglichen Konformationen des MTPA-Esters wird bei Raumtemperatur nur eine sterisch und elektronisch bevorzugte Konformation eingenommen (Abbildung 18). Der anisotrope Effekt verursacht demnach nur bei einem der dem Carbinol benachbarten Protonen (L_1 bzw. L_2) eine Verschiebung der ^1H -Resonanzen zu höherem Feld⁶⁶. Die Carbonyl- und die stark elektronegative Trifluormethylgruppe der MTPA sind bevorzugt *synperiplanar* angeordnet und liegen durch sterische Einflüsse auf einer Ebene mit dem Carbinol-H. In der Vorzugskonfiguration des (*R*)-MTPA-Esters erfahren nur die Protonen an L_2 eine Verschiebung zu höherem Feld, während dieser Effekt beim (*S*)-Ester nur für L_1 beobachtet wird. Die Differenz ergibt somit einen positiven Wert ($\Delta\delta^{R-S} > 0$) für L_2 und einen negativen Wert für L_1 ($\Delta\delta^{R-S} < 0$). Die $\Delta\delta^{R-S}$ -Werte liefern durch Abgleich mit den empirisch von Mosher *et. Al.* bestimmten Daten die absolute Konfiguration des stereogenen Zentrums.

Bei **46** handelt es sich um ein *vicinales* Diol. Für die DMAP katalysierte Umsetzung wurden daher 2.5 Äquivalente MTPA-Chlorid und EDAC (1-(3-dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid) als zusätzlicher Aktivator eingesetzt. Obwohl für **46** neben den einfachen Estern in Position 3 bzw. 4 auch der Diester zu erwarten ist, konnte dieser auch

nach weiterer Zugabe von MTPA-Cl und EDAC im Reaktionsgemisch durch analytische HPLC (HPLC C, Programm C, Säule C) nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache lässt sich nur durch eine sterische Hinderung erklären, die durch die Einführung des ersten Äquivalents MTPA verursacht wird. Die Aufreinigung des Regioisomerenmischs erfolgte durch präparative HPLC unter der Verwendung einer Kieselgel Si-60-Säule (HPLC E, Programm D, Säule D).

Für die an Position 3 bzw. 4 veresterten Derivate gelang mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^1\text{H}/^1\text{H-COSY}$ die Zuordnung aller relevanten Protonen. Die Verschiebung der veresterten Carbinol-Protonen sollte durch die Anisotropie der Phenylgruppe nur eine sehr kleine Änderung der chemischen Verschiebung zeigen und kann somit zusätzlich zum Absolutwert der chemischen Verschiebung für die Positionsbestimmung der Veresterung verwendet werden.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen der (*R*)-MTPA und (*S*)-MTPA-Esters des an Position 3 bzw. 4 derivatisierten Cephaloporolids (**46**) und die daraus berechneten Werte für $\Delta\delta^{R-S}$.

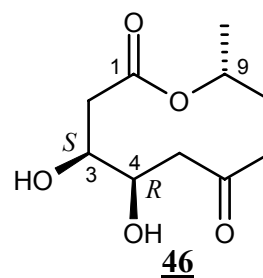
3-MTPA-Ester

Proton	δ in ppm	$\Delta\delta^{R-S}$ in ppm	Zuordnung
2-H _a	2.987 (<i>R</i>)	+0.112	L ₂
	2.875 (<i>S</i>)		
2-H _b	2.619 (<i>R</i>)	+0.084	L ₂
	2.535 (<i>S</i>)		
3-H	5.570 (<i>R</i>)	+0.018	Position des Esters
	5.552 (<i>S</i>)		
4-H	4.378 (<i>R</i>)	-0.090	L ₁
	4.468 (<i>S</i>)		

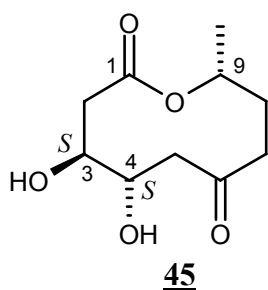
4-MTPA-Ester

Proton	δ in ppm	$\Delta\delta^{R-S}$ in ppm	Zuordnung
3-H	4.536 (<i>R</i>)	+0.048	L ₂
	4.488 (<i>S</i>)		
4-H	5.770 (<i>R</i>)	-0.006	Position des Esters
	5.776 (<i>S</i>)		
5-H _a	2.686 (<i>R</i>)	-0.148	L ₁
	2.834 (<i>S</i>)		
5-H _b	2.652 (<i>R</i>)	-0.143	L ₁
	2.795 (<i>S</i>)		

Die Berechnung von $\Delta\delta^{R-S}$ ergibt die Zuordnung von L_1 bzw. L_2 der in Abbildung 18 dargestellten Konformation. Die aus den NMR-Experimenten erhaltenen Werte für $\Delta\delta^{R-S}$ und die daraus folgenden Zuordnungen sind in Tabelle 4 dargestellt und ergeben ein homogenes Bild. Anschließend kann anhand der Prioritäten der Substituenten nach Cahn-Ingold-Prelog⁶⁷ (CIP) die Konfiguration der stereogenen Zentren bestimmt werden. Für **46** wurde die bisher angenommene $3S,4R$ -Konfiguration bestätigt.



Cephalosporolid C (**45**)



Die als farbloses Öl erhaltene Substanz absorbiert ähnlich wie Cephalosporolid G (**46**) im Dünnschichtchromatogramm UV-Licht bei 254 nm nur wenig, fluoresziert aber bei 366 nm und färbt mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 braun an. Sie unterscheidet sich von **46** durch einen höheren R_f -Wert (0.38 vs. 0.67) und zeigte ebenfalls nur im DCI-Massenpektrum Molekülpeaks bei $m/z = 234 [M+NH_4]^+$ bzw. $450 [2M+NH_4]^+$. Diese Analogie ergab erste Hinweise auf die Verwandtschaft dieser Moleküle. Die eindimensionalen NMR-Spektren bestätigten die nahe liegende Vermutung, dass es sich um ein Epimer von **46** handelt. COSY-, HSQC- und HMBC-Experimente liefern dieselbe Konstitution. Die ^{13}C -NMR-Spektren sind annähernd identisch, zeigen jedoch bei den Signalen leichte Veränderungen, die C-2 bis C-5 repräsentieren. Am größten ist der Unterschied bei C-4, das mit $\delta_C = 74.4$ um 4.0 ppm tieffeldverschoben ist. Eine Änderung der chemischen Verschiebung der stereogenen Position legt nahe, dass es sich um das 4-Epimer Cephalosporolid C (**45**) handelt. Ein Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Vermutung.

Decarestrictine

Eine der polaren Fraktionen der Rohproduktsäule fiel aufgrund ihres Anfärbeverhaltens mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 auf. In der Wärme bildete sich eine schwarze Zone ($R_f = 0.25$), die unter UV-Licht weder Absorption (254 nm) noch Fluoreszenz (366 nm) gezeigt hatte. Nach weiterer Aufreinigung an Sephadex LH-20 (MeOH) konnte ein im Dünnschichtchromatogramm einheitliches Substanzgemisch erhalten werden. Mittels DCI-Massenspektrometrie wurde eine Molmasse von 200 g/mol bestimmt. Die in $DMSO-d_6$

aufgenommenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zeigten, dass es sich bei der Probe um ein Gemisch von zwei Substanzen handelt, deren Mengenverhältnis aufgrund der Protonen-Integrale auf 5:1 bestimmt werden konnte. Für beide Substanzen wurden jeweils 16 Protonen und 10 Kohlenstoffatome angezeigt, die zum Teil eine deutliche Signalverbreiterung aufweisen. Im Folgenden werden die beiden Spektrensätze separat besprochen.

Hauptkomponente (49):

Die Hauptkomponente zeigte bei $\delta_{\text{H}} = 5.59$ ($J = 16.0, 2.5$ Hz) und 5.50 ($J = 16.0, 7.5$ Hz) zwei *trans*-ständige olefinische Protonen. Im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 5.00 - 4.00$ wurden fünf verbreiterte Signale erhalten, die Hydroxylgruppen oder *O*-substituierten Methingruppen entsprechen. Im Hochfeldbereich waren sechs Methin- oder Methylenprotonen ($\delta_{\text{H}} = 2.42 - 1.48$) sowie eine Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.08$) sichtbar. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte im Tieffeld eine Ester-CO-gruppe ($\delta_{\text{C}} = 169.0$) und eine Doppelbindung ($\delta_{\text{C}} = 132.1$ und 131.2). Die Resonanzen von drei oxygenierten Methingruppen wurden bei $\delta_{\text{C}} = 73.1, 71.7$ und 66.1 detektiert. Die verbleibenden Signale bei $\delta_{\text{C}} = 44.5, 37.3, 31.0$ bzw. 21.4 wurden anhand des HSQC-Spektrums drei Methylen- und einer Methylgruppe zugeordnet. Durch die Daten des COSY-Experiments ergab sich die lückenlose Konnektivität der Methin-, Methylen- und Methylgruppen zu einer unverzweigten Kette. Anhand der im HMBC-Spektrum erkenntlichen Korrelationen der Protonen der Methylen- bzw. Methingruppe bei $\delta_{\text{C}} = 71.7$ und 44.5 mit der Carboxylgruppe konnte das Fragment zu einem zweifach hydroxylierten Zehnring-Lacton verknüpft werden.

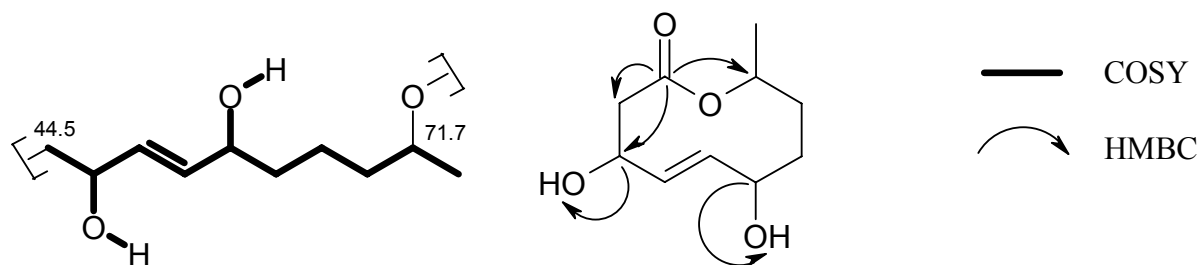


Abbildung 19: Das aus den COSY- und HSQC-Spektren abgeleitete Strukturelement und die aufgrund der HMBC-Korrelationen resultierende Struktur.

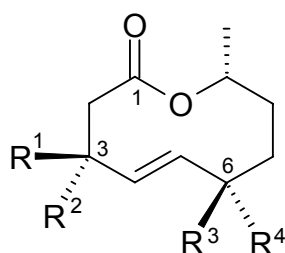
Minderkomponente (30):

Für die Minderkomponente ergab sich anhand der ^1H -, ^{13}C - und 2D-NMR-Spektren auf analogem Weg dieselbe Konnektivität wie für die Hauptkomponente **49**. Ein Vergleich der NMR Daten beider Verbindungen zeigte jedoch deutliche Unterschiede (vgl. Tabelle 5). Insbesondere die olefinischen Kohlenstoffatome und diastereotopen Protonen des an die Carbonylgruppe gebundenen Methylens deuteten auf eine unterschiedliche Konfiguration der Hydroxylgruppen und die damit verbundene konformative Änderungen hin. **49** und **30** sind Epimere.

Tabelle 5: NMR-Daten der isolierten Decarestrictine vom C-Typ. Die grau hinterlegten Felder zeigen die größte Differenz in den spektroskopischen Daten.

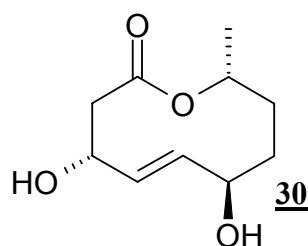
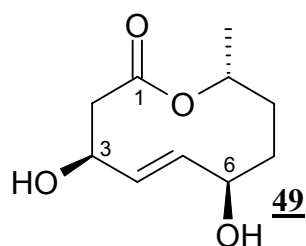
Position	Hauptkomponente		Minderkomponente	
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]
1	169.0	-	170.1	-
2	44.5	2.36 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz) 2.42 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz)	45.2	2.18 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz) 2.84 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz)
3	66.1	4.50 (m)	69.1	4.44 (m)
4	132.1	5.59 (dd, $J = 16.0, 2.5$ Hz)	127.5	5.45 (dd, $J = 19.0, 2.0$ Hz)
5	131.2	5.50 (dd, $J = 16.0, 7.5$ Hz)	137.0	5.54 (dd, $J = 19.0, 2.0$ Hz)
6	73.1	4.00 (m)	66.1	4.24 (m)
7	37.3	1.48 (m) 1.82 (ddd, $J = 11.0, 7.5, 3.0$ Hz)	29.4	1.52 (m) 1.70 (m)
8	31.0	1.48 (m) 1.66 (dd, $J = 13.0, 8.0$ Hz)	24.3	1.22 (m) 1.92 (dd, $J = 13.0, 8.0$ Hz)
9	71.7	4.64 (qd, $J = 7.0, 2.0$ Hz)	69.5	4.88 (qd, $J = 7.0, 2.0$ Hz)
10	21.4	1.08 (d, $J = 6.5$ Hz)	17.8	1.12 (d, $J = 6.5$ Hz)

In den Naturstoffdatenbanken^{43,44} findet man eine Übereinstimmung der Konnektivität mit Decarestrictin C, von dem bisher 3 Epimere bekannt sind. Decarestrictin C₁ (**33**) und Decarestrictin C₂ (**34**) werden nur gleichzeitig von einigen *Penicillium*-Spezies produziert⁶⁸. Aufgrund der NMR-Daten einer 1:1-Mischung dieser Verbindungen wurde angenommen, dass sich um Diastereomere handelt, die sich in der Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-3 unterscheiden⁶⁹. Durch Totalsynthese von **34** und Röntgenstrukturanalyse wurde die angenommene absolute Konfiguration bestätigt⁷⁰. Aus dem insektenpathogenen Pilz *Cordyceps militaris* BCC 2816 konnte Decarestrictin C₃ (**49**) isoliert werden, bei dem es sich um das C-6-Epimer von Decarestrictin C₁ (**33**) handelt und dessen absolute Konfiguration ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse belegt wurde⁷¹.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Decarestrictin C ₁ (33)	OH	H	H	OH
Decarestrictin C ₂ (34)	H	OH	H	OH
Decarestrictin C ₃ (49)	OH	H	OH	H

Die spektroskopischen Daten der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Decarestrictine vom C-Typ lassen sich mit keiner der in der Literatur angegebenen Verbindungen exakt zur Deckung bringen. Dabei muss erwähnt werden, dass in der Literatur ausschließlich in Methanol-*d*₄ gemessene NMR-Daten beschrieben werden. Da die Strukturaufklärung von **49** und **30** erst kurz vor der Fertigstellung dieser Arbeit stattfand, konnte nur noch ein ¹H-NMR-Spektrum in Methanol-*d*₄ gemessen werden. Die verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass es sich bei **49** um Decarestrictin C₃ handelt. Hierfür spricht die Ähnlichkeiten der chemischen Verschiebungen im ¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆) und die sehr gute Übereinstimmung der ¹H-NMR-Spektren (Methanol-*d*₄). Die Kopplungskonstanten der Protonen an C-2, C-4 und C-5 sind ebenfalls identisch mit **49** und implizieren eine übereinstimmende Konfiguration dieser Kohlenstoffatome. Für die Minderkomponente **30** kann, vor allem aufgrund der ungewöhnlich großen vicinale Kopplungskonstante von $J = 19.0$ Hz der olefinischen Protonen, davon ausgegangen werden, dass es sich um das bisher nicht beschriebene C-6-Epimer von Decarestrictin C₂ (**34**) handelt. Die spektroskopischen Daten der Minderkomponente **30** müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da davon ausgegangen werden muss, dass sich ähnlich zu Decarestrictin C₁ (**33**) und C₂ (**34**) ein Komplex der beiden Epimere bildet. Der Vergleich der NMR-Daten von totalsynthetisch erzeugten **34** mit den aus der 1:1-Mischung mit **33** publizierten Werten ergibt für die chemischen Verschiebungen zum Teil Änderungen von über 4 Einheiten (z.B. $\delta_C = 32.6$ vs. 36.9 für C-7).

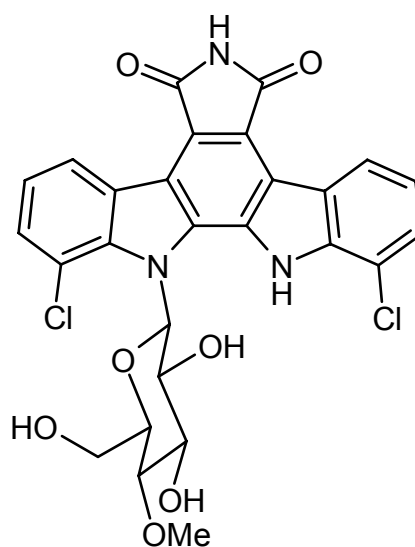


Um die hypothetische Struktur von **30** zu bestätigen, wurden weitere Daten herangezogen. Für alle Decarestrictine vom C-Typ sind in der Literatur ähnliche negative Drehwerte angegeben, so dass aus dem für die Mischung von **49** und **30** bestimmten Wert von $\alpha_D^{20} = -43^\circ$ keine weiteren Informationen erhalten wurden. Aufgrund der konformativen Beweglichkeit des Ringsystems und des hohen Anteils an **49** ist das NOE-Spektrum der Mischung ebenfalls von geringer Aussagekraft. Für eine endgültige Bestätigung der absoluten Konfiguration der beiden Verbindungen wäre zunächst eine Trennung der beiden Diastereomere nötig, die durch präparative HPLC möglich sein sollte. Anschließend könnte durch die Synthese von chiralen Mandelsäureestern (vgl. Strukturaufklärung von Cephalosporolid G (**46**)) und anschließende NMR-spektroskopische Analyse eine Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgen.

3.3.4 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus P-Kolben (SGG)

Rebeccamycin (**31**)

Im Dünnschichtchromatogramm fiel der gelbe Feststoff aufgrund seiner Eigenfarbe und gelben Fluoreszenz bei UV-Licht (366 nm) auf. UV-Absorption bei 254 nm und Intensivierung der Farbe gegenüber Anisaldehyd/H₂SO₄ sind ebenfalls charakteristisch für die Verbindung. Die Summenformel C₂₇H₂₀N₃O₇Cl₂ wurde anhand des hochaufgelösten [M-H]⁻-Ions bei $m/z = 568.068191$ und des für Dichlorverbindungen typischen Isotopenmusters bestimmt. Das ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆) zeigte bei $\delta_H = 11.33$ und 10.70 die verbreiterten Signale von zwei an Heteroatome gebundenen Protonen. Auffällig waren zwei sehr weit



Rebeccamycin (**31**)

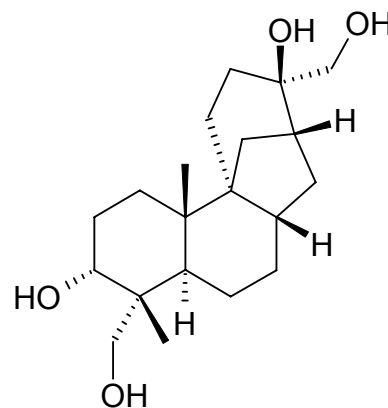
ins Tieffeld verschobene, wahrscheinlich heteroaromatische Protonen bei $\delta_H = 9.29$ (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz) und $\delta_H = 9.10$ (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz). Fünf weitere aromatische Protonen fanden sich bei $\delta_H = 7.73$ (d, $J = 7.8$ Hz), 7.69 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz) und 6.97 (d, $J = 9.0$ Hz) sowie der für zwei Protonen integrierten Resonanz bei $\delta_H = 7.45$ (t, $J = 8.0$ Hz). Drei mit D₂O austauschbare Protonen von Hydroxylgruppen zwischen $\delta_H = 5.4$ und 5.0 , sechs Protonen von Sauerstoff-gebundenen Methylen- oder Methingruppen ($\delta_H = 3.2 - 3.9$) und eine Methoxygruppe bei $\delta_H = 3.60$ vervollständigen das Bild. Die Analyse der NMR-Spektren ergab nach Datenbankabgleich^{43, 44} die Vermutung, dass es sich

bei **31** um das bisher nur aus Streptomycceten bekannte Indolcarbazol Rebeccamycin handelt. Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums mit publizierten Daten bestätigt diese Vermutung⁷². Es ist denkbar, dass **31** das Produkt einer Kokultivierung mit einem beim Animpfen der P-Kolben eingeschleppten Streptomycceten darstellt, zumal dessen gelbe Fluoreszenz unter UV-Licht (366 nm) bei den vorrangegangenen Screeningansätzen nicht beobachtet werden konnte.

Aphidicolin (**25**)

Der farblose Feststoff kann im Dünnschichtchromatogramm nur durch Anfärbung z.B. mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 (violett) identifiziert werden, da kein UV-Chromophor vorhanden ist. Die Messung eines ESI-Massenspektrums ergab Ionen bei $m/z = 677$ ($[2\text{M}+\text{H}]^+$) und 699 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$). Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR Daten ergab die Identität mit dem aus Stamm BS 6612 isolierten Aphidicolin (**25**). Die weitere Charakterisierung dieser Verbindung ist in Kapitel 3.1 detailliert beschrieben.

Die Isolierung aus *Beauveria* sp. BS 6750 verwundert nicht, da es sich um einen der Hauptmetaboliten des Bassianolon (**36**)-Produzenten *Beauveria bassiana* handelt. Bei diesem phylogenetisch sehr nahen Stamm wurde ebenfalls die Bildung der aus diesem Stamm isolierten Cephalosporide beschrieben.

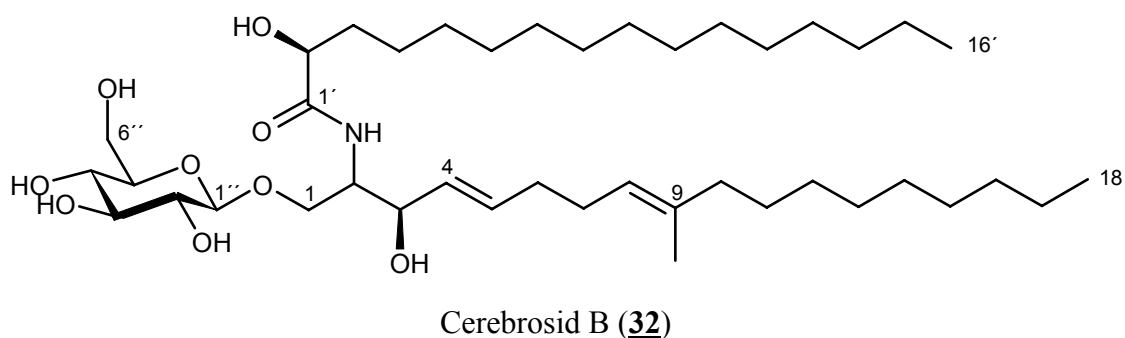


Aphidicolin (**25**)

Cerebrosid B (**32**)

Die mittelpolare Verbindung war im Dünnschichtchromatogramm erst nach Anfärbung mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 in Form eines violetten Spots zu erkennen. Das hochaufgelöste ESI-Massenspektrum des amorphen Feststoffs ergab im positiven Modus durch das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion bei $m/z = 728.566978$ eine Summenformel von $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NO}_9$. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte bei $\delta_{\text{H}} = 5.72$, 5.47 und 5.13 drei olefinische Signale. Zwischen 3.2 und 4.4 ppm waren insgesamt 12 Protonen detektierbar, was auf einen hohen Oxygenierungsgrad hinweist. Bei ungefähr $\delta_{\text{H}} = 2$ überlagerten sich die Signale von sechs Protonen, die wahrscheinlich in α -Stellung zu sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen stehen. Das Multiplett von vier aliphatischen Protonen-Resonanzen bei $\delta_{\text{H}} = 1.38$ ging in eine Signalanhäufung von insgesamt 36 Protonen bei ca. $\delta_{\text{H}} = 1.30$ über. Neben einer als Singulett erscheinenden Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.59$ war bei $\delta_{\text{H}} = 0.89$ ein Triplett für sechs Protonen zu erkennen, welches zwei weitere Methylen-benachbarte Methylgruppen repräsentiert. Im Tieffeldbereich des ^{13}C -

NMR-Spektrums wurden neben dem Signal einer Carbonylgruppe bei $\delta_C = 177.2$ vier sp^2 -Kohlenstoffatome zwischen $\delta_C = 136.8$ und 124.8 gefunden. Das Signal bei $\delta_C = 104.7$ deutete in Kombination mit den acht zwischen $\delta_C = 77.9$ und 62.7 detektierten ^{13}C -Kernen auf die Anwesenheit eines Zuckers hin. Diese Hypothese deckte sich mit der vermuteten hohen Oxygenierung der Verbindung. Die Auswertung des Hochfeld-Bereichs im ^{13}C -NMR-Spektrum ergab durch die Überlagerung von mindestens acht Signalen zwischen 30.8 und 30.2 ppm und Berücksichtigung der 1H -NMR-Spektren den Hinweis auf eine längere unverzweigte Kohlenwasserstoffkette. Die Datenbanksuche^{43, 44} anhand der gesammelten Daten führt zur Gruppe der Cerebroside. Ein genauer Abgleich der NMR-Daten, besonders des Kopplungssystem der olefinischen Protonen, ergibt für **(32)** eine eindeutige Übereinstimmung mit Cerebrosid B⁷³.



Die zur Substanzklasse der Sphingolipide und damit zum Primärstoffwechsel von Eukaryonten und Pilzen gehörenden Cerebroside zeichnen sich durch drei Strukturelemente aus: Hauptbestandteil ist das Sphingosin, welches durch *N*-Acylierung mit einer variablen Fettsäuren verknüpft ist. Die Fettsäuren können sich in ihrer Länge sowie in der Lage, Anzahl und Konfiguration der Doppelbindungen unterscheiden. An das so gebildete Ceramid ist *D*-Glucose oder *D*-Galactose O-glykosidisch gebunden (Gluco- bzw. Galactocerebroside).

Die Cerebroside sind in der Natur weit verbreitet und sind Teil des Primärstoffwechsels aller Eukaryonten⁷⁴. Namensgebend war die Entdeckung dieser Verbindungen im menschlichen Gehirn, wo sie bis zu elf Prozent der Trockenmasse ausmachen. Dort sind die Cerebroside Bestandteil des Myelins, einem Substanzmischung das unter anderem als elektrische Isolierung der Axone von Nervenfasern fungiert. Auch bei Pilzen sind die Cerebroside sehr weit verbreitete Glykolipide, allerdings wird ihnen dort eine völlig andere Funktion zugeordnet⁷⁵. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Verbindungen in Abhängigkeit von der absoluten Konfiguration an C-2, C-3 und C-2' die Ausbildung von Fruchtkörpern stimulieren⁷⁶. Im Rahmen dieser Arbeit erscheint es als besonders interessant, dass die

Cerebroside A und C eine hohe phytotoxische Wirkung aufweisen. Aus diesem Grund ist *Pyricularia oryzae*, der Erreger des Reisbrandes, ein Zielorganismus der von der BASF durchgeführten Mikrotests. Dieser phytopathogene Pilz zeigt eine hohe Produktionsrate an Cerebrosiden und löst dadurch in der Wirtspflanze einen der Apoptose ähnlichen hypersensitiven Zelltod aus⁷⁷.

3.3.5 Zur Biosynthese der isolierten Pentaketide

Sowohl für die Cephalosporolide als auch für die Decarestrictine sind in der Literatur Vorschläge zur Biosynthese der Verbindungen zu finden. Als zehngliedrige Makrolide sind diese Verbindungen typische PKS-Metaboliten (vgl. Einleitung, Seite 4), die durch Lactonisierung eines Pentaketids entstehen. Eine enzymatische bzw. chemische Modulation eines gemeinsamen Biosynthesevorläufers führt in dieser Substanzklasse zu einer Fülle von makrocyclischen Polyketiden. Obwohl die Decarestrictine und Cephalosporolide eine große strukturelle Gemeinsamkeit aufweisen, wurde bisher nicht berichtet, dass beide nebeneinander von einem Stamm gebildet werden. Die bisherigen, unabhängigen Biosynthese-Überlegungen zu diesen Verbindungen seien kurz zusammengefasst.

Cephalosporine:

OLTRA *et. al.* gelang es aus dem Cephalosporin-Produzenten *Beauveria bassiana* neben Cephalosporolid C (**45**) das strukturveranderte γ -Lacton Bassianolon (**36**) zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären⁷⁸. Durch Vergleich der Strukturen von **36** und **45** wurde der gemeinsame hypothetische Vorläufer Pre-Bassianolon (**35**) vorgeschlagen. Ausgehend von dieser Verbindung erfolgt eine Lactonisierung der terminalen Carbonsäure mit der Hydroxylgruppe an den Kohlenstoffatomen C-4 bzw. C-9.

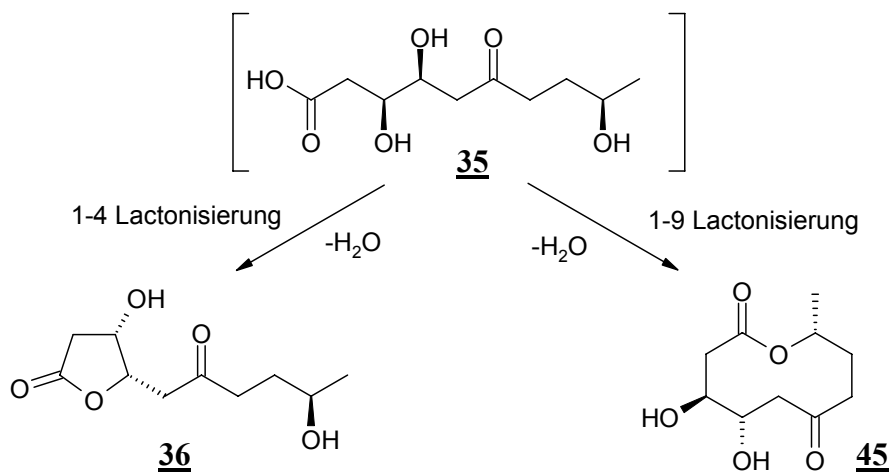


Abbildung 20: Pre-Bassianolon (**35**) als gemeinsamer Precursor von **36** und **45**

Decarestrictine:

Für die Substanzfamilie der Decarestrictine sind umfangreiche Biosynthesestudien an *Penicillium simplicissimum* durchgeführt worden⁷⁹. Durch Variation der Fermentationsbedingungen (OSMAC-Prinzip) gelang es die Decarestrictine der Typen A bis M zu isolieren⁸⁰ und ausgehend von Fütterungsexperimenten mit ¹³C- und ¹⁸O-markierten Acetat, sowie Kultivierung unter ¹⁸O₂-Atmosphäre eine hypothetische Biosynthese für diese Verbindungen zu entwickeln⁸¹. Ausgehend von einem gemeinsamen postulierten Vorläufer (**37**) werden in Abhängigkeit vom pH-Wert der Kulturbrühe alle Decarestrictine bis auf jene des C-Typs gebildet. Die Verbindungen vom C-Typ sind über diesen Vorläufer nicht direkt zugänglich, da diese im Gegensatz zu allen anderen Derivaten an Position 7 nicht *O*-substituiert sind. Erwähnenswert ist, dass an der späten Biosynthese der Decarestrictine N (**40**), D (**41**) und O (**42**) ein nicht-enzymatischer Schritt beteiligt ist. Durch Protonierung der Epoxidfunktion der an Position 3 epimeren Decarestrictine A₁ (**39**) bzw. A₂ (**38**) kommt es zur Bildung eines mesomeriestabilisierten allylischen Carbokations. Anschließend kann ein nukleophiler Angriff von Wasser an die Kohlenstoffatome C-4 oder C-6 erfolgen, dessen Regio- und Stereoselektivität abhängig von der Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-3 ist.

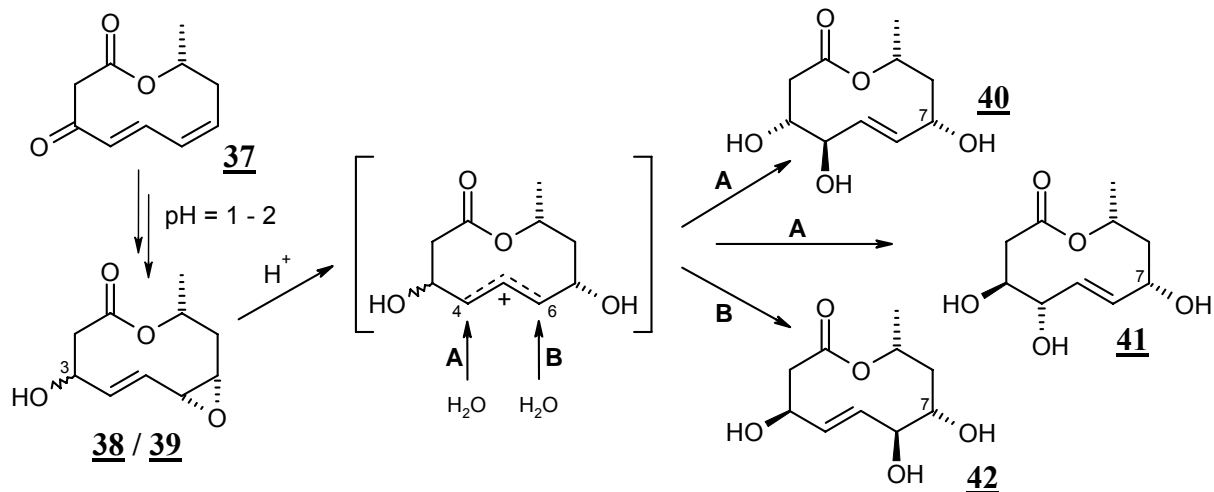


Abbildung 21: Die nicht-enzymatischen Schritte der späten Decarestrictin-Biosynthese.

Berücksichtigt man alle aus Stamm BS 6750 isolierten Pentaketide, so ergibt sich die Vermutung, dass auch hier die Biosynthese über einen gemeinsamen Vorläufer abläuft. Dieser Vorläufer muss jedoch eine von **35** und **37** unterschiedliche Struktur aufweisen. Da es sich bei den Cephalosporoliden um epimere 3,4-Diole handelt und bei (**47**) genau an diesen Positionen ein Epoxidring gefunden wird, sollte der gemeinsame Vorläufer (**43**) eine Doppelbindung an dieser Stelle aufweisen. Eine Monooxygenase könnte die Doppelbindung

zum entsprechenden Epoxid (**44**) umsetzen. Durch die *syn*-Konfiguration des Epoxids in (**47**) wird eine vorherige *Z*-Konfiguration der Doppelbindung impliziert. Das beobachtete Substitutionsmuster der isolierten Pentaketide erfordert eine Oxidation des Kohlenstoffatoms C-6 zum Keton, die erst im Anschluss an die Biosynthese des Pentaketids durch die PKS erfolgt. Die Hydrolyse eines solchen Vorläufers würde ein zum Pre-Bassianolon (**35**) analoges *anti*-Diol ergeben. Eine *syn*-Stellung der OH-Gruppen, wie in Cephalosporolid G (**46**), kann durch die Aktivität einer Epimerase erreicht werden. Ebenso ist eine *syn*-Dihydroxylierung von **43** über eine von einer Dioxygenase gebildete Peroxid-Zwischenstufe möglich, wie es z.B. für die Biosynthese der *mC*₇N-Starteinheit des Manumycins nachgewiesen werden konnte⁸². Unabhängig vom Oxygenierungsweg muss angenommen werden, dass die Epoxidbildung den ersten Schritt der späten Biosynthese dieser Verbindungen darstellt und durch dessen Stereoselektivität festgelegt wird, welches der möglichen Endprodukte gebildet wird.

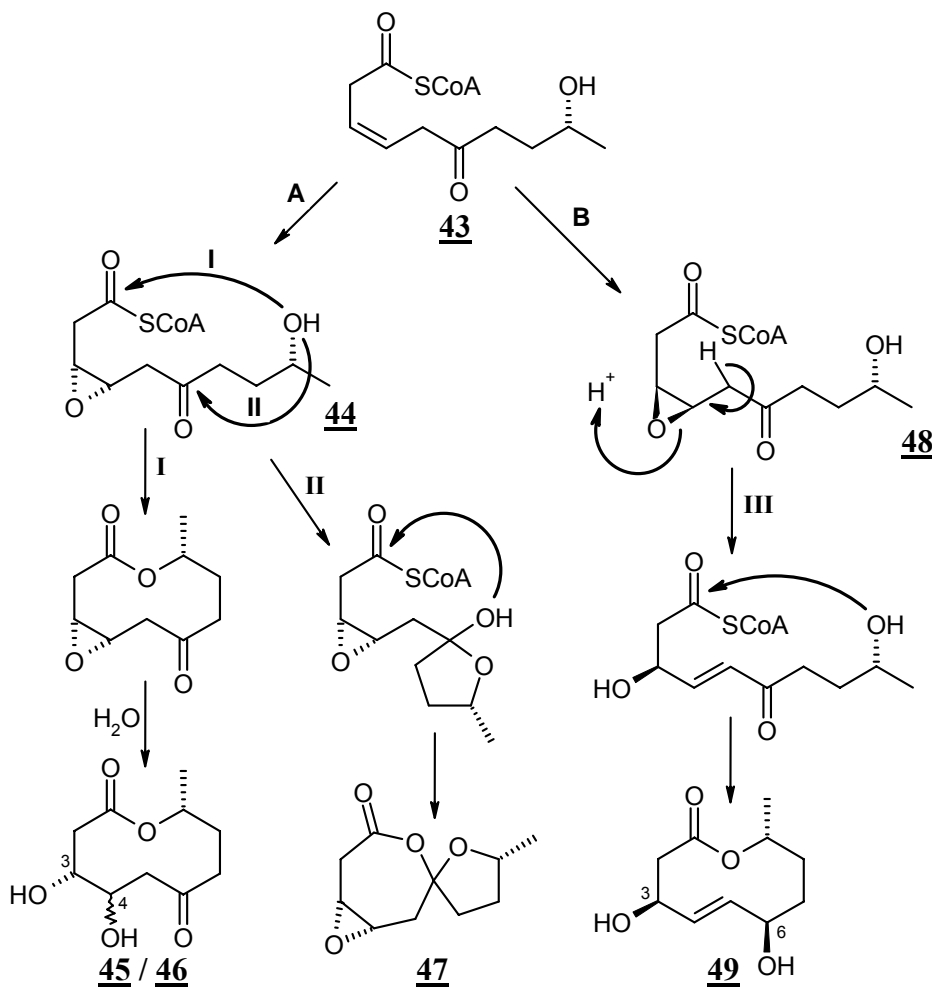


Abbildung 22: Die hypothetische Biosynthese der Pentaketide in *Beauveria* sp. BS 6750.

Führt die Oxygenierung des postulierten ungesättigten Intermediats **43** zu einem 3*R*,3*S*-konfigurierten Epoxid, so können durch 1-9 Lactonisierung (**I**), Hydrolyse des Epoxids und ggf. Epimerisierung an C-4 die Cephalosporolide **45** bzw. **46** erhalten werden. Beauveriaspirolid (**47**) ist durch Halbacetalisierung (**II**) und anschließende 1→6 Lactonisierung zugänglich. Für die Biosynthese von Decarestrictine C₃ (**49**) müsste ausgehend von **43** das 3*S*,3*R*-konfigurierte Epoxid (**48**) gebildet werden. Die Verschiebung der Doppelbindung (**C**) von C-3/C-4 nach C-4/C-5 gelingt durch eine säurekatalysierte Öffnung des Epoxids (**III**). Das entstehende Carbokation wird durch die Eliminierung eines Protons an C-4 unter Ausbildung der C-4/C-5-Doppelbindung stabilisiert. Die Triebkraft dieser Reaktion liegt in der Konjugation der Doppelbindung mit der Carbonylgruppe am Kohlenstoffatom C-6. Eine stereoselektive Reduktion des Ketons liefert die in **49** vorliegende Konfiguration der sekundären Alkohole. Die geringe Produktion von **30** deutet darauf hin, dass **44** eine Vorzugskonformation einnimmt, in der die Wanderung der Doppelbindung kinetisch gehemmt und somit die Biosynthese der Cephalosporolide bzw. von **47** bevorzugt abläuft.

3.3.6 Zur biologischen Aktivität der Pentaketide

Die Cephalosporolide und Decarestrictine gehören als Zehnring-Lactone zu den Makrolide, einer Naturstoffklasse die für ihre biologischen Aktivitäten bekannt ist⁸³. Die pilztypischen Decanolide (ca. 75 % der bekannten 50 Decanolide entstammen dieser Quelle) weisen hingegen in der Regel keine antibiotische Aktivität auf, wenn sie nicht Bestandteil einer komplexen Struktur sind⁸⁴. Dies zeigte sich auch im Plattendiffusionstest der aus *Beauveria* sp. BS 6750 isolierten Verbindungen. Weder Beauveriaspirolid (**47**), noch die Cephalosporolide oder Decarestrictine vermochten die verwendeten Testkeime in ihrem Wachstum zu hemmen. Als Ergebniss der von der BASF durchgeführten Mikrotests fehlt ebenfalls eine fungizide oder insektizide Wirkung. In der Literatur findet sich hingegen eine andere interessante Wirkung: Cephalosporolid G (**46**) hemmt ebenso wie das Gemisch der aus *Penicillium simplicissimum* isolierten Decarestrictine C₁ (**33**) und C₂ (**34**) die Cholesterin-Biosynthese. Inwiefern dies auch für Cephalosporolid C (**45**), Beauveriaspirolid (**47**) oder die Decarestrictine C₃ (**49**) und C₄ (**30**) gilt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden.

3.3.8 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Sekundärstoffspektrum von *Beauveria sp.* Stamm BS 6750

Die Arbeiten an Stamm BS 6750 haben gezeigt, dass dieser Stamm zur Synthese einer Reihe von Pentaketiden in der Lage ist. Die Verwendung des Biomalz-Nährmediums führte in P-Kolben zur Produktion der aus anderen Pilzen bekannten Cephalosporolide C (**45**) und G (**46**) sowie der Decarestrictine C₃ (**49**) und C₄ (**30**), während die Festphasen-kultivierung das neuartigen Spiroketal-Lacton Beauveriaspirolid (**47**) lieferte. Auf welche Weise der postulierte biosynthetische Vorläufer **44** cyclisiert und so zu den isolierten Verbindungen führt ist im Sinne des OSMAC-Ansatzes⁸⁵ abhängig den verwendeten Kultivierungsbedingungen. Anhand des chemischen Screenings wurde eine Abhängigkeit des Verhältnisses dieser Pentaketide vom Salzgehalt und der verwendeter Nährlösung gezeigt. Dieses wird durch die Dünnschichtchromatogramme verdeutlicht (Abbildungen 16 und 23).

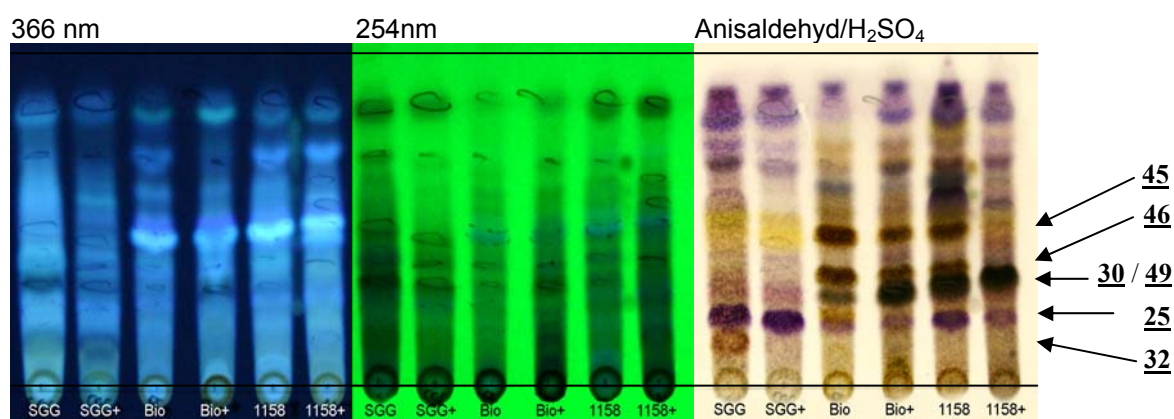


Abbildung 23: Dünnschichtchromatogramme der KF-Extrakte des chemischen Screenings in P-Kolben. (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1)

Eine Quantifizierung der Mengenverhältnisse der erhaltenen Pentaketide durch analytische HPLC oder LC-MS war aufgrund der geringen UV-Absorption und insuffizienten Ionisierbarkeit dieser Verbindungen nicht möglich. Das Biosynthesepotential dieses Stamms ist, wie durch die P-Kolben-Fermentation mit SGG-Medium gezeigt wurde, mit der Synthese der Pentaketide bei weitem nicht erschöpft. Aphidicolin (**25**) ist ein auch aus anderen *Beauveriae* bekanntes Terpenoid und wurde, wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, in P-Kolben unabhängig von der Wahl der Nährlösungen produziert. Auch bei dieser Verbindung war eine HPLC-Quantifizierung aus genannten Gründen nicht möglich.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse sollten weitere Arbeiten an Stamm BS 6750 durchgeführt werden, da sowohl die hypothetische Biosynthese der Pentaketide bestätigt als auch die Bildung von Rebeccamycin (**31**) überprüft werden sollte. Die Biosynthese der Pentaketide könnte durch Fütterungen mit ^{18}O -markierten Acetat bzw. Kultivierung unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre im Detail geklärt werden, da so eine Beteiligung der postulierten Oxidations- und Hydrolyse-Reaktionen bestätigt werden würde. Es wäre ebenfalls denkbar durch Abruch-Fermentation zu versuchen die postulierten Zwischenprodukte der Biosynthese zu isolieren. Weitere Variationen der Kultivierungsbedingungen könnten bisher nicht identifizierte Pentaketide zu Tage bringen, die aufgrund der schwachen UV-Adsorption und insuffizienten Ionisierbarkeit nicht identifiziert werden konnten. Bei *Beauveria sp.* Stamm BS 6750 handelt es sich um einen biosynthetisch vielseitig begabten Pilz, dessen Metabolitendiversität unter OSMAC-Bedingungen weiter ausgeschöpft werden sollte. Besonders der Einfluss des pH-Werts auf die Decarestrictin-Produktion in *Penicillium simplicissimum* bietet hier einen interessanten und einfachen Ansatz für weitere Kultivierungen.

3.4 Sekundärstoffe aus *Phoma sp.* Stamm BS 6771

3.4.1 Chemisches und biologisches Screening

Der Stamm BS 6771 wurde von J. BITZER einem umfangreichen chemischen Screening unterzogen. In den Extrakten der Schüttelkulturen (Medien: 1158, 1549, E2, G20 und SGG) und Ruhekulturen in P-Kolben (Medien: E2, G20 und SGG jeweils mit und ohne Zusatz von 33 g/L Kochsalz) konnten keine Sekundärstoffe in größeren Mengen nachgewiesen werden. Bei Kultivierung auf Biomalz-Agarplatten fiel hingegen im Dünnschichtchromatogramm bei 254 nm eine stark UV-absorbierende und schleifende Substanz ($R_f = 0.4 - 0.7$) auf, die mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 kräftig violett anfärbte. Der Extrakt wurde bei der BASF fraktioniert und auf biologische Aktivität getestet. Die Mikrotests ergaben im mittleren Polaritätsbereich ($R_t = 26 - 28$ min) eine gute Aktivität gegen die phytopathogenen Pilze *Pyricularia oriza*, *Septoria tritici* und in schwächerer Form gegen *Botrytis cinerea*. Im Gewächshaus wurde hingegen eine fungizide Wirkung nur gegen *Alternaria solani* beobachtet. Ein Test auf herbizide Eigenschaften gegen *Abutilon theophrasti*, *Aloperucus myosuroides*, *Avena fatua* und *Seteria faberi* war ebenfalls positiv. Diese vielfältigen Bioaktivitäten gaben Anlaß zur Isolierung und Strukturaufklärung des aktiven Prinzips.

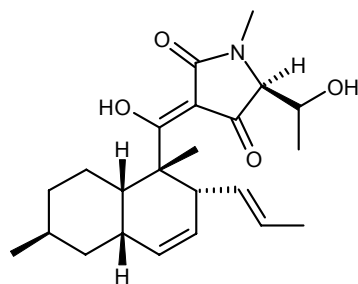
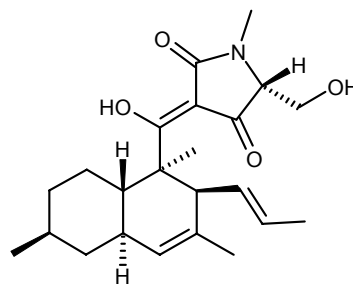
3.4.2 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

Der Ethylacetat-Rohextrakt der lyophilisierten Agarplatten (12 L) wurde an Kieselgel chromatographiert, wobei Chloroform/Methanol mit einem Gradienten von 19:1 zu 4:1 als mobile Phase gewählt wurde. Die Rohproduktsäule ergab neben Ergosterol (**73**) und der violett anfärbenden Substanz bei $R_f = 0.60$ keine Nebenkomponenten in signifikanten Mengen. Die mit der Zielverbindung angereicherte Fraktion wurde einer Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Methanol) unterzogen und ergab 124.5 mg der Reinsubstanz **50**. Es wurden keine weiteren Sekundärstoffe aus *Phoma sp.* BS 6771 isoliert.

3.4.3 Strukturaufklärung der Sekundärstoffe

Tetramsäurederivat CJ-21,058 (**50**)

Der farblose Feststoff ist gut in Methanol, Chloroform und Aceton löslich. Bei der Dünnschichtchromatographie ist die Substanz durch eine starke UV-Absorption (254 nm) und einer violetten Färbung bei Reaktion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 zu erkennen. Charakteristisch ist ebenfalls das ausgeprägte „Schleifen“ der Substanz, welches die Bestimmung des R_f -Werts erschwert und auch durch Zugabe von Ameisensäure zur mobilen Phase nicht unterdrückt werden kann. Das HR-ESI-Massenspektrum weist Molekülpeaks bei 388.248245 $[M+H]^+$ und 410.230219 $[M+Na]^+$ auf, woraus sich die Summenformel von $C_{23}H_{33}NO_4$ ergab. Das UV-Spektrum zeigt im neutralen Milieu Absorptionsmaxima bei 252 und 293 nm. Das Maximum bei kürzerer Wellenlänge erfährt durch Zugabe von Säure eine hypochrome Verschiebung auf 233 nm. Im basischen Milieu bleibt die Wellenlänge konstant, jedoch erhöht sich die Absorption deutlich und es tritt ein zusätzliches Maximum bei 211 nm auf. Die starke pH-Abhängigkeit der Intensitäten ist typisch für enolisierbare Chromophore⁸⁶. Im CD-Spektrum sind zwei relativ starke, positive Cotton-Effekte bei 205 und 289 nm zu erkennen, ein Hinweis auf eine starre, cyclische Grundstruktur. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Absorptionsbanden konjugierter Ketone ($1695, 1659\text{ cm}^{-1}$). Die Suche im *Dictionary of Natural Products* (DNP)⁸⁷ mit diesen Daten führte zur Substanzklasse der Tetramsäuren, genauer der Setine. Mit der Summenformel $C_{23}H_{33}NO_4$ fanden sich zwei mögliche Verbindungen, die mit der aus Stamm BS 6771 isolierten identisch sein konnten: Cissetin⁸⁸ (**51**) und CJ-21,058 (**50**)⁸⁹.


 Cisetin (**51**)

 CJ-21,058 (**50**)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Komponente in Methanol- d_4 zeigte im olefinischen Bereich zwei verbreiterte Signale einfacher Intensität bei $\delta_{\text{H}} = 5.12$ und 5.25 sowie ein Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 5.17$. Im Bereich der *O*-benachbarten aliphatischen Protonen erkannte man eine Methylengruppen mit diastereotopen Protonen ($\delta_{\text{H}} = 3.95$ dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz bzw. $\delta_{\text{H}} = 3.88$; dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz) und zwei Methingruppen mit verbreiterten Resonanzen bei $\delta_{\text{H}} = 3.64$ sowie 3.14 . Bei $\delta_{\text{H}} = 3.03$ fand sich ein für eine *N*-Methylgruppe charakteristisches Singulett entsprechender Intensität. Vier weitere Methylgruppen befanden sich im aliphatischen Bereich bei $\delta_{\text{H}} = 1.57$ (s), 1.53 (d, $J = 5.5$ Hz), 1.41 (s) und 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz). Neben diesen Signalen war im Hochfeld-Bereich eine Reihe von zum Teil überlappenden Signalen zu verzeichnen, welche neun CH-Gruppen zugeordnet werden konnten. In Diskrepanz zur Summenformel wurden im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur 31 Protonen erfasst, weshalb die Verbindung über zwei acide, austauschbare Protonen verfügen muss. Eine Auswertung des $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums war aufgrund starker Verbreiterungen einiger Signale und damit einhergehender Abnahme der Peakhöhe nicht in ausreichendem Umfang möglich, widerlegte aber nicht die bisherigen Annahmen. Die Analyse der spektroskopischen Daten war konform zu der Annahme, dass es sich bei der isolierten Verbindung um CJ-21,058 (**50**) oder ein Stereoisomer handelt. Aufgrund der uneinheitlichen Konfiguration des Decalinsystems innerhalb der Setine (vgl. Kap. 3.4.4) und der starken Signalverbreiterungen waren weitere Experimente nötig, um die Konnektivität zu beweisen und die Stereochemie zu bestimmen. Es ist bekannt, dass die Derivate der Tetramsäuren zur Tautomerisierung neigen, was zu einer starken Verbreiterung der Signale in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Experiment führt. Im Rahmen der Strukturaufklärung von Equisetin (**52**) wurde gezeigt, dass es zwei Möglichkeiten gibt, die Signalschärfe signifikant zu erhöhen⁹⁰. Es ist möglich, die Carbonylgruppe in Position 4' der Tetramsäure in der enolisierten Form zu stabilisieren, indem ein verbrückendes Phenylboran mit der OH-Gruppe an C-6' gebildet wird.

Dies gelingt durch milde Reaktion von Phenylboronsäure mit **52** unter Verwendung von Benzol als Lösungsmittel. Eine einfachere Möglichkeit besteht darin, durch Herabsetzen der Temperatur während der NMR-Messung, das 1-Enol (**52b**) zu stabilisieren und somit NMR-Spektren in zum Phenylboran (**52a**) vergleichbarer Qualität zu erhalten.

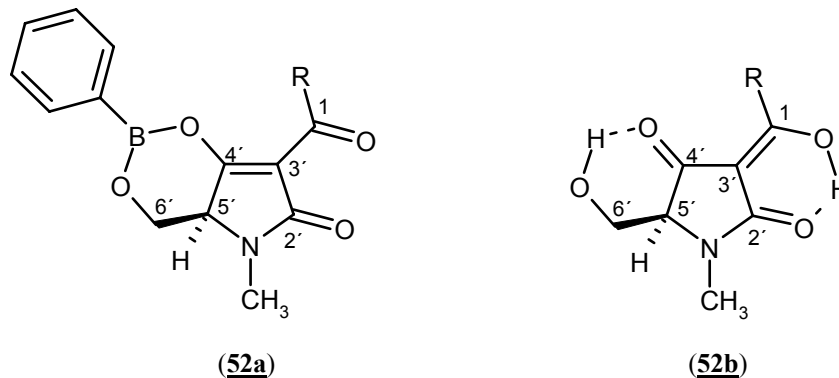


Abbildung 24: Stabilisierte Enole des Equisetins (**52**).

Die NMR-Messungen von **50** bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CD_2Cl_2) zeigten die erwartete Verbesserung der Auflösung und führten zu einem qualitativ auswertbaren Spektrensatz. Vor allem die ^{13}C -Resonanzen der Tetramsäure bei $\delta_{\text{C}} = 190.7$ (C-4'), 176.9 (C-2'), 100.2 (C-3'), 67.1 (C-5') und 59.6 (C-6'), die bei Raumtemperatur die stärksten Verbreiterungen zeigten, traten nun klar hervor. Mittels eines HSQC-Spektrums gelang die vollständige Korrelation von Kohlenstoffatomen und Protonen. Die verbesserte Auflösung der ^1H -Signale für die olefinische Seitenkette bei $\delta_{\text{H}} = 5.10$ (13-H) und $\delta_{\text{H}} = 5.20$ (14-H) erlaubte die Bestimmung der *trans*-Konfiguration der Doppelbindung anhand der vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 16.0$ Hz. Die Analyse der $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY- und HSQC-Spektren bestätigte die Identität mit CJ-21,058 (**50**).

Durch die konformative Beweglichkeit und die für kondensierte Alicyclen üblichen Fernkopplungen innerhalb des Decalinsystems ist eine genaue Bestimmung der Kopplungskonstanten und damit der relativen Konfiguration erschwert. Durch Interpretation der Multiplizitäten im ^1H -NMR-Spektrum kann jedoch die Anzahl der pseudo-axial-axialen Kopplungen bestimmt werden, da sich diese mit $^3J_{\text{ax,ax}} = 8 - 13$ Hz von den pseudo-äquatorial-axialen ($^3J_{\text{eq,ax}} = 2 - 6$ Hz) bzw. pseudo-äquatorial-äquatorialen Kopplungen ($^3J_{\text{eq,eq}} = 2 - 5$ Hz) eindeutig unterscheiden lassen. Eine Ableitung der relativen Konfiguration gelingt, wenn man näherungsweise Kopplungen kleiner als 6 Hz vernachlässigt und für geminale und pseudo-axial-axiale Kopplungen eine einheitliche Größe von 12 Hz annimmt.

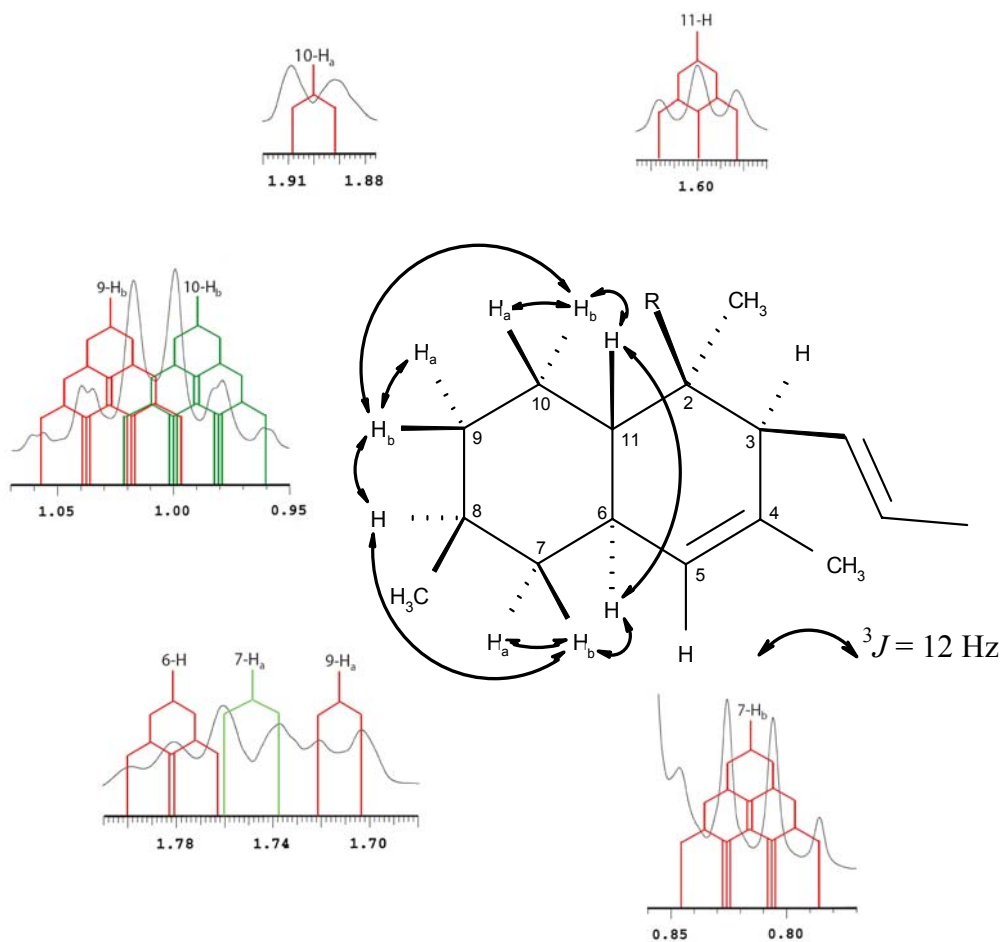


Abbildung 25: Relative Konfiguration des Decalinsystems von (**50**). Überlagerung der ausgehend von pseudo-axial-axialen Kopplungen (${}^3J = 12$ Hz) konstruierten Multipletts mit Spreizungen der relevanten ${}^1\text{H}$ -NMR-Resonanzen (600 MHz, -20 °C, CD_2Cl_2).

Ansatzpunkt für die Bestimmung ist die Resonanz von 6-H bei $\delta_{\text{H}} = 1.78$, die zunächst zu einem verbreiterten Triplett aufgespalten zu sein scheint. Verursacht wird das Triplett durch zwei Kopplungen von ca. 12 Hz und weiteren kleinen Kopplungen von 0 - 2 Hz, die für die Verbreiterung des Signals verantwortlich sind. Das breite Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 5.13$ repräsentiert 5-H und erscheint im Spektrum als verbreitertes Singulett. Aufgrund der sp^2 -Hybridisierung des Kohlenstoffatoms an Position 5 ist eine pseudo-axial-axiale Anordnung von 5-H und 6-H nicht möglich. Die Aufspaltung von 6-H zu einem Triplett beweist somit, dass sich sowohl 6-H als auch 11-H in einer pseudoaxialen Position befinden und das bicyclische Decalinsystem folglich *trans*-verknüpft ist. Die Signale von 7- H_b ($\delta_{\text{H}} = 0.82$), 9- H_b ($\delta_{\text{H}} = 1.02$) und 10- H_b ($\delta_{\text{H}} = 1.00$) sind jeweils zu Quartetts aufgespalten. Diese Situation ist nur denkbar, wenn sich die Methylgruppe an C-8 in pseudoäquatorialer Position befindet und somit jedes dieser Protonen durch seine pseudoaxiale Stellung zwei pseudo-axial-axiale und eine geminale Kopplung erfährt. Die pseudoäquatorialen Protonen an C-7 ($\delta_{\text{H}} = 1.75$), C-9 ($\delta_{\text{H}} = 1.71$) und

C-10 ($\delta_{\text{H}} = 1.90$) erscheinen als Dubletts, was die bisherigen Annahmen unterstützt. Für 11-H findet sich wie für 6-H ein Triplett ($^3J = 12 \text{ Hz}$), wodurch sich die relative Konfiguration des linken Ringsystems ergibt (vgl. Abbildung 25).

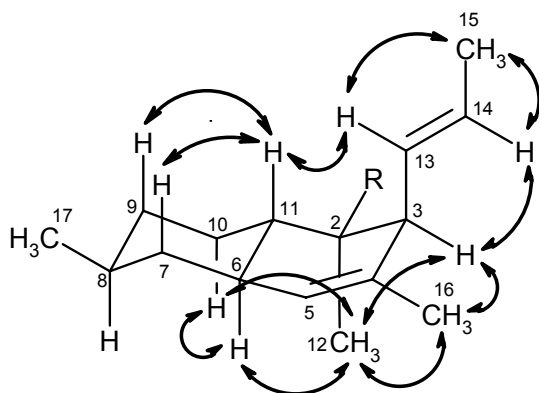


Abbildung 26: NOE-Korrelationen in **50**.

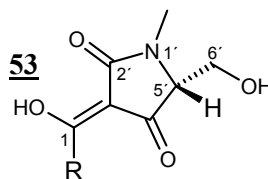
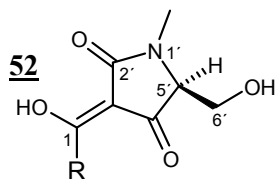
Über die relative Konfiguration der Kohlenstoffatome an Position 2 und 3 sowie des Pyrrolidinendions kann auf diesem Weg keine Aussage gemacht werden. Hier half eine Bestimmung über die im NOE-Experiment beobachteten Korrelationen (siehe Abbildung 26). Die räumliche Nähe von 11-H zur ungesättigten Seitenkette (13-H) ist nur

möglich, wenn sich beide auf der gleichen Seite des Ringsystems befinden. Diese 1,3 diaxialen Wechselwirkungen finden sich auch für 6-H und die mit 12 bezifferte Methylgruppe. Die aufgrund der Kopplungsmuster bestimmte relative Konfiguration des übrigen Decalinsystems wird durch das NOE-Spektrum bestätigt. Weitere Informationen liefert die Auswertung des CD-Spektrums von **50** und Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten von Equisetin (**52**) und Phomasetin (**53**)⁹¹. Diese beiden Verbindungen sind vollständig entgegengesetzt konfiguriert, was bei **52** zu durchgehend negativen und bei **53** zu positiven Cotton-Effekten führt. Die absolute Konfiguration der Tetramsäure an Position 5' hat keinen Einfluß auf das Vorzeichen der Cotton-Effekte, wie Epimerisierungsexperimente an **52** und **53** gezeigt haben. Da auch **50** ausschließlich positive Cotton-Effekte erzeugt, kann angenommen werden, dass das Decalinsystem analog zu Phomasetin (**53**) konfiguriert ist.

Für die prochiralen Protonen von C-6' konnte anhand der C-5'-Epimere von Equisetin (**52**) und Phomasetin (**53**) gezeigt werden, dass die Differenz ihrer chemischen Verschiebungen Abhängig von der absoluten Konfiguration von C-5' ist. Im Falle einer 5*R*-Konfiguration zeigen 6-H_a und 6-H_b einen geringeren Unterschied als die 5'*S*-konfigurierten Epimere. Überträgt man diese Kenntnisse auf **50** und vergleicht die chemischen Verschiebungen mit denen von **52** und **53** so ergibt sich die absolute Konfiguration als 5'*R*.

Tabelle 6: Vergleich der Protonenresonanzen für die Tetransäure-Einheit.

Position	δ_{H} Equisetin (52) (CDCl ₃)	δ_{H} Phomasetin (53) (CD ₃ CN)	δ_{H} CJ-21058 (50) (CD ₂ Cl ₂)
6'-H _a	3.90 (dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz)	3.80 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz)	3.85 (dd, $J = 11.5, 3.5$ Hz)
6'-H _b	4.07 (dd, $J = 12, 3.5$ Hz)	3.87 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz)	3.94 (dd, $J = 11.5, 3.0$ Hz)
$\Delta\delta$	0.17	0.07	0.09



In der Literatur wurde bisher lediglich aufgrund der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome und der bei Raumtemperatur zugänglichen Kopplungskonstanten vermutet, dass Phomasetin (**53**) und CJ-21,058 (**50**) über die gleiche relative Konfiguration verfügen. Diese Hypothese kann aufgrund der Tieftemperaturmessungen, NOE-Experimente und CD-Spektren weiter gefestigt werden. Darüber hinaus kann die absolute Konfiguration von **50** ausgehend von den hier beschriebenen Daten und Vergleich mit dem durch eine Totalsynthese⁹² bestimmten Equisetin (**52**) als 2*R*, 3*R*, 6*S*, 8*S*, 11*S*, 5'*R* angegeben werden.

3.4.4 Die Substanzklasse der Setin-Antibiotika

Allgemeines

In den späten sechziger Jahren wurden vermehrt Untersuchungen durchgeführt inwiefern Mykotoxine an der Entstehung von Leukämie beteiligt sein könnten. Ausschlaggebend hierfür waren Berichte über die Erkrankung mehrerer Personen, die in einem von Schimmelpilzen befallenen Haus lebten⁹³. Aus diesem Grund untersuchten BURMEISTER *et. al.* eine Reihe von Fusarien, die schon im Vorfeld für ihre pathogenen Eigenschaften bekannt waren⁹⁴. Die Arbeiten an *Fusarium equiseti* führten schließlich zum Equisetin (**52**), dem ersten Vertreter dieser biologisch potenten Mykotoxine. Es folgten weitere Analoga wie Cissetin (**51**) und Phomasetin (**53**), die ebenfalls aus Pilz-Extrakten isoliert wurden.

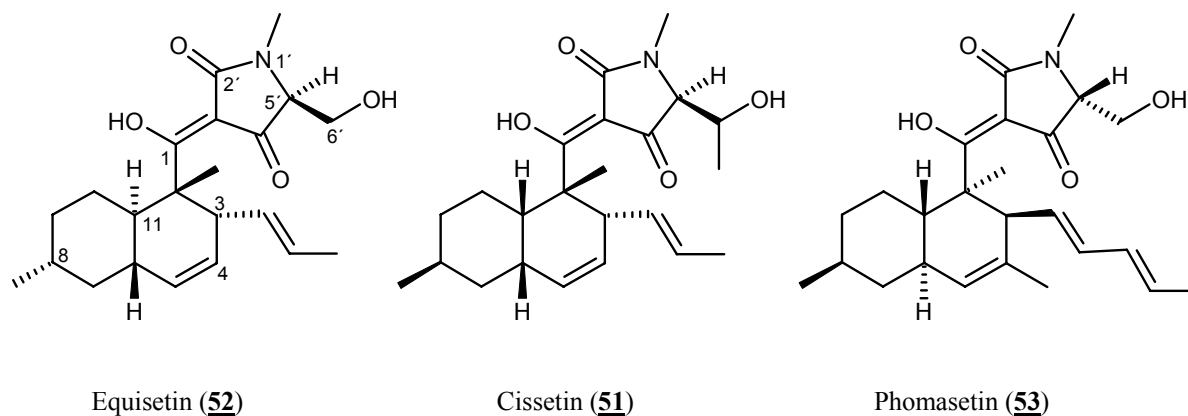


Abbildung 27: Strukturelle Variabilität der Setine anhand ausgewählter Beispiele.

Kennzeichnend für die Struktur aller Setine ist ein von einem Polyketid abgeleitetes Decalinsystem, welches eine aus dem Aminosäurestoffwechsel stammende 3-Acyltetramsäure (2,4-Pyrrolidinendion) als Seitenkette trägt. Variationen der Struktur findet man zum einen hinsichtlich der Stereochemie zum anderen bei den Substituenten an den Kohlenstoffatomen der Positionen 2, 3, und 6' sowie am Stickstoff des Pyrrolidinendions. Anfang 2007 waren in der Literatur 29 Naturstoffe bekannt, die eine hohe Struktur analogie zu Equisetin (**52**) aufweisen. Elf Verbindungen verfügen über eine veränderte Tetramsäure-Einheit und können ebenfalls zu dieser Substanzklasse gezählt werden.

Biologische Aktivität

Typisch für die Derivate der 3-Acyltetramsäuren ist eine breite biologische Aktivität. Neben einer hohen antibiotischen und antiviralen Wirkung finden sich zusätzlich auch antiulcerale, cytotoxische oder fungizide Eigenschaften, wodurch sie immer wieder in das Interesse der pharmakologischen und synthetischen Forschung gerückt sind⁹⁵. Die Schattenseite, besonders der Setine, liegt jedoch häufig in einer damit einhergehenden toxischen Wirkung, die ihre Verwendung als Arzneistoff verhindert. Dennoch haben sie als pharmakologische Tools bzw. Testsubstanzen einen Beitrag zur Antibiotikaforschung geleistet. Unter den Setinen finden sich einzigartige Wirkmechanismen und ausgezeichnete Aktivitäten gegen verschiedene multiresistente Keime, wie MRSA, MSSA oder vancomycinresistente Enterococci. Dies sei am Beispiel des Equisetins (**52**) verdeutlicht. Neben einer starken antibiotischen Wirkung gegenüber gram-positiven Erregern (MIC = 0.5 – 4.0 µg/mL) ist z.B. bei Mäusen ein LD₅₀-Wert von 63 mg/kg zu verzeichnen⁹⁶. Die toxische Wirkung wird auf Wechselwirkungen mit energieabhängigen Reaktionen in den Mitochondrien zurückgeführt. Dies konnte an den Mitochondrien aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie aus Rattenleber nachgewiesen

werden, wobei unterschiedliche Wirkmechanismen zum Tragen kommen. Equisetin ist bei Mikroorganismen in der Lage, die Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat durch die Pyrophosphatase zu stimulieren und den Mitochondrien auf diesem Weg Energie zu entziehen⁹⁷. Bei Säugetieren kommt es durch Equisetin zu einer Blockade der Anionen-Carrier für ATP, Orthophosphat und Succinat innerhalb der inneren Mitochondrienmembran, während die Elektronentransportkette nicht direkt beeinträchtigt wird⁹⁸. Ebenso werden beim photosynthetisierenden Bakterium *Rhodospirillum rubrum* die lichtinduzierte Protonenaufnahme, die lichtinduzierte Carotenoid-Absorptionsverschiebung, die Photophosphorylierung sowie die Hydrolyse von ATP und anorganischem Phosphat inhibiert⁹⁹.

So ist es nicht verwunderlich, dass für Pflanzen die Wirkung von Equisetin ebenfalls verheerend ist. Besonders junge Keimlinge und verletzte Pflanzen reagieren bereits bei Konzentrationen von 5 µg/mL mit Nekrosen bzw. über 90 % verlangsamten Wachstum¹⁰⁰. Equisetin (**52**) zeigt darüber hinaus eine stark inhibitorische Wirkung auf die HIV-1 Integrase. Dieses Enzym ist essentiell für die Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle und sehr spezifisch für HIV. Da die HIV-Integrase im Wirtsorganismus nicht vorhanden ist, bietet sie ein potentiell Ziel für die Entwicklung hoch selektiver Anti-HIV-Chemotherapeutika.

Die biologische Wirkung der anderen Setine ist bei weitem nicht so breit untersucht worden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass auch bei diesen Verbindungen ein ähnliches Potenzial vorliegt, wobei die Wirkorte sich von Derivat zu Derivat z. T. erheblich unterscheiden. Der jüngste Vertreter der Setine, F01-221A (**54**), wurde im Rahmen eines Screenings nach Inhibitoren der menschlichen Leukozyten-Elastase als sehr potenter Wirkstoff aus einem Pilzextrakt isoliert¹⁰¹. Die Leukozyten-Elastase ist eine Serinproteinase, die in den Granula von Neutrophilen und Monozyten vorkommt. Dieses Enzym erfüllt eine ganze Anzahl biologisch wichtiger Aufgaben, beispielsweise ist es sehr wichtig bei der Abtötung von Bakterien, beim Abbau von Gewebsresten während der Wundheilung und beim Übertritt von Neutrophilen und Monozyten aus dem Gefäßsystem in das Gewebe. Kommt es jedoch zu einem unkontrollierten Aktivitätsanstieg der Leukozyten-Elastase, kann dieses Enzym normales Gewebe schädigen oder proinflammatorisch wirken, wie es z.B. bei einigen obstruktiven pulmonalen Erkrankungen der Fall ist¹⁰². Die inhibitorische Wirkung wird durch die Addition eines im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisierten, stark nukleophilen Serin-Rests an die C-1 Carbonylgruppe der Tetransäure verursacht. Für Conioisetin, das Enantiomer des Phomasetins, ist in der Literatur eine fungizide Wirkung beschrieben.

Die antibiotische Aktivität von CJ-21,058 erfolgt über die Hemmung der SecA-Untereinheit der bakteriellen Translokase ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$). Durch die Inhibition dieses Enzyms ist der Transport von Signalproteinen durch die innere Membran (Translokation) nicht mehr möglich. Die SecA-Untereinheit ist für die Kopplung der bei der ATP-Hydrolyse freigesetzten Energie mit der Translokation der Preproteine zuständig¹⁰³. Das Preprotein wird iterativ an die SecA-Untereinheit gebunden und anschließend in Schritten von 20-30 Aminosäuren über einen „Nähnadelmechanismus“ durch die Membran geschleust. Dies geschieht durch wiederholte Zyklen eines ATP-abhängigen Insertieren und Deinsertieren von SecA in die Membran von der dem Cytoplasma zugewandten Membranseite. Equisetin (**52**) und Phomasetin (**53**) zeigen bei annähernd gleicher antibiotischer Wirkung eine wesentlich geringere Affinität zur SecA-Untereinheit (weniger als 50 % Inhibition bei 20 $\mu\text{g/mL}$). CJ-21,058 repräsentiert somit den ersten Vertreter einer neuen Klasse von Antibiotika, da bis dato die Hemmung von SecA nur über monoklonale Antikörper oder Natriumazid möglich war. Die im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts durchgeführten biologischen Tests haben für CJ-21,058 ebenfalls fungizide und darüber hinaus herbizide Eigenschaften gezeigt. Die Mikrotest der Reinsubstanz **50** haben eine starke Hemmung des Wachstums der pathogenen Pilze *Botrytis cinera* (7 ppm), *Pyricularia oryzae* (<0.1 ppm), *Septoria tritici* (0.5 ppm) und *Phytophthora infestans* (0.5 ppm) ergeben. Durch Plattendiffusionstest konnte die fungizide und selektive antibakterielle Wirkung auf Gram-positive Erreger bestätigt werden. Die Durchmesser der Hemmhöfe betragen 34 mm (*Candida albicans*), 29 mm (*Staphylococcus aureus*) bzw. 43 mm (*Bacillus subtilis*). Die in der Literatur angegebene cytotoxische Wirkung konnte nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die stereochemischen Variationen innerhalb der Setine ihre Affinitäten zu einem bestimmten Wirkort beeinflussen, während die Ursache der biologische Aktivität in der Nukleophilie der Tetramsäureeinheit liegt. Dies zeigt sich in den annähernd gleichen Aktivitäten gegen gram-positive Erreger. Es wäre angebracht, die Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen den aktiven Zentren der inhibierten Enzyme und den entsprechenden Setinen weiter zu untersuchen, um in Zukunft weitere Wirkorte vorhersagen zu können und synthetische Wirkstoffe zu entwickeln, die über eine geringere Toxizität verfügen. Ferner sollten weitere Tests zur biologischen Aktivitäten vorgenommen werden, um zu überprüfen ob nicht eventuell alle Setine über cytotoxische, phytotoxische oder fungizide Wirkungen verfügen, da in der Literatur bisher nicht alle Daten zugänglich sind (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die biologische Aktivität ausgewählter Setine, soweit verfügbar.

Derivat	Literatur	gram-(+) MIC [$\mu\text{g/mL}$]	phytotoxisch	cytotoxisch IC ₉₀ [$\mu\text{g/mL}$]	fungizid	besondere Aktivität
Equisetin (<u>52</u>)	[96]	1.0 (<i>S. aureus</i>) 1.0 (<i>E. faecalis</i>)	+	-	-	HIV-1 Integrase- Inhibitor
Epi-Equisetin	[100]	-	+	-	-	-
Trichosetin	[104]	4.4 (<i>S. aureus</i>) 4.4 (<i>E. faecalis</i>)	+	-	-	-
Cissetin (<u>51</u>)	[88]	~4 (<i>S. aureus</i>) ~4 (<i>E. faecalis</i>)	+	-	-	-
Phomasetin (<u>53</u>)	[91]	-	-	-	-	HIV-1 Integrase- Inhibitor
Coniosetin	[105]	0.3 (<i>S. aureus</i>) 2.5 (<i>E. faecalis</i>)	-	-	+	-
Oxasetin	[106]	16.0 (<i>S. aureus</i>) 16.0 (<i>E. faecalis</i>)	-	-	-	-
CJ-21,058 (<u>50</u>)	[89]	~5 (<i>S. aureus</i>) ~5 (<i>E. faecalis</i>)	-	32 $\mu\text{g/mL}$	0.5 (Ph. infestans) <0.1 (<i>P. orizae</i>)	SecA-Inhibitor
Cryptocin	[107]	-	-	-	0.78 (Ph. Cinnamoni) 0.39 (<i>P. orizae</i>)	-
F01-221A (<u>54</u>)	[101]	-	-	-	-	Leukozyten- Elastase Inhibitor

+ = biologische Aktivität nicht quantifiziert / - = Aktivität nicht dokumentiert

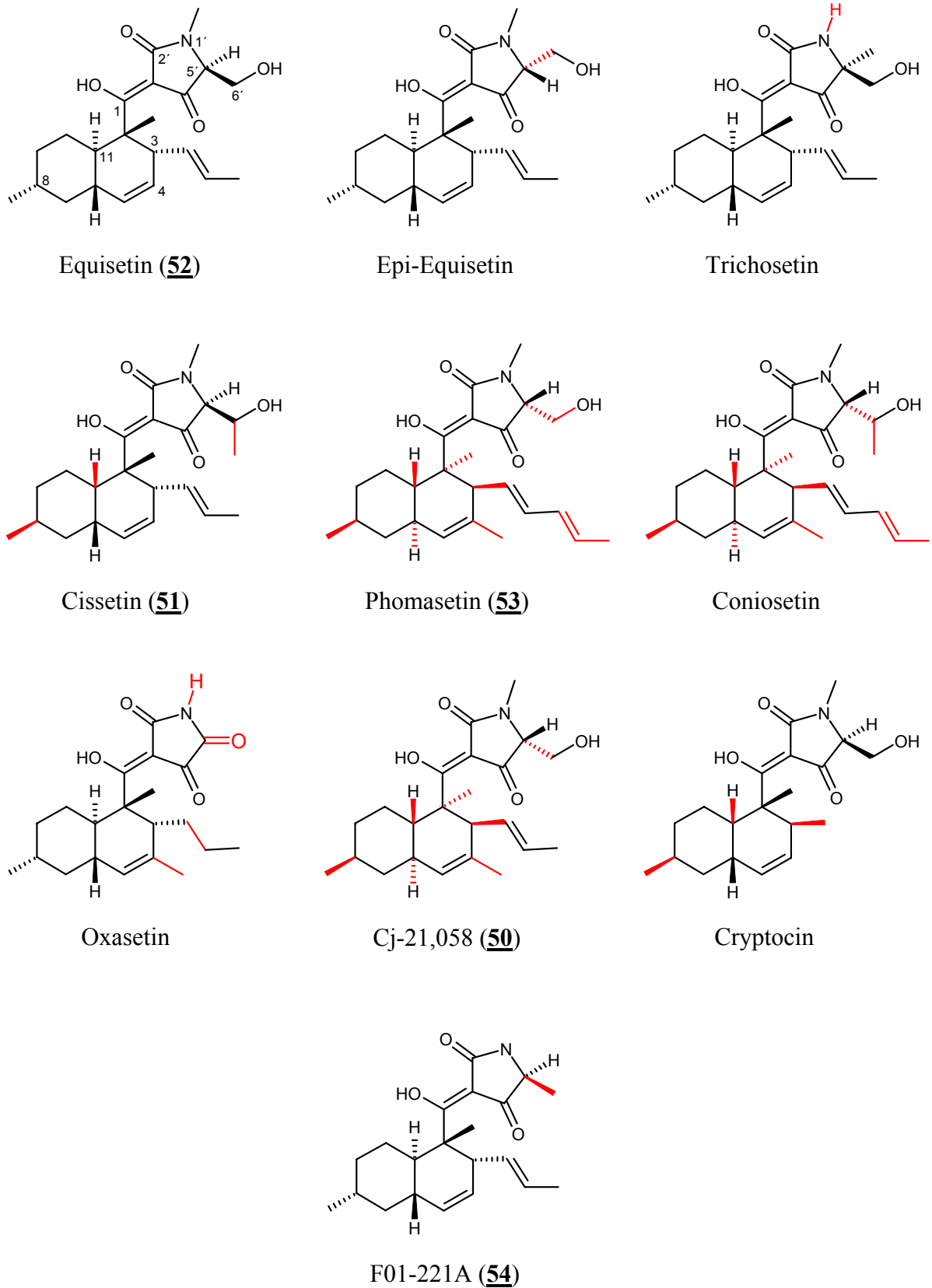
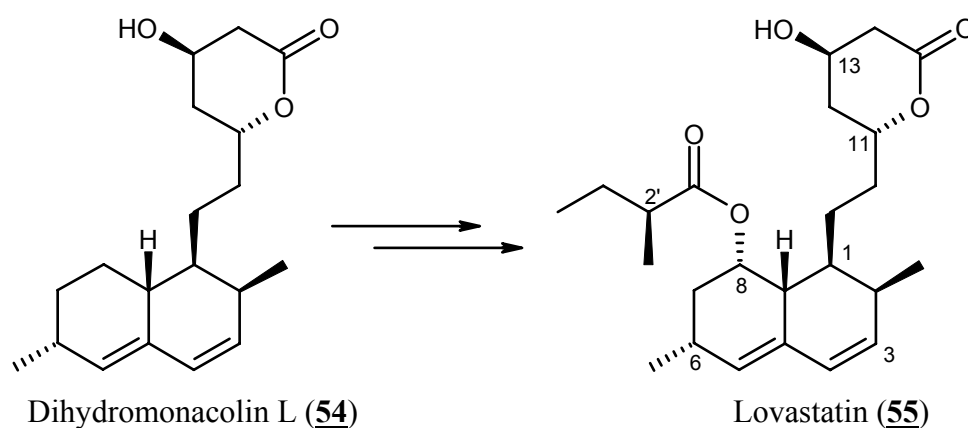


Abbildung 28: Die Strukturen der in Tabelle 7 angegebenen Setin-Derivate. Die Änderungen gegenüber Equisetin (52) sind rot hervorgehoben.

Biosynthese

Die Biosynthese des Equisetins wurde auf genetischer Ebene von SIMS *et. al.* untersucht¹⁰⁸. Das carbocyclische System zeigt eine große Ähnlichkeit zum *Aspergillus terreus*-Metaboliten Lovastatin (**55**), einer Verbindung, die als Antihypercholesterikum (HMG-Coenzym-A-Reduktase Inhibitor)¹⁰⁹ breite Anwendung findet und die Grundlage für viele semisynthetische und synthetische Statine lieferte¹¹⁰. Die Einzelschritte der Lovastatin-Biosynthese sind weitgehend bekannt und typisch für pilzliche Sekundärstoffe¹¹¹. Durch eine iterative PKS vom Typ I, der Lovastatin Nonaketid Synthase (*lovB* bzw. LNKS), und einer zusätzlichen Enoylreduktase (*lovC*) wird ausgehend von Malonyl-CoA und acht Einheiten Acetyl-CoA zunächst Dihydromonacolin L (**54**) gebildet, welches durch Oxidation von C-8 zum sek. Alkohol und Veresterung mit 2-Methylbuttersäure zu **55** führt.



Um die Verwandtschaft des Biosyntheseapparats für Lovastatin (**55**) und Equisetin (**52**) zu bestätigen, wurde mittels degenerierter PCR-Primer die Homologie der PKS-Sequenzen aus *Fusarium heterosporum* zur LNKS verifiziert. Um zu entscheiden, welche der so in *F. heterosporum* nachgewiesenen PKS-Sequenzen für die Biosynthese von **52** zuständig ist wurde ausgenutzt, dass es nicht in jedem Nährmedium zu einer Produktion von **52** kommt. Kultivierung in auf Mais-Gries basierendem Medium liefert **52** in Ausbeuten von mehr als 2 g/L, während bei Kultivierung in Kartoffel-Dextrose-Medium die Produktion fast vollständig ausbleibt. Isolierung von mRNA aus beiden Kulturen und RT-PCR korrelierte eine einzelne PKS-Sequenz (*pks2*) mit der Produktion der Zielverbindung. Dieses Ergebnis wurde durch Knockout-Mutagenese bestätigt und der somit eindeutig identifizierte equi-Gencluster einer vollständigen Sequenzierung unterzogen. Die Sequenzierung ergab 11 open reading frames (*eqi1-10* und *eqiS*), von denen bis zu acht an der **52**-Biosynthese beteiligt sein könnten. *EqiS* ist ein Hybrid aus einer iterativen PKS und einer nichtribosomalen Peptid

Synthetase (NRPS) und für die Synthese des Grundgerüst zuständig. Die anderen Gene werden für die späte Biosynthese sowie Resistenz und Regulation verantwortlich gemacht. Die Anordnung der PKS-Domänen in *eqiS* und *LNKS* stimmen exakt überein und auch der NRPS-Teil des Gens zeigt große Ähnlichkeit zu Synthetasen anderer Pilze. Die Domänen der NRPS befinden sich am C-terminalen Ende von *EqiS* und der Vergleich mit der *LNKS* ergab ein erstaunliches Ergebnis (vgl. Abbildung 29). Die *LNKS* codiert ebenfalls eine für die NRPS typische, vollständige Kondensations- (C) und die ersten 100 Aminosäuren einer Adenylierungs-Domäne (A). Dieser Teil der *LNKS* ist zwar als NRPS inaktiv, könnte aber für die Lactonisierung zum Pyron verantwortlich sein. Somit wird klar, dass es sich bei der *LNKS* um einen degenerierten Tetramsäure-Gencluster handelt, während dessen Evolution eine C-terminale Deletion zur Änderung des Biosynthesewegs führte.

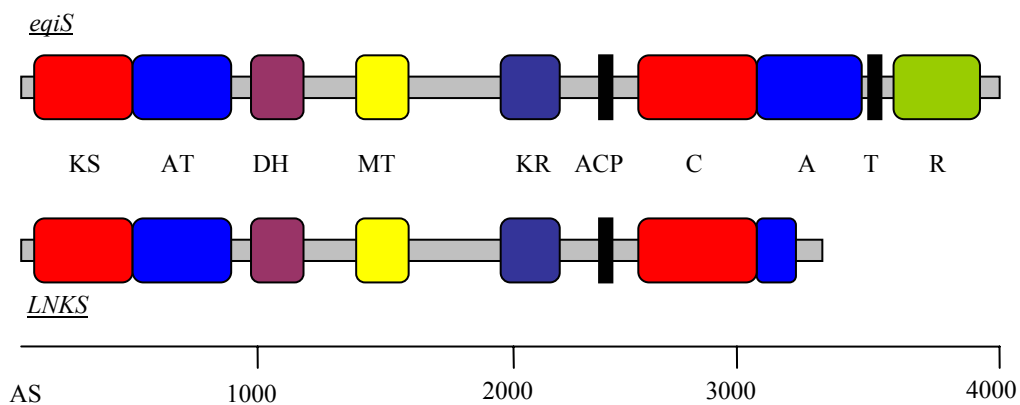


Abbildung 29: Vergleich der Gene von *eqiS* und *LNKS*.

Aufgrund der hohen Homologität sollten demnach die Schritte der frühen Biosynthese des Lovastatins (**55**) auf Equisetin (**50**) übertragbar sein. Die Ausbildung des bicyclischen Systems von **55** erfolgt auf der Stufe eines Hexaketid-Triens, dessen Kette anschließend durch die *LNKS* verlängert wird und nach Abspaltung vom Enzymkomplex spontan zum Pyron cyclisiert. Die einheitliche Stereochemie des Decalinsystems legt nahe, dass es sich bei dessen Cyclisierung um eine enzymatisch gesteuerte Diels-Alder-Cycloaddition handelt. Dieser Reaktionstyp wird für die Biosynthese einer Reihe von Naturstoffen postuliert, um die synthetisch kaum zugängliche Stereochemie erklären zu können¹¹². Für die Beteiligung einer „Diels-Alderase“ an einer solchen Reaktion gibt es aber bis heute keinen eindeutigen Beweis. Vielmehr kann angenommen werden, dass durch die Bildung einer enzymgebundenen, reaktiven Trien-Zwischenstufe, wie es im Falle der PKS-Metaboliten gegeben ist, an der Enzymoberfläche eine hohe Stereoselektivität der Reaktion induziert wird.

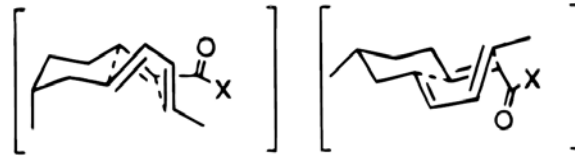


Abbildung 30: Die beiden *endo*-Übergangszustände der Diels-Alder-Cyclisierung¹¹³; X = OEt bzw. NAC.

Betrachtet man die denkbaren Übergangszustände für die Cyclisierung eines solchen hexaketidischen Vorläufers, so wird erkenntlich, dass sowohl *endo*- als auch *exo*-Cyclisierung je nach der pseudoaxialen bzw. pseudoäquatorialen Stellung der Methylgruppe an C-6 zu zwei Diastereomeren führen. Im Rahmen der Lovastatin-Biosynthese wird ausschließlich das *endo*-Produkt gebildet, bei dessen Übergangszustand sich die Methylgruppe in pseudoaxialer Position befindet, was eine enzymatische Beteiligung nahe legt. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass ohne die Beteiligung der LNKS keine bzw. die falsche Selektivität für die Cyclisierung der analogen Ethyl- oder *N*-Acetylcysteamin-Ester (NAC-Ester) des Hexaketids erreicht werden kann.

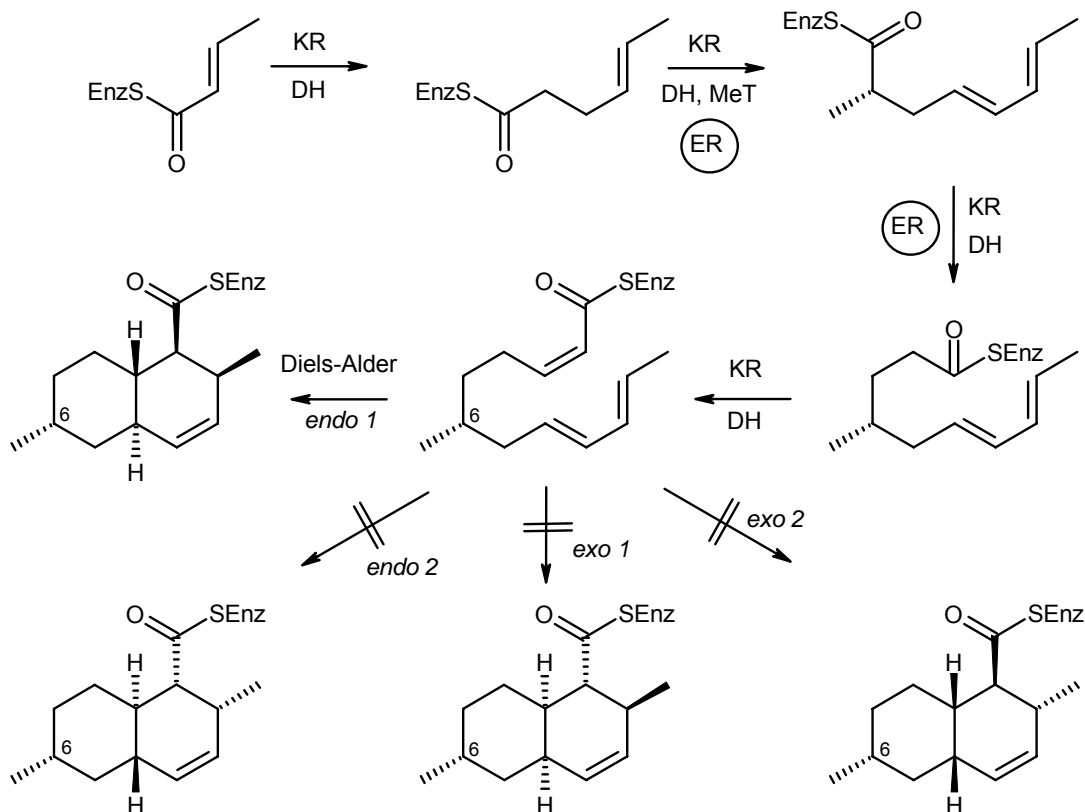


Abbildung 31: Auszug aus der Lovastatin (**55**) Biosynthese. Bildung des Hexaketid-Triens und Selektivität der Diels-Alder-Cycloaddition.

Die hohe Selektivität der enzymatischen Reaktion wird erreicht indem der NAC-Ester durch van-der-Waals Wechselwirkungen mit den hydrophoben Bereichen des aktiven Zentrums der LNKS in die für die Reaktion nötige Konformation gebracht wird. Wasserstoff-Brücken zur Carbonylgruppe des Hexaketids erhöhen ähnlich einer Lewis-Säure zusätzlich den Elektronenmangel des Dienophils und stabilisieren dadurch den *endo*-Übergangszustand, der zu den *trans*-verknüpften Decalinsystemen führt.

Wird jedoch die stark unterschiedliche Stereochemie der Equisetinderivate beachtet (vgl. Abbildung 28) und ein evolutionärer Zusammenhang zwischen den verschiedenen Produzentenspezies angenommen, erscheint das Konzept einer isolierten „Diels-Alderase“ zumindest für die Biosynthese des Lovostatins (**55**) und der Setine mehr als fraglich. Entscheidend scheint hier die Struktur des zu cyclisierenden Ketids zu sein, welche in Wechselwirkung mit der chiralen Struktur des beteiligten PKS-Proteins den stereochemischen Verlauf der Reaktion beeinflusst. Überträgt man die Biosynthese von **55** auf Equisetins (**52**) und CJ-21,058 (**50**) fällt auf, dass die Selektivität der Reaktion scheinbar durch das einzige stereogene Zentrum des reaktiven Hexaketids (C-6 des Hexaketids, vgl. Abbildung 31) erzeugt wird. Die Cyclisierung der 6*R*- bzw. 6*S*-konfigurierten Hexaketide erfolgt nun über den jeweiligen *endo*-Übergangszustand mit pseudo-äquatorialer Stellung der Methylgruppe und ergibt somit die vollständige entgegengesetzte Stereochemie von **52** und **50**. Dies erklärt jedoch nicht wie trotz der gleichen Substitution des Decalins die *cis*-Verknüpfung des Cissetins (**51**) erreicht werden kann. Hier scheinen bisher unbestimmte Faktoren den *exo*-Übergangszustand des Hexatriens energetisch herrabzusetzen. Es ist denkbar, dass die geänderte Selektivität auf einer Mutation innerhalb der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums der Polyketidsynthase beruht. Dieser Vermutung kann jedoch nur nachgekommen werden, indem man auch die Gencluster für die Biosynthese der Equisetin-Derivate genauer untersuchen würden.

Für die späte Biosynthese des Equisetins (**52**) wird angenommen, dass zunächst die PKS-Einheit aufgebaut wird. Nach nucleophilem Angriff eines als Thioester gebunden Serins und Reduktion durch die Reduktions-Domäne der NRPS wird ein C-terminaler Aldehyd freigesetzt, der im Cytoplasma spontan zum Pyrrolidion cyclisiert. Alkylierung des sekundären Amins mittels einer *N*-Methyltransferase und weitere Oxidation führen schließlich zu Equisetin (**52**). Der genaue Zeitpunkt der Methylierung hierbei bleibt unklar. Es wird jedoch postuliert, dass dieser Schritt vor der Cyclisierung der Tetramsäure abläuft¹¹⁴.

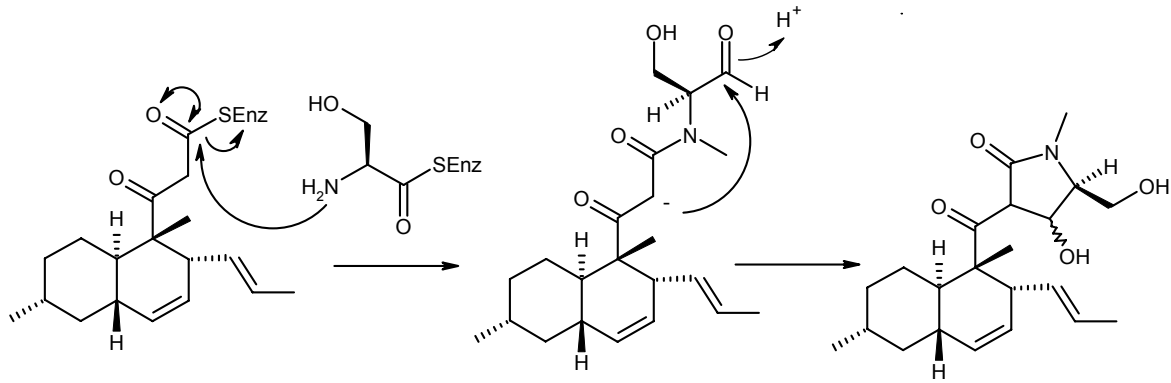


Abbildung 32: Postulierter Mechanismus für die Biosynthese des Pyrrolidionrings.

Die Strukturvariationen der Setine werden durch Änderungen der Arbeitsweise der iterativen PKS zugänglich. Beispielsweise müssten beim Phomasetins (**53**) gegenüber Equisetin (**52**) zwei weitere Zyklen der Polyketidverlängerung durchlaufen werden, bevor die Cyclisierung zum Decalin erfolgt. Die Einführung der Methylgruppe an C-4, wie sie z.B. bei CJ-21,058 (**50**) vorkommt, ist durch eine weitere Methyltransferase-Aktivität nach der dritten Kettenverlängerung zugänglich. Die hierfür nötige Regulation des PKS-NRPS-Hybrids erfolgt über die im Gencluster zusätzlich zu *eqi1-10* vorhandenen Enzyme. Auch hier müssten weitere Untersuchungen an den Biosynthese-Genclustern erfolgen um Kenntnisse über den genauen Ablauf der Regulation zu erhalten.

4. Sekundärstoffe aus Göttinger Stämmen

Mit den Stämmen Gö 212 und Gö 223 wurden zwei weitere Endophyten mariner Habitats aufgrund der Ergebnisse im chemischen Screening der Extrakte auf ihre genaue Sekundärstoffzusammensetzung überprüft. Die Stämme wurden von J. BITZER und O. SCHLÖRKE aus Rotalgen der in allen tropischen und subtropischen Gewässern verbreiteten Spezies *Hypnea cervicornis* isoliert. Das für die Isolierung der Pilze verwendete Pflanzenmaterial stammt von der Küste der griechischen Insel Kreta und ergab insgesamt 36 Isolate. Die taxonomische Bestimmung erfolgte durch Dr. S. DRAEGER an der Technischen Universität Braunschweig, das chemische Screening durch J. BITZER und O. SCHLÖRKE¹¹⁵. Die Stämme *Chaetomium* sp. Gö 212 und *Nodulisporium* sp. Gö 223 sind Vertreter relativ seltener Gattungen¹¹⁶, die zudem durch ihr besonderes Biosynthesepotential hervorstechen¹¹⁷.

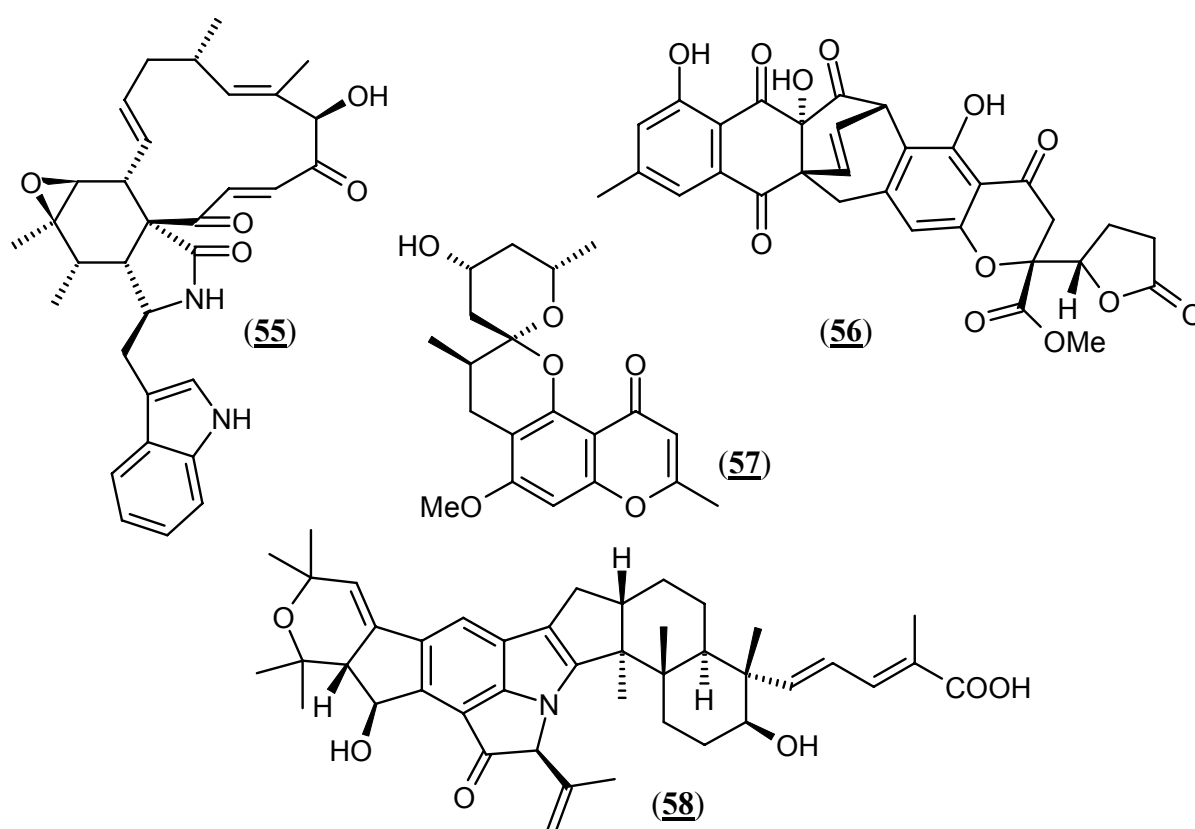


Abbildung 33: Naturstoffe aus *Chaetomium* bzw. *Nodulisporium*: Chaetoglobosin A (55), Chaetomanon (56), Chaetoquadrine (57) und Nodulisporinsäure A (58)

Aus der Gattung *Chaetomium* konnten zahlreiche Naturstoffe mit interessanten Strukturen und biologischen Aktivitäten isoliert werden. Die cytotoxischen Chaetoglobosine¹¹⁸ (**55**), das antimycobakterielle Chaetomanon¹¹⁹ (**56**) und die zu den Monoaminoxidase Hemmstoffen gehörenden Chaetoquadrine¹²⁰ (**57**) bilden nur eine kleine Auswahl. Aus *Nodulisporium* sind bisher deutlich weniger Sekundärstoffe bekannt. Hier überzeugt die Nodulisporinsäuren (**58**) aufgrund der komplexen Struktur und insektiziden Wirkung. Aufgrund ihres chemotaxonomischen Hintergrunds und der im chemischen Screening ersichtlichen Sekundärstoffproduktion sollte für die Stämme Gö 221 und Gö 223 eine Vergrößerung der Fermentationsansätze erfolgen und die Struktur der Hauptmetaboliten aufgeklärt werden.

4.1 Sekundärstoffe aus *Chaetomium sp.* Stamm Gö 212

4.1.1 Screening und Kultivierung

Die Sekundärstoffproduktion des Stamms *Chaetomium sp.* Gö 212 in P-Kolben zeigte im von J. BITZER durchgeführten chemischen Screening keine große Varianz bezüglich der Zusammensetzung der Extrakte. Es konnte jedoch eine Abhängigkeit der Produktionsmenge vom verwendeten Nährmedium festgestellt werden. Als besonders effektiv erwies sich die Fermentation im Medium G20, so dass diese im 4 L-Maßstab wiederholt wurde. Während der 21-tägigen Kultivierung färbte sich die Kulturbrühe deutlich schwarz und es bildete sich ein durchgehendes, an der Oberfläche weißes Luftmyzel aus.

4.1.2 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

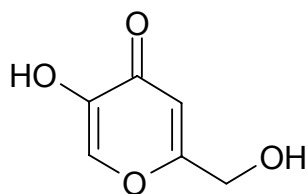
Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte durch separate Extraktion von Kulturfiltrat (Ethylacetat) und Myzel (Aceton), die zuvor durch Zentrifugation getrennt wurden. Der Extrakt des Kulturfiltrats wurde an Kieselgel unter Verwendung des Laufmittelgradienten Chloroform/Methanol 9:1 → 4:1 fraktioniert. Die polaren Fraktionen zeigten im Dünnschichtchromatogramm bei $R_f = 0.21$ größere Mengen einer Substanz mit blassgelber Eigenfarbe, die UV-Licht bei 254 und 366 nm löscht sowie mit Orcin eine gelbe Farbreaktion ergibt. Die weitere Aufreinigung dieser Substanz erfolgte durch wiederholte Umkristallisierung in Methanol/Chloroform (1:1) und ergab 305.0 mg **59** in Form blassgelber Nadeln. Eine Trennung der verbleibenden Fraktionen der Rohproduktsäule des Kulturfiltrats lieferten keine weiteren Sekundärstoffe in für einer zur vollständigen Charakterisierung

ausreichenden Stoffmenge. Aus dem Myzelextrakt, welches neben **59** kaum andere Sekundärstoffe enthält, konnten durch zum Kulfurfiltrat analoger Chromatographie und Umkristallisation weitere 1.19 g dieser Substanz erhalten werden. Insgesamt entspricht dies einer Produktion von über 350 mg/L **59**!

4.1.3 Charakterisierung der Sekundärstoffe

Koji-Säure (**59**)

Der Hauptmetabolit dieses Stammes zeigt im Dünnschichtchromatogramm sowohl Absorption als auch Fluoreszenz bei 254 bzw. 366 nm. Durch Farbreaktion mit Orcin wird die leicht gelbe Eigenfarbe der polaren Zone ($R_f = 0.21$ in Chloroform/Methanol 9:1) intensiviert. Die Molmasse wurde durch EI-Massenspektrometrie zu 142 g/mol bestimmt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lieferte bei Verwendung protischer Lösungsmittel wie Methanol nur drei Signale: Zwei Singulets einfacher Intensität bei $\delta_{\text{H}} = 7.98$ und 6.52, sowie ein das Singulett einer Methylengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.41$. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum waren sechs Signale bei $\delta_{\text{C}} = 176.9$, 170.4, 147.4, 141.0, 110.7 und 61.2 detektiert und somit eine hohe Sauerstoffsubstitution



Koji-Säure (**59**).

impliziert. Die Kombination der Molmasse mit den in den NMR-Experimenten erfassten Kernen lieferte eine Differenz von 66 g/mol und legt somit die Anwesenheit von vier Atomen Sauerstoff und zwei austauschbaren Protonen nahe. Suche in den Naturstoff-Datenbanken^{43, 44} liefert nach Abgleich der NMR-Daten Koji-Säure (**59**)¹²¹.

4.1.4 Relevanz des isolierten Sekundärstoffes

Mit der Isolierung des γ -Pyrons Koji-Säure (**59**) wurde ein pilztypischer Sekundärstoff nachgewiesen, der hauptsächlich von verschiedenen *Aspergillus* Spezies gebildet wird. Er ist bereits seit 1907 als Nebenprodukt der fermentativen Herstellung japanischem Reisweins (Sake) bekannt und wurde auf *Aspergillus oryzae* (jap. Koji) zurückgeführt¹²². Die Biosynthese-Untersuchungen an **59** begannen in den frühen 50er Jahren des letzten Jahrhunderts¹²³. mit Fütterungsexperimenten unter Zugabe radioaktiv markierter Vorläufer. Es waren die ersten Experimente dieser Art die damit wegweisend für zukünftige Biosyntheseuntersuchungen wurden. Neben $[1-^{14}\text{C}]\text{-D-Glucose}$, $[3,4-^{14}\text{C}_2]\text{-D-Glucose}$ und $[2-^{14}\text{C}]\text{-Dihydroxyaceton}$ wurden auch radioaktives Acetat, Pyruvat, Glycin, Ameisensäure sowie einige andere $\text{C}_3\text{- bis C}_1\text{-Quellen}$ für die Fütterungen verwendet. Der Einbau der radioaktiven Kerne konnte aufgrund ihrer Strahlung quantitativ bestimmt werden und durch

selektive Derivatisierung und anschließende Hydrolyse eine Positionsbestimmung der Markierung vorgenommen werden. Die Ergebnisse der zahlreichen Fütterungsergebnisse seien hier kurz zusammengefasst¹²⁴. Wie die Struktur und die Fütterungen nahe legen, scheint *D*-Glucose die bevorzugte Quelle für den C₆-Körper zu sein. Die Chiralität des zugesetzten Zuckers hat eine große Bedeutung, wie die Kultivierung in Pentose-haltigen Medien gezeigt hat. **59** wurde umso besser produziert, je stärker die Chiralität der Pentose der Glucose angenähert war. [1-¹⁴C]- und [3,4-¹⁴C₂]-*D*-Glucose ergaben Markierung an eben diesen Positionen (hier wird aus Gründen der Übersichtlichkeit die Nomenklatur der Zucker übernommen. Die korrekte Nummerierung der Kohlenstoffatome für **59** ist im experimentellen Teil angegeben). Fütterung von [2-¹⁴C]-Dihydroxyaceton zu Beginn der Fermentation lieferte hohe Anreicherungen der Kohlenstoffatome an Position 2 und 5, im geringeren Umfang auch an den anderen. Erfolgte die Zugabe erst zu einem späten Kultivierungszeitpunkt fand man eine übermäßig hohe Anreicherung an Position 5 statt, während in der aus der Kulturbrühe zurück gewonnenen Glucose keine Radioaktivität nachgewiesen werden konnte. Demnach erfolgt die Biosynthese wahrscheinlich ebenfalls direkt aus dem C₃-Körper durch Kondensation mit einer aus Glucose gewonnenen Triose oder deren Phosphatester. Für *Aspergillus flavus* konnte zusätzlich eine Beteiligung der Hexokinase, Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase (DH), 6-Phosphogluconat-DH, Glucose-DH und Gluconat-DH nachgewiesen werden¹²⁵. Die vorgeschaltete Bildung des Glucolactons ist aufgrund der Redox-Potentiale und des Nachweises von Gluconsäure in Kulturen von *A. orizae* als erster Schritt zu erwarten, obwohl dadurch abschließend eine Re-Reduktion an Position 1 nötig wird. Somit ergibt sich der in Abbildung 34 dargestellte Biosynthesemechanismus.

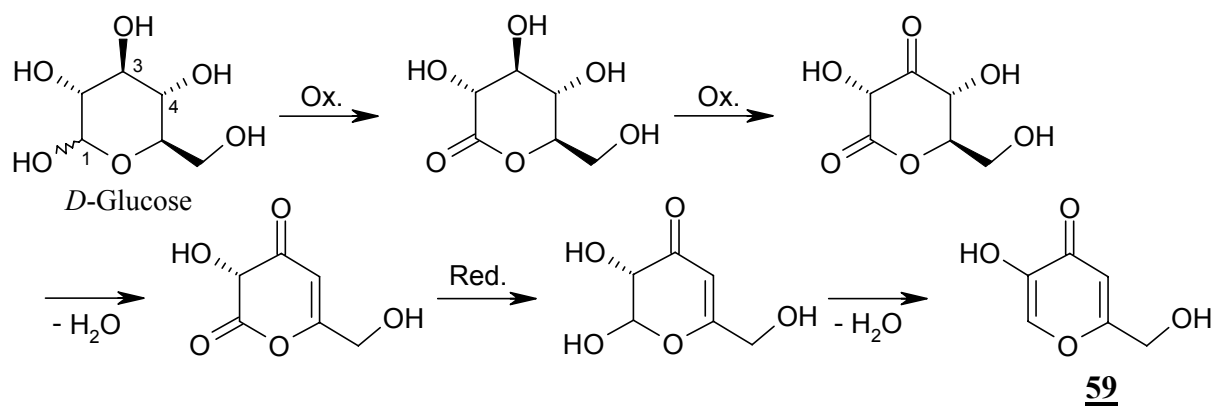


Abbildung 34: Biosynthese der Koji-Säure (**59**).

Wahrscheinlich aufgrund der Einfachheit der Biosynthese konnte **59** auch in zahlreichen anderen Mikroorganismen nachgewiesen werden. 1975 waren bereits zwanzig *Aspergillus* und fünf *Penicilium* Spezies als pilzliche Produzenten identifiziert¹²⁶. Mit *Bacterium xylinoides*, *Glucono-acetobacter opacus* var. *mobilis*, *G. roseum* und verschiedenen unidentifizierten Essigsäure-Bakterien gibt es auch einige prokaryontische Produzenten.

Koji-Säure (**59**) ist aufgrund ihrer hydrochinoiden Struktur ein starkes Reduktionsmittel und ein guter Chelator für die zweiwertigen Ionen der Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer¹²⁷. Das Reduktionsvermögen wird für den Nachweis des Aflatoxinproduzenten *Aspergillus flavus* ausgenutzt, der neben diesem Mycotoxin ebenfalls **59** bildet und einen gefährlichen Getreideschädling darstellt. Beim vollautomatisierten BGYF-Test wird potentiell befallenes Getreide mit einer Peroxidase-Lösung versetzt und in Anwesenheit von **59** eine ausgeprägte Fluoreszenz (**bright greenish-yellow fluorescence**) beobachtet¹²⁸. Des Weiteren finden **59** vor allem in Asien breite Anwendungen als Bleichmittel für Lebensmittel, da es deren oxidative Verfärbung verhindert. So wird z.B. Koji-Säure (**59**) dem Waschwasser von Champignons beigemischt, um eine Oxidation des darin enthaltenen Catecholamins *D/L*-DOPA durch eine Cu(II) enthaltene Polyphenoloxidase (Tyrosinase) und damit eine Braunfärbung des Produkts zu verhindern¹²⁹. In Europa ist die Verwendung von **59** in der Lebensmittelindustrie untersagt, da es einen nachweislich mutagenen Effekt auf *Salmonella typhimurium* ausübt¹³⁰. Dennoch findet **59** aufgrund fehlender Reglementierungen weltweit in kosmetischen Produkten Anwendung. Die Hautpigmentierung wird durch Anwendung von **59** verringert, da für die Biosynthese der farbgebenden Melanine *o*-Dihydroxy- and Trihydroxyphenole durch eine Tyrosinase oxidiert werden müssen¹³¹. Zusätzlich werden bereits oxidierte Catecholamine durch **59** wieder reduziert und so ebenfalls eine Bildung der Melanin-Pigmente verhindert. Neben den bleichenden Eigenschaften finden sich in der Literatur ebenfalls Angaben zu moderater fungizider¹³², antibakterieller¹³³ und insektizider¹³⁴ Aktivität. **59** diente auch als Leitstruktur für die Erzeugung neuer Wirkstoffe. So konnte z. B. durch Verknüpfung der sekundären Hydroxygruppe mit Benzyloxycarbonyl-geschützten Aminosäuren und Dipeptiden eine deutliche Verbesserung der fungiziden Wirkung erreicht werden¹³⁵. Die Ergebnisse der eigenen Plattendiffusionstests auf bakterielle oder fungizide Eigenschaften waren negativ. Für die Tests der Reinsubstanz auf insektizide und fungizide Wirkung durch die BASF stehen die Ergebnisse noch aus.

4.2 Sekundärstoffe aus *Nodulisporium* sp. Stamm Gö 223

4.2.1 Screening, Kultivierung und Ausarbeitung

Auch für diesen Stamm wurde bereits von J. BITZER ein chemisches Screening in P-Kolben durchgeführt. Es zeigten sich besonders im polaren bis mittelpolaren Bereich ($R_f = 0.2$ bis 0.5) zahlreiche Sekundärstoffe in Abhängigkeit vom Nährmedium. Für die Ansatzvergrößerung wurden die Medien E2 und 1158 aufgrund ihres komplementären Sekundärstoffspektrums ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte jeweils mit 5 L des Nährmediums, aufgeteilt auf fünf 5 L P-Kolben, über einen Zeitraum von 21 Tagen und einer Temperatur ca. 25°C . Beide Ansätze bestanden am Ende der Kultivierung aus einer dunkelbraun bis schwarz gefärbten Kulturbrühe, welche unvollständig aber zusammenhängend von einem weißen Luftmyzel bedeckt war.

4.2.2 Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

Die Aufarbeitung beider Ansätze erfolgte nach dem gleichen Verfahren: nach Trennung von Kulturfiltrat und Myzel wurden diese mit Ethylacetat bzw. Aceton extrahiert. Im Dünnschichtchromatogramm der Rohextrakte aus der E2-Kultivierung fiel eine bei 366 nm gelb fluoreszierende und bei 254 nm UV-Licht absorbierende Zone ($R_f = 0.29$) auf. Besonders im Kulturfiltrat wurde direkt überhalb eine weitere Zone ($R_f = 0.29$) erkannt, die sowohl bei 254 als auch bei 366 nm blau fluoreszierte. Die Extrakte der Kultivierung in 1158 wiesen einen sehr hohen Fettgehalt auf, der einen Vergleich mit den E2-Kulturen durch die Verfälschung der R_f -Werte deutlich erschwerte. Um eine bessere Aussage über die Sekundärstoffproduktion machen zu können, wurden die 1158-Extrakte in 100 mL Pentan aufgenommen. Der Rückstand wurde abfiltriert, in Chloroform/Methanol (9:1) gelöst und erneut mit den Extrakten der E2-Kultivierung verglichen. Es wurde ersichtlich, dass die Zusammensetzungen der Sekundärstoffe im Gegensatz zu den durch das chemische Screening erhaltenen Eindrücken große Ähnlichkeit aufwiesen. Es wurde zusätzlich ein Vergleich mittels LC-MS durchgeführt. Beide Kultivierungen zeigen als Hauptprodukte **72** ($R_t = 12.8$ min, $m/z = 228$ neg. Modus) und **60** ($R_t = 14.8$ min, $m/z = 221$ neg. Modus).

Medium E2

Die Masse der Extrakte war zu groß (>10.0 g) um eine gute Trennleistung auf den verfügbaren Chromatographiesäulen zu erreichen. Es wurden daher nur Anteile von jeweils 2.5 g für die weitere Trennung verwendet. Der KF-Extrakt wurde so an Kieselgel

(Chloroform/Methanol, graduell von 9:1 nach 4:1) fraktioniert, dass beide Sekundärstoffe möglichst gut angereichert wurden. Die lipophilen Fraktionen wurden nach DC und LC-MS-Kontrolle verworfen, da außer Fetten keine weiteren Substanzen ersichtlich waren. Die beiden interessanten Fraktionen wurden jeweils an Sephadex LH-20 (MeOH) weiter aufgereinigt. Die Zone gelber Fluoreszenz (72) konnte auf diese Weise in sehr guter Reinheit, aber mit einer geringen Ausbeute von 1.1 mg erhalten werden. Des Weiteren konnten 4.9 mg Daidzein (75) und 1.3 mg Genistein (74) als Reinsubstanz gewonnen werden (vgl. Kapitel 5). Für die Isolierung der Zone blauer Fluoreszenz war eine weitere Trennung an Sephadex LH-20 (Aceton) notwendig um 40.2 mg der Reinsubstanz 60 zu erhalten. Die Aufreinigung einer polaren Fraktion der Rohproduktsäule durch Mitteldruck-Chromatographie an RP-18 Kieselgel ergab 3.6 mg Thymidin (76). Für die Rohproduktsäule des Myzelextrakts wurden mobile und stationäre Phase analog dem Kulturfiltrat gewählt. Trennung der polaren Fraktion an Sephadex LH-20 (Aceton) ergab weitere 0.7 mg 72.

Medium 1158

Aufgrund der Ähnlichkeit bezüglich ihrer Zusammensetzung wurde die Aufreinigung der Extrakte analog zu den E2-Kulturen durchgeführt. Aus 2.5 g des entfetteten Kulturfiltratextrakts erhielt man neben den Isoflavonoiden 74 (4.2 mg) und 75 (3.5 mg) ebenfalls 0.9 mg 72 und 19.8 mg 60. Aus der gleichen Menge des Myzelextrakts konnten weitere 0.5 mg 72 isoliert werden.

4.2.3 Charakterisierung der Sekundärstoffe

7-O-Desmethyl-azamonosporascon (72)

Der gelbe Feststoff fiel im Dünnschichtchromatogramm aufgrund seiner gelben Eigenfarbe, Absorption bei 254 nm und einer sehr starken, gelben Fluoreszenz bei 366 nm auf. Mit Anisaldehyd/H₂SO₄ zeigte die Verbindung nach Erwärmen eine orange Farbe. Hochaufgelöste ESI-Massenspektrometrie ergab eine Summenformel von C₁₂H₇NO₄ und somit zehn Doppelbindungsäquivalente, was auf eine polycyclische Verbindung mit hoher Konjugation hinweist. Im IR-Spektrum wurde zusätzlich durch Absorptionen bei 822, 761 und 607 cm⁻¹ die Aromatizität der Verbindung ersichtlich. Von den sieben Protonen lieferten nur vier im ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆) scharfe Signale in Form von Dubletts. Die paarweisen Kopplungskonstanten von 2.5 (δ_H = 6.64 und 5.82) bzw. 1.8 Hz (δ_H = 7.38 und 7.52) implizierten deren *meta*-Stellung. Weitere Informationen liefert das verbreiterte

Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 13.6$, welches eine für chelatisierte Hydroxylgruppen charakteristische Tiefferverschiebung zeigt. Auswertung des ^{13}C -NMR-Spektrums ergab bei $\delta_{\text{C}} = 182.7$ und 180.1 die Präsenz von zwei Carbonylgruppen. Zehn weitere sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome, deren Verschiebungen bei $\delta_{\text{C}} = 174.5, 166.4, 137.5, 123.6, 122.5, 122.2, 122.1, 113.5, 107.5$ und 106.7 lagen, deuten auf ein phenolisches System und weitere Heteroatome hin. Eine Datenbanksuche^{43,44} ergab unter Beachtung der Summenformel keinen zu den spektroskopischen Daten passenden Treffer aber eine enge Strukturverwandschaft mit Azamonosporascon (**73**)¹³⁶. Aus dessen Summenformel ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$) und den NMR-Daten wird schnell ersichtlich, dass es sich bei (**73**) um den Methylether von (**72**) handeln könnte.

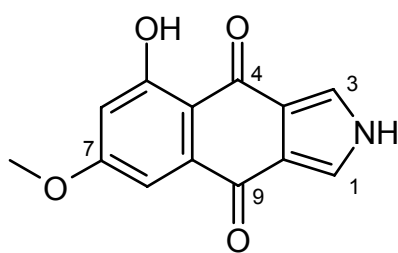
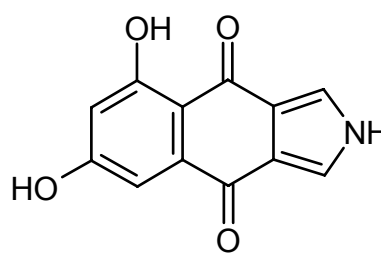
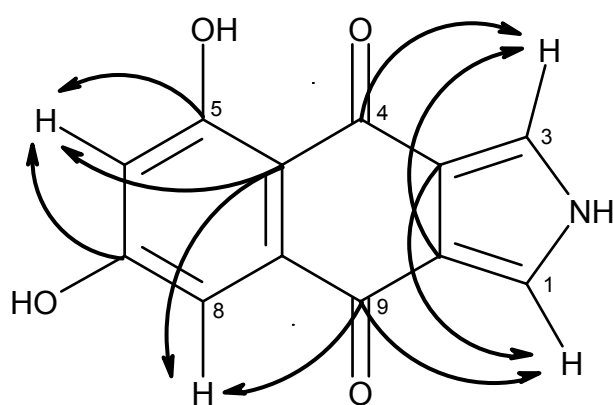
Azamonosporascon (**73**)7-O-Desmethyl-azamonosporascon (**72**)

Abbildung 35:
Dünnschichtchromatogramm (CM91) der Reaktionslösung unter UV-Licht (366 nm).

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde **72** einer Methylierung mit Diazomethan unterzogen (vgl. Karpitell 12.2). Aus dem Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung war ersichtlich, dass **72** einer zweifachen Methylierung zugänglich ist. Die Aufreinigung des Rohprodukts mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Aceton) ergab hingegen nur eine Fraktion, deren Menge (3.9 mg) für eine vollständige Charakterisierung ausreichend war. Das erhaltene Produkt stellte sich nach Vergleich der spektroskopischen Daten als identisch mit Azamonosporascon (**73**) heraus. Durch Chelatisierung der Hydroxygruppe in Position 5 erfolgte die erste Methylierung von **72** ausschließlich in Position 7. Der Nachweis des 5,7-Dimethylethers gelang mittels LC-MS-Analytik (HPLC B, Programm B, Säule B) des Reaktionsgemisches.

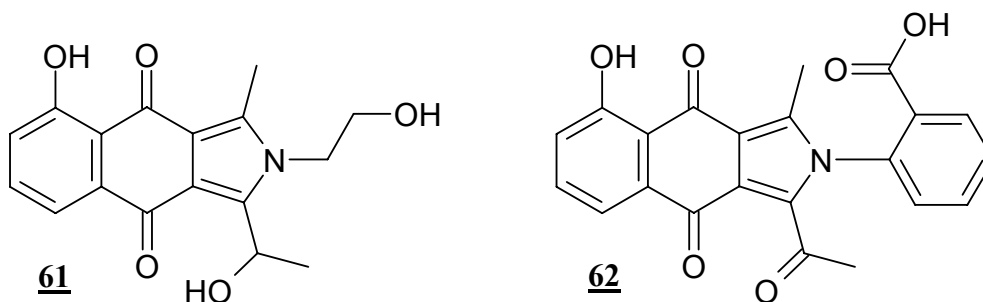
Um eine Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Resonanzen für **72** zu ermöglichen, wurden zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt. Ausgehend von den chemischen Verschiebungen und HMBC-Korrelationen der Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 6.77$ und 6.01 gelang die Konstruktion des aromatischen, resorcinartigen Systems. Lediglich die hydroxylierten Kohlenstoffatome (C-5 und C-7) bleiben austauschbar, da sie im HMBC die gleichen Korrelationen ergaben. Eines der Chinoncarbonyle (180.9 ppm) zeigt CH-Korrelation zum Pyrrol und Resorcin und ergibt somit die Zuordnung der verbleibenden Signale.



Position	δ_{C}	δ_{H}
1	122.2	7.64
3	123.6	7.55
3a	122.5	-
4	182.7	-
4a	106.7	-
5	166.4	-
6	107.5	6.01
7	174.5	-
8	113.5	6.77
8a	137.5	-
9	180.9	-
9a	122.1	-

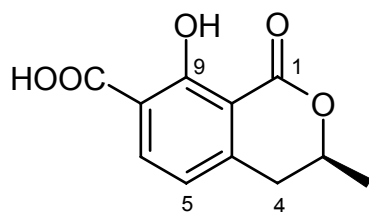
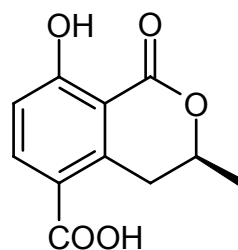
Abbildung 36: HMBC-Korrelation von **72** und daraus resultierende Zuordnung der NMR-Signale.

Azamonosporascon (**73**) und sein im Rahmen dieser Arbeit erstmals isoliertes 7-*O*-Desmethyl-Derivat **72** weisen mit 2H-Benz[*b*]isoindol-4,9-dione ein für Sekundärstoffe aus Pilzen einzigartiges Grundgerüst auf. Lediglich in Kulturen des terrestrischen Bakteriums *Streptomyces* sp. GW32/698 konnten mit Bhimamycin C (**61**) und Bhimamycin D (**62**) ähnliche Strukturen nachgewiesen werden¹³⁷.



5-Carboxymellein (60)

Der in Methanol schlecht lösliche Feststoff fluoreszierte im Dünnschichtchromatogramm bei 254 und 366 nm mit blauer Farbe, zeigte jedoch gegenüber Anisaldehyd/H₂SO₄ keine Farbreaktion. Eine Molmassenbestimmung gelang mittels DCI-Massenspektrometrie auf 222 g/mol. Das in Aceton-*d*₆ gemessene ¹H-NMR-Spektrum zeigte bei sehr niedrigem Feld ($\delta_{\text{H}} = 11.36$) das breite Singulett eines chelatisierten Protons. Des Weiteren wurden acht Protonen in Form scharfer Multipletts detektiert. Dubletts einfacher Intensität bei $\delta_{\text{H}} = 8.20$ und 6.97 repräsentieren *ortho*-ständige aromatische Protonen (${}^3J = 9.5$ Hz). Bei $\delta_{\text{H}} = 4.78$ fiel das zum Multiplett aufgespaltete Signal eines weiteren Protons auf, welches auf eine elektronenziehende Substituenten hinweist. Zwei weitere Resonanzen zeigten sich mit einer gemeinsamen geminalen Kopplungskonstante von 17.5 Hz als Dublett vom Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 3.96$ (${}^3J = 3.0$ Hz) sowie $\delta_{\text{H}} = 3.02$ (${}^3J = 12.0$ Hz) und ergaben somit eine elektronenarme, diastereotope Methylengruppe. Das Dublett (${}^3J = 6.0$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 1.46$ repräsentierte eine Methylgruppe, die aufgrund ihrer Kopplungskonstante der Methingruppe bei 4.78 benachbart sein musste. Im ¹³C-NMR-Spektrum wurden elf Resonanzen detektiert, von denen drei im Carbonsäure-typischen Bereich von ca. $\delta_{\text{C}} = 165$ lagen. Zwischen $\delta_{\text{C}} = 145$ und 110 sind die Signale von fünf weiteren sp²-Kohlenstoffatomen zu verzeichnen. Durch die Resonanzen bei $\delta_{\text{C}} = 76.4$, 33.2 und 20.8 wurde das Spektrum komplettiert. Mittels der bisher genannten Charakterisierung gelingt es nicht in den Naturstoff-Datenbanken^{43, 44} die Struktur der Verbindung eindeutig zu ermitteln. Die Isocoumarine¹³⁸ Ochratoxin β (**63**) und 5-Carboxymellein (**60**) verfügen mit einer Summenformel von C₁₁H₁₀O₅ über die gesuchte Molmasse und lassen sich mit den NMR-Daten vereinbaren. Für Ochratoxin β (**63**), welches ein Hydrolyseprodukt des Mycotoxins Ochratoxin B darstellt und bisher nur auf diesem Wege oder durch Synthese erhalten wurde, sind in der verfügbaren Literatur¹³⁹ nur unzureichende Daten (¹H-NMR) verzeichnet, so dass ein vollständiger Abgleich nicht möglich ist.

Ochratoxin β (**63**)5-Carboxymellein (**60**).

Aus diesem Grund waren weitere NMR-Experimente nötig um eine eindeutige Strukturbestimmung zu ermöglichen. Durch HSQC- und COSY-NMR-Spektren gelang die Absicherung der bereits vermuteten Fragmente. Ausgehend von Inkrementrechnungen und der für Phenole typischen Hochfeldverschiebung der Kohlenstoffatome in *ortho*- bzw. *para*-Stellung zur OH-Gruppe kann diese nur an Position 9 des Isocoumarins gebunden sein. Die im HMBC-Spektrum beobachteten Korrelationen können weiterhin mit **63** und **60** zur Deckung gebracht werden, ergeben jedoch strukturbedingt eine unterschiedliche Zuordnung der ^{13}C -Signale an C-5 bis C-7.

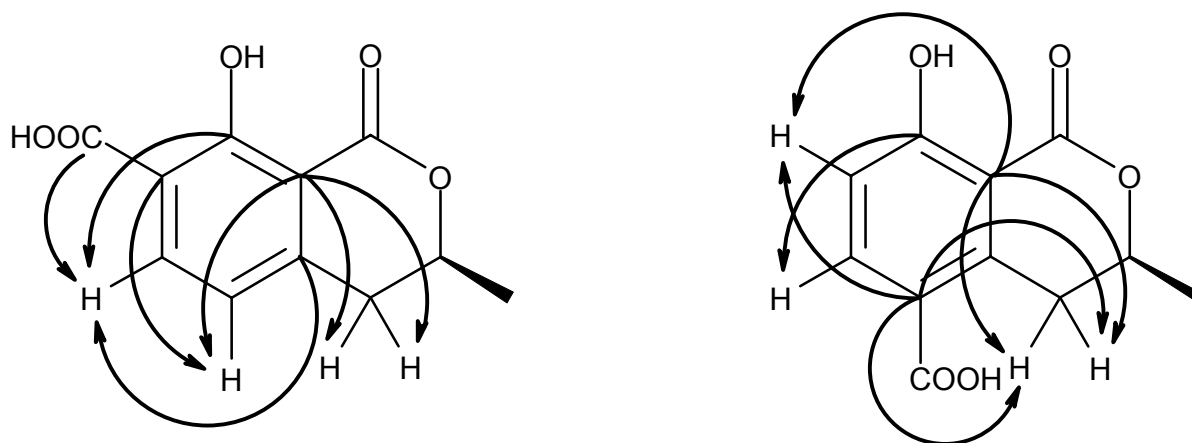


Abbildung 37: ^3J -CH-Korrelationen und resultierende Zuordnungen.

Es sprechen einige Indizien für die Identität mit **60**, die in ihrer Summe nur diese Konnektivität ergeben. Bei diastereotopen Protonen ist der Unterschied in der chemischen Verschiebung in der Regel groß sobald Wechselwirkung mit einem sterisch bzw. elektronisch anspruchsvollen Substituenten bestehen. Die Signale der Methylengruppe zeigen mit $\delta_{\text{H}} = 3.96$ bzw. 3.02 eine relativ große Differenz in der chemischen Verschiebung und sprechen ebenfalls durch ihre Absolutwerte für die γ -Stellung der Carboxylgruppe. Im Falle von Ochratoxin β (**63**) wäre zu erwarten, dass die räumliche Nähe der Protonen an C-4 und C-5 im NOE-Spektrum zu erkennen ist. Bei der vorliegenden Verbindung war eine Anregung der Methylengruppe durch Einstrahlung auf die aromatischen Protonen nicht möglich. Der Drehwert von $\alpha_{\text{D}} = -185^\circ$ stimmt in erster Näherung gut mit dem für **60** angegebenen Wert von -195° überein. Im IR-Spektrum werden bei 3192 , 1684 , 1578 , 1231 und 824 cm^{-1} charakteristische Banden verzeichnet, die nur wenige Einheiten neben den Literaturdaten liegen, allerdings für alle Isocoumarine typische Werte aufweisen.

4.2.4 Weitere Hexaketide aus *Nodulisporium* sp. Gö 223

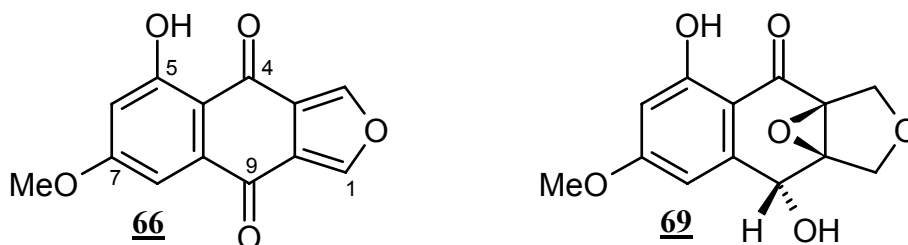
Stark fluoreszierenden Verbindungen werden nach eigenen Erfahrungen meist nur in sehr geringer Menge aus den Extrakten erhalten. **72** stellt hierfür ein sehr gutes Beispiel dar, denn trotz des großen Fermentationsansatzes konnte nur geringe Mengen erhalten werden. Neben **72** wurden im Rahmen der Fraktionierung der Extrakte weitere Substanzen mit ähnlicher Fluoreszenz aber zum Teil stark abweichenden R_f -Werten in den Dünnschichtchromatogrammen erkannt. Für keine dieser Zonen gelang es, ausreichende Stoffmengen für eine Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie zu erhalten. Aufgrund der Ähnlichkeit der mittels DAD-HPLC (HPLC A, Programm A, Säule A) ermittelten UV-Spektren zu **72**, könnte es sich bei diesen Verbindungen um die aus *M. cannonballus* isolierten Sauerstoffanaloga handeln. Es wurde versucht, diese anhand ihrer charakteristischen Chromophore und Molmassen mittels LC-MS (HPLC B, Programm B, Säule B) nachzuweisen. Unter der Berücksichtigung, dass *Nodulisporium* sp. Gö 223 scheinbar nicht in der Lage ist die 7-OH Gruppe des Hexaketids zu methylieren, wurde die Suche auch auf die Desmethyl-derivate der Sauerstoffanaloga erweitert. In der Tat fanden sich Komponenten mit den Molmassen der Desmethyl-derivate, nicht jedoch der methylierten Verbindungen. Da keine dieser Verbindungen in der Literatur beschrieben ist und das Eluentengemisch für die LC-MS mit Ameisensäure versetzt war, konnten die UV-Spektren der detektierten Verbindungen nur mit denen der literaturbekannten 7-Methylether verglichen werden. Die Molmassen und UV-Spektren der detektierten Verbindungen sind in Tabelle 8 angegeben. Die Ausbeuten der Verbindungen bewegten sich im Bereich zwischen 0.1 und 0.3 mg. Die strukturelle Identität konnte nicht bewiesen werden, kann jedoch aufgrund der auffälligen UV-Spektren als wahrscheinlich angesehen werden.

Tabelle 8: Weitere Hexaketide aus *Nodulisporium* sp. Gö 223 (angegeben sind die im negativen ESI-Modus gefundenen m/z -Werte).

Desmethyl-Derivat von...	R_t (min)	$m/z_{neg.}$	UV-Maxima (nm)
Dehydroxyarthrinon (69)	5.94	249	224, 264, 292, 336 (exp.) 204, 223, 238, 291, 330 (Lit.)
Desmethylcerdarin (65)	7.20	249	220, 252, 300, 352 (exp.) 217, 267, 436
Monosporascol A (67)	7.25	221	224, 252, 296, 380 (exp.) 202, 222, 300, 335 (Lit.)
Monosporascon (66)	10.8	229	228, 252, 272, 404 (exp.) 220, 258, 279, 315, 388 (Lit.)
Azamonosporascon (73)	12.4	228	228, 264, 404 (exp.) 233, 250, 272, 396 (Lit.)

4.2.5 Biologische Aktivität und Biosynthese der Hexaketide

Für keines der 2H-Benz[b]isoindol-4,9-dione ist bisher eine biologische Aktivität bekannt. Für das aus *Monosporascus cannonballus*, einem pathogenen Pilz der Kantalup- und Wassermelone, isolierte Azamonosporascon (**73**) wird beobachtet, dass es nur im Falle einer degenerativen Veränderung (z.B. durch Hypovirulenz) oder eines erhöhten Salzgehalts des Mediums gebildet wird¹⁴⁰. Folglich scheint sich der Produzent durch die Biosynthese von **73** und dessen Sauerstoffanaloga **65**, **66**, **67**, und **69** einen Vorteil unter den verschlechterten Lebensbedingungen zu verschaffen. Bisher konnte zwei der Sauerstoffanaloga die biologische Aktivität zugeordnet werden: Monosporascon (**66**) ist ein Hemmstoff der Monoaminoxidase¹⁴¹ bei Mäusen, während Dehydroxyarthrinon (**69**) antibakterielle und fungizide Eigenschaften¹⁴² aufweist.



Die Biosynthese dieser Verbindungen ist bisher unklar. **73** und seine Sauerstoff-Analoga werden in der Literatur als Hexaketide bezeichnet, was aufgrund der pilztypischen Naphthochinoneinheit als wahrscheinlich angesehen werden kann. *M. cannonballus* produziert diese Hexaketide nur, wenn es aufgrund der degenerativen Veränderungen zu einer Störung des Melanin-Stoffwechsels kommt. Blockade des für 1,8-Dihydroxynaphtalen, dem pentaketidischen Monomer der pilzlichen Melanine, zuständigen Biosynthesewegs durch Tricyclazol führte zu keiner Veränderung der Hexaketidproduktion. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass Melanine und Hexaketide über einen gemeinsamen Biosyntheseweg gebildet werden. Unter Beachtung der für Pilze typischen Faltung eines Hexaketidvorläufers ergibt sich die beobachtete Sauerstoff-Substitution der Kohlenstoffatomen an den Positionen 4, 5 und 7. Die Oxidation in Position 9 muss nach dem Ringschluss im Rahmen des Tailorings ablaufen und ist für Chinonderivate üblich¹⁴³. Vergleicht man die Strukturen der aus *M. cannonballus* isolierten Hexaketide, wird erkenntlich, dass diese über ein gemeinsames Zwischenprodukt (**64**) gebildet werden. Dieses Intermediat führt durch die in Abbildung 38 gezeigten Reaktionen und 7-O-Methylierung zu den von *M. cannonballus* gebildeten Sekundärstoffen.

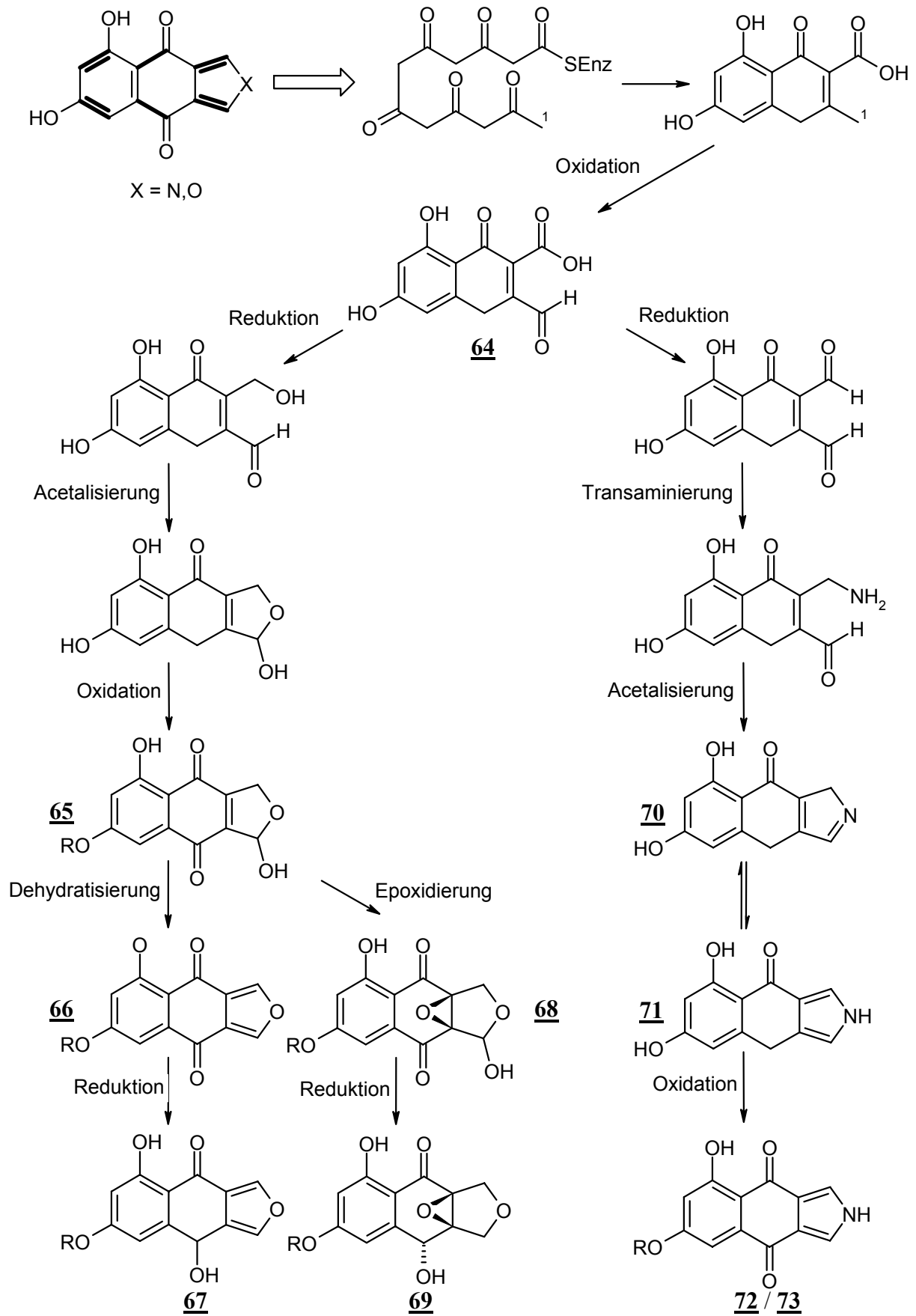


Abbildung 38: Hypothetische Biosynthese der Hexaketide aus *M. cannonballus* (R = CH₃) und 7-*O*-Desmethyl-Azamonosporascone (72) (R = H).

Nach dem Ringschluss des Hexaketidvorläufers wird die Methylgruppe an Position 1 zum Aldehyd oxidiert und ergibt so **64**. Für die Biosynthese der Sauerstoffanaloge erfolgt im nächsten Schritt eine Reduktion der Carboxylgruppe zum primären Alkohol. Nach intramolekularer Bildung des Halbacetals und Oxidation des Kohlenstoffatoms in Position 9 erhält man Didesmethylcerdarin (**65**). Nach 1,4-Eliminierung von Wasser ergibt sich eine vollständige Konjugation des sp^2 -Systems, was als zusätzliche Triebkraft für die Reaktion angesehen werden kann und zu Monosporascon (**66**) führt. Durch partielle Reduktion des Chinonsystems entsteht Monosporascol A (**67**). Wie die für die Synthese von Dehydroxyarthrinon (**69**) nötige Epoxidierung abläuft, bleibt unklar. Durch das aus *Arthrinium* sp. FA 1744 isolierte Arthrinon (**68**) wird jedoch nahe gelegt, dass dieses durch Epoxidierung der Doppelbindung von **65** als Intermediat gebildet wird¹⁴⁴. Um Azamonosporascon (**73**) zu erhalten, muss das reaktive Intermediat (**64**) anhand einer alternativen Biosyntheseroute prozessiert werden. Hier erfolgt zunächst eine Reduktion der Carbonsäure zum 2,3-Diformyl-Naphtalenderivat. Eine Transaminierung des Aldehyds führt zum primären Amin, welches analog zu **65** einen Ringschluss vollzieht und nach Eliminierung von Wasser das Imin **70** ergibt. Dieses tautomerisiert unter Verschiebung der Doppelbindung zum Dienamin **71**, das nach Oxidation zum Chinon Azamonosporascon (**73**) ergibt. Um die vorgestellte hypothetische Biosynthese zu verifizieren sind weitere Experimenten nötig. Durch Fütterung von ^{13}C -markierten Acetaten könnte Aufbau und Faltung des Polyketidvorläufers nachvollzogen werden. Fütterung von ^{15}N -markiertem Glutamat während der Produktionsphase der Hexaketide sollte die Beteiligung einer Transaminase bestätigen, da es sich dabei, wie z.B. anhand der Tetracyclinbiosynthese gezeigt wurde, um das übliche Cosubstrat dieser Enzyme handelt¹⁴⁵.

4.2.6 Biologische Aktivität und Biosynthese von 5-Carboxymellein

5-Carboxymellein (**60**) wurde bereits aus vielen weiteren Ascomyceten (*Valsa ceratosperma*¹⁴⁶, *Hypoxylon illitum*¹⁴⁷, *Halorosellinia oceanica*¹⁴⁸, *Phomopsis oblonga*¹⁴⁹) sowie aus mit unbestimmten Pilzen infiziertem Lagerholz¹⁵⁰ isoliert. *Valsa ceratosperma* ist als pathogener Endophyt von Apfelbäumen bekannt und Untersuchungen haben gezeigt, dass **60** phytotoxische Eigenschaften aufweist. Bereits bei Konzentrationen von 100 ppm wird das Gewebe der befallenen Bäume zersetzt und somit eine weitere Verbreitung innerhalb der Wirtspflanze ermöglicht. Auch moderate cytotoxische Wirkung gegen KB-/HL60-Zelllinien ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{g/mL}$) und Antimalaria-Aktivität ($\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$) konnte für **60** festgestellt werden. Eine antibakterielle oder fungizide Wirkung ist nicht vorhanden.

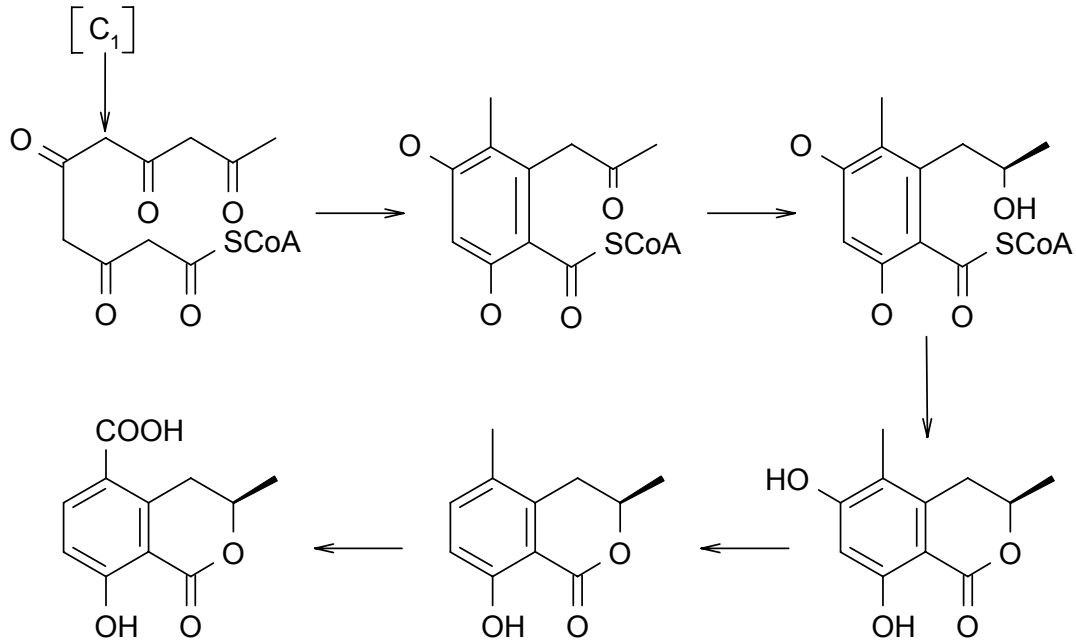


Abbildung 39: Biosynthese des 5- Carboxymelleins (**60**).

Die Biosynthese der pilztypischen Isocoumarine über den Polyketidweg wurde für verschiedene Beispiele durch Fütterungsexperimente bestätigt¹⁵¹. Gemeinsamer Vorläufer aller Isocoumarine ist ein aus fünf Acetateinheiten aufgebautes Pentaketid. Häufig findet man an Kohlenstoffatomen 3, 5 und/oder 7 Substitution mit aus Methionin stammenden Methylgruppen. Überträgt man diese Kenntnisse auf 5-Carboxymellein, so ergibt sich der in Abbildung 39 dargestellte hypothetische Biosyntheseverlauf.

5. Häufig isolierte Verbindungen

5.1 Ergosterol (**73**)

Dieses Steroid repräsentiert einen wichtigen Primärmetaboliten der Pilze, und kann vor allem aus den Myzelextrakten aller Pilze in großen Mengen isoliert werden. Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens wird es daher genutzt um den Befall von Lebensmitteln, wie z.B. Getreide, durch pathogene Pilze quantitativ zu bestimmen¹⁵². Im pilzlichen Organismus werden Ergosterol zwei wichtige Bedeutungen zugeordnet. Als integraler Bestandteil der Zellmembran, reguliert es neben anderen Sterolen deren Fluidität und hat so eine strukturbestimmende Funktionen¹⁵³. Des Weiteren stellt es nachweislich einen hormonellen Wachstumspromotor dar¹⁵⁴. Säugetiere verwenden als dominierendes Sterol anstelle von **73** in ihrer Zellwand Cholesterol. Dieser grundlegende Unterschied im Zellaufbau eröffnet Möglichkeiten für einen selektiven Angriff durch Antimykotika. Polyenantibiotika wie Amphotericin B oder Nystatin bewirken durch eine irreversible Komplexbildung mit **73** eine Permeabilisierung der Membran, andere Substanzklassen wie die Allylamine oder die Azol-Antimykotika inhibieren die Biosynthese von Ergosterol¹⁵⁵.

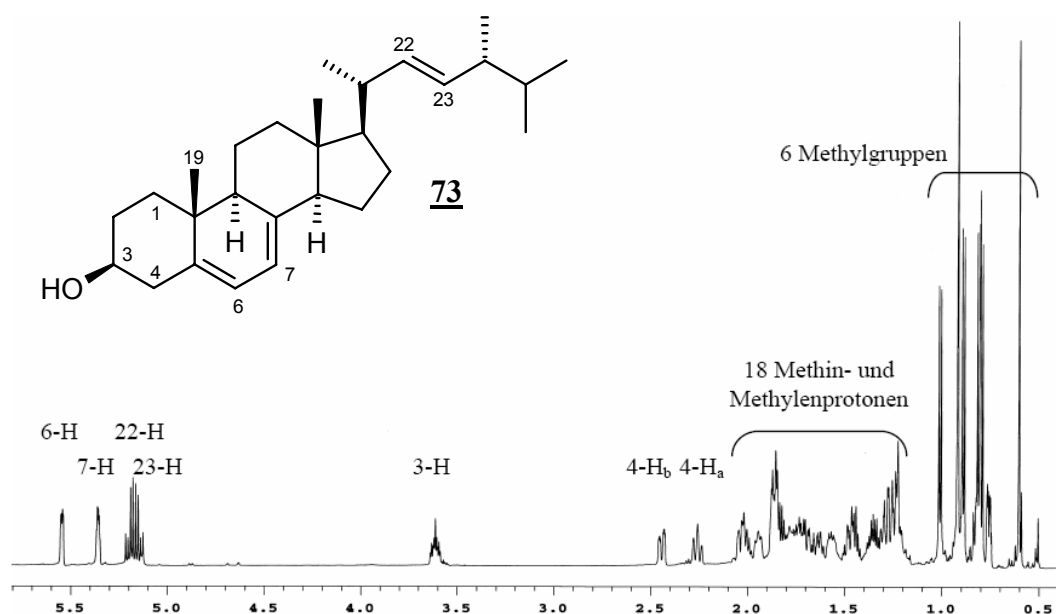


Abbildung 40: ¹H-NMR-Spektrum von Ergosterol (**73**) in CDCl₃.

Die Identifikation von **(73)** gelingt im Dünnschichtchromatogramm durch sein charakteristisches Verhalten unter UV-Licht, denn in hohen Konzentrationen kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm eine blaue Fluoreszenz beobachtet werden. Der R_f -Wert dieser Substanz im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol 9:1 variiert hingegen in Abhängigkeit vom Fettgehalt der Extrakte bzw. Fraktionen, liegt meist jedoch zwischen 0.7 und 0.8. In der Wärme ergibt sich durch Reaktion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 eine violette Farbe. Die Molmassenbestimmung gelingt mittels ESI- und EI-Massenspektren und ergibt 396 g/mol. Das 1H -NMR-Spektrum dieser Verbindung zeigt einige Charakteristika, die eine Identifikation erleichtern (vgl. Abbildung 40). Im olefinischen Bereich werden vier Protonen bei $\delta_H = 5.54, 5.36, 5.20$ und 5.15 detektiert, die jeweils als Dublett von Dublett vorliegen. Der sekundäre Alkohol ($\delta_H = 3.61$) sowie sechs Methylgruppen sind ebenfalls typisch für diese Verbindung.

5.2 Isoflavone

Vor allem bei Verwendung von Soja- und Malz-haltigen Nährmedien können die beiden Isoflavone Genistein **(74)** und Daidzein **(75)** aus den Extrakten des Kulturfiltrats gewonnen werden. Als typische Pflanzenmetaboliten ist der Ursprung dieser Verbindungen auf die für die Herstellung der Nährmedien verwendeten Komponenten zurückzuführen. Die Analyse von Soja-Extrakten hat gezeigt, dass die Isoflavone vor allem in Form ihrer Glykoside Genistin und Daidzin vorkommen¹⁵⁶ und nachweislich durch Fermentation, z. B. durch *Aspergillus oryzae*, zu **74** und **75** hydrolysiert werden¹⁵⁷. Häufig erfolgt eine weitere Katabolisierung der Isoflavone, wie z.B. für einige Pilze der Gattung *Fusarium* gezeigt wurde¹⁵⁸. Aus diesen Gründen sollte von einer potentiellen Produktion der Isoflavone durch Mikroorganismen¹⁵⁹ Abstand genommen werden.

Durch die Produktion der Isoflavone erhält die Pflanze durch deren fungizide Wirkung einen natürlichen Schutz gegen pathogene Pilze wie *Cladosporium herbarum*¹⁶⁰. Unter anderem wird die gesundheitsfördernde Wirkung von Soja-Produkten auf den menschlichen Organismus auf ihren hohen Isoflavon-Gehalt zurückgeführt. So soll die östrogene Wirkung dieser Substanzen die Beschwerden während der Menopause verringern¹⁶¹ und im Falle von **74** krebsvorbeugende Eigenschaften vorliegen¹⁶².

Im Dünnschichtchromatogramm der Rohextrakte können **74** und **75** in Form einer Doppelzone ($R_f = 0.66$ bzw. 0.57) erkannt werden, die UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm stark absorbiert und mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 braun färbt. Die Trennung dieser Substanzen gelingt am besten an Sephadex LH-20 (MeOH), wobei **75** mit einigem Abstand zuerst eluiert wird. Die Molmassenbestimmung mittels ESI-Massenspektrometrie ergibt für **74** 270 g/mol und für **75** 254 g/mol. Im 1H -NMR-Spektrum sind acht (**75**) bzw. sieben (**74**) charakteristische Signale im aromatischen Bereich zu erkennen, von denen jeweils zwei aufgrund der doppelten Intensität einem A_2B_2 -Spinsystem zugeordnet werden können (vgl. Abbildung 41). Für beide Substanzen ist ein weiteres aromatisches Ringsystem zu erkennen, welches bei **75** dreifach und bei **74** vierfach substituiert ist.

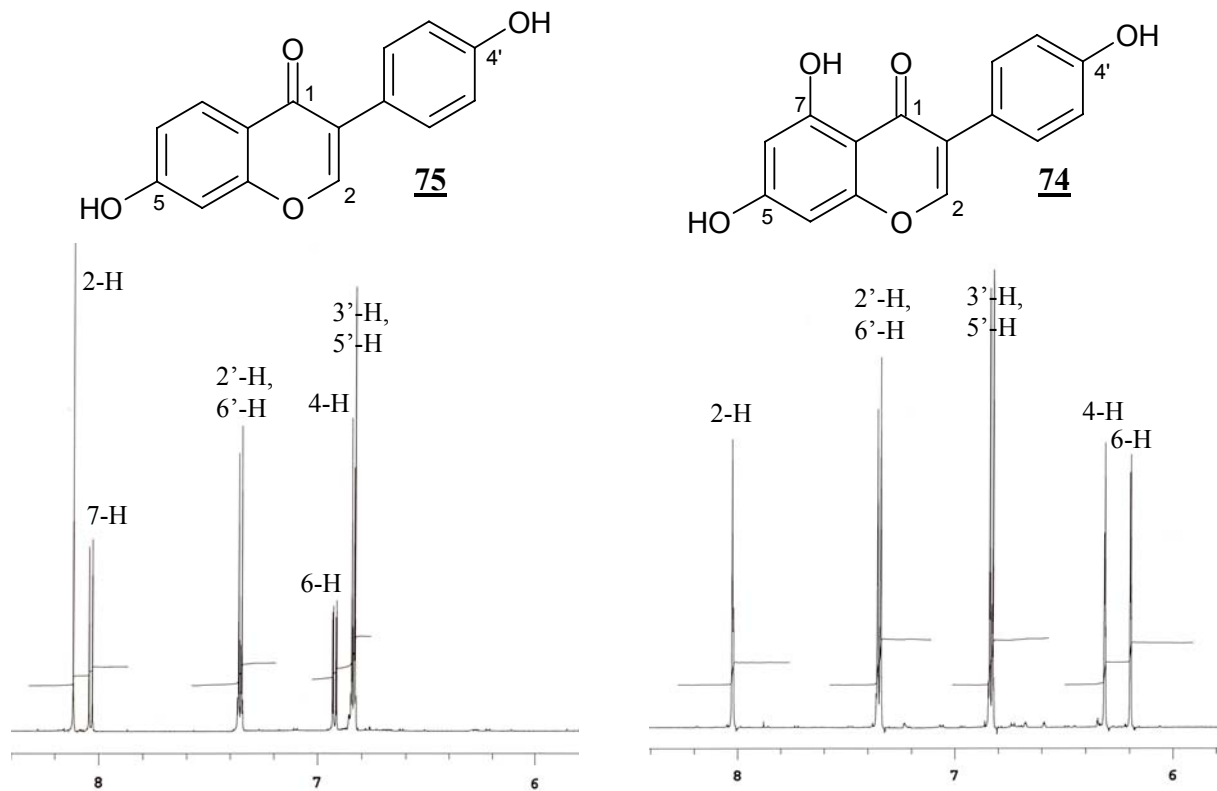
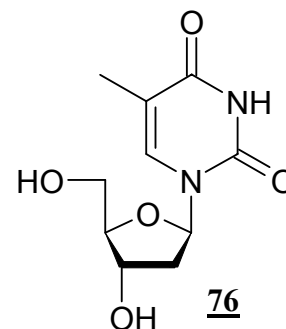


Abbildung 41: 1H -NMR-Spektren von Daidzein (**75**) und Genistein (**74**) in Methanol- d_4 .

5.3 Thymidin (76)

Thymidin (76), genauer Desoxythymidin, stellt als Nukleosid der Pyrimidin-Base Thymin einen Metaboliten des Primärstoffwechsels da. Sie findet nicht nur in der DNA sondern in seltenen Fällen auch in der tRNA Verwendung und kann somit in allen Organismen nachgewiesen werden¹⁶³.

Im Dünnschichtchromatogramm kann Thymidin als stark polare Substanz ($R_f = 0.16$) durch die Adsorption von UV-Licht bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ und eine grüne Färbung nach Reaktion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 nachgewiesen werden. Eine eindeutige Bestimmung gelingt bereits über die Messung eines EI-Massenspektrums, da diese Substanz in der NIST-Datenbank verzeichnet ist¹⁶⁴. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist durch die Resonanzen der methylierten Doppelbindung des Thymins bei $\delta_{\text{H}} = 7.81$ und 1.86 , sowie das anomere Proton der *D*-Desoxyribose bei $\delta_{\text{H}} = 6.28$ ($1'\text{-H}$) ebenfalls sehr charakteristisch.



6. Diskussion der Sekundärstoffproduktion endophytischer Pilze

Bei der Suche nach Sekundärstoffen mit interessanten biologischen Aktivitäten sind endophytische Pilze eine reichhaltige Quelle dar¹⁶⁵. Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Stämme wurden bereits im Vorfeld einem biologischen und chemischen Screening unterzogen, wodurch alle bearbeiteten Organismen mindestens einen Sekundärstoff mit interessanter Struktur oder biologischer Aktivität lieferten. Ausgehend von den Ergebnissen der von der BASF durchgeführten Mikrotests auf fungizide, herbizide und insektizide Wirksamkeit, ist es fast ausnahmslos gelungen, die aktiven Komponenten der bearbeiteten Stämme zielgerichtet zu isolieren. Ebenso konnten viele der im chemischen Screening auffälligen Sekundärstoffe in Reinform erhalten werden. Bei keinem der ausschließlich aufgrund des chemischen Screening isolierten Naturstoffe konnte im Nachhinein eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Hierdurch wird die hohe Aussagekraft der Mikrotests der Extrakte deutlich unterstrichen. Besonders ergiebig für die Isolierung physiologisch aktiver Naturstoffe waren erwartungsgemäß jene Stämme, die in beiden Screeningverfahren als auffällig eingestuft wurden.

Die Strukturaufklärung der Reinsubstanzen hat jedoch gezeigt, dass keiner der isolierten Naturstoffe eine neuartige Struktur aufwies. Viele der Verbindungen waren bereits seit Jahrzehnten in der Literatur bekannt, zwei waren in Form von chemisch leicht modifizierten Derivaten beschrieben. Dieses Ergebnis erscheint verwunderlich, werden doch Pilze in den letzten Jahren als die für die Naturstoffforschung aussichtsreichsten Produzenten eingestuft¹⁶⁶. Die Isolierung bekannter Sekundärstoffe spiegelt jedoch einen in den letzten Jahren verstärkt beobachteten Trend der Naturstoffchemie wieder, denn die Zahl der isolierten Verbindungen völlig neuen Types nimmt immer weiter ab (vgl. Einleitung). Daran konnte auch die Entwicklung vollautomatisierter und somit enorm durchsatzstarker Verfahren, wie z.B. des von der pharmazeutischen Industrien favorisierten *High-Troughput-Screenings* (HTS), oder die Durchführung von umfangreichen Bioassays auf immer neue biologische Wirkungen nichts ändern. Beispielsweise konnten aus den 70 zwischen 1995 und 2000 von der Firma *GlaxoSmithKline* durchgeführten HTS-Kampagnen lediglich fünf Leitstrukturen für antibakterielle Wirkstoffe erhalten werden¹⁶⁷. Aufgrund der hohen Kosten für diese Ansätze verwundert das zwischenzeitlich stagnierende Interesse der Industrie an antibakteriellen Naturstoffen keineswegs¹⁶⁸. Ob diese von der Industrie für die Suche nach neuen Naturstoffen angewandten Strategien den richtigen Ansatzpunkt darstellen ist ebenfalls in Frage zu stellen.

Dennoch erscheint die Erforschung pilzlicher Sekundärstoffe weiterhin als aussichtsreich. So hat die kürzliche Sequenzierung des Genoms von *Fusarium graminearum* exemplarisch gezeigt, dass das Biosynthesepotential selbst gründlich erforschter Pilze wesentlich größer zu sein scheint als bisher angenommen und belegt wurde¹⁶⁹. Die Funktionsanalyse der Gene hat ergeben, dass verteilt über das gesamte Genom die Gencluster von 15 Polyketidsynthasen codiert sind¹⁷⁰. Bisher konnten nur für fünf dieser Enzyme eine Beteiligung an der Biosynthese von Zearalenon, Aurofusarin, Fusarin C sowie an der Pigmentbildung in den Fruchtkörpern nachgewiesen werden. Die durch die verbleibenden 11 PKS-Enzyme produzierten Sekundärstoffe sind bisher nicht bekannt. Für die Aktivierung dieser stillen Biosynthesewege bieten sich verschiedene Herangehensweisen. Eine Möglichkeit liegt in der Kultivierung der Organismen unter OSMAC-Bedingungen. Durch die Variation der Kultivierungsbedingungen gelingt es vielfach diese Biosynthesewege zu aktivieren und so zu bisher nicht produzierten Substanzen des Sekundärstoffwechsels zu gelangen. Bei *Aspergillus ochraceus* gelang es auf diese Weise neben den unter Standardbedingungen produzierten Aspinonen 15 weitere Sekundärstoffe zu isolieren, die über fünf unabhängige Biosynthesewege gebildet werden¹⁷¹. Erneut lieferte die Genetik einen Beweis für die Richtigkeit dieses Ansatzes, indem bei Pilzen für die Sekundärstoffproduktion spezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten. Die Produktion dieser Proteine wird über einen komplexen Regulationsmechanismus gesteuert und geschieht unter anderem in Abhängigkeit der verfügbaren Nährstoffe und des pH-Werts. Erst wenn es in Zukunft gelingt, die Transkriptionsfaktoren von bisher inaktiven Biosyntheseclustern durch Sequenzierung der DNA zu identifizieren und weitere Kopien dieser Genabschnitte im Genom zu platzieren, könnte eine Aktivierung der ruhenden Biosynthesapparate auch ohne den OSMAC-Ansatz gelingen. Für die Aflatoxine konnte bereits gezeigt werden, dass es auf diesem Weg möglich ist, die Expression der Biosynthese-Proteine und damit die Produktion dieses Mycotoxins anzuregen¹⁷².

Der nicht vorhandene Anteil neuer Strukturen aus den in dieser Arbeit diskutierten Pilzen ist also nicht auf die Wahl der Organismen aus einer falschen Quelle zurückzuführen. Marine Mikroorganismen und im Besonderen endophytische Pilze liefern eine gute Grundlage für die Isolierung von interessanten Naturstoffen¹⁷³. Die im biologisch-chemischen Screening erhaltenen Ergebnisse waren dementsprechend viel versprechend. Das Problem stellt die sehr zeitintensive Aufreinigung sowie spektroskopische Erfassung der Reinsubstanzen und damit die geringe Anzahl der bearbeiteten Pilze dar. Dies sei am Beispiel der aus

Beauveria sp. Stamm BS 6750 isolierten Decarestrictine veranschaulicht. Für die Kultivierung und Aufarbeitung des Stammes können ca. 4 Wochen veranschlagt werden. Für die Aufreinigung der Substanzen müssen eine Rohproduktsäule sowie zwei Trennungen an Sephadex LH-20 durchgeführt werden, was eine weitere Woche Arbeitszeit in Anspruch nimmt. Die Messung der NMR-Experimente (^1H -, ^{13}C -, COSY-, HSQC-, HMBC- und 2D-NOE-Spektren) veranschlagte eine reine Messzeit von ca. 24 Stunden und erfolgte über den Zeitraum einer Woche. Die Auswertung der NMR-Spektren, die Suche nach Literatur, die Messung der IR- und MS-Spektren sowie die Bestimmung des Drehwerts benötigt bei Bearbeitung durch eine einzelne Person weitere drei Tage. Es muss also davon ausgegangen werden, dass von der Kultivierung bis zur Aufklärung einer literaturbekannten Struktur mindestens 6 Wochen vergehen. In vielen Fällen ist die tatsächlich benötigte Zeit aufgrund von parallel durchgeführten Arbeiten, Problemen bei der Trennung und Wartezeiten für die Messungen der NMR- und MS-Experimente wesentlich länger.

Es erscheint somit unumgänglich die Kriterien, die zur Kultivierung eines Stammes im großen Maßstab und zur Isolierung der Sekundärstoffe durch konventionelle Chromatographiemethoden führen, neu zu überdenken. Das Auffinden einer biologischen Aktivität in einem Rohextrakt oder einer interessanten Zone in einem Dünnschichtchromatogramm wird wohl auch in Zukunft das erste Kriterium bleiben, wenn es darum geht das Biosynthese-Potential eines Organismus einzuschätzen. Allerdings sollte durch geeignete Methoden möglichst schnell überprüft werden, ob es sich bei den Hauptmetaboliten des Sekundärstoffspektrums tatsächlich um potentiell neue Sekundärstoffe handelt. Um eine Re-Isolierung von bekannten Verbindungen zu vermeiden bietet es sich an, auf gekoppelte Analytikverfahren zurückzugreifen. Die im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen derzeit verfügbaren technischen Möglichkeiten bieten dazu nur eingeschränkte Möglichkeiten. Zwar ist eine LC-MS-Analytik von Rohprodukten und angereicherten Fraktionen möglich, doch kann diese nur durch Kombination einer DAD-HPLC mit einer ESI-Ionenquelle und Quadrupol-Ionenfalle erfolgen. Die Aussagekraft der so erhaltenen Daten kann durch die zum Teil insuffiziente Ionisierung und die Ungenauigkeit der Molmassenbestimmung eingeschränkt. Eine Datenbank, mit der die erhaltenen korrelierten Daten abgeglichen werden können, ist nicht verfügbar. Auf diese Weise ist eine Isolierung der Sekundärstoffe im mg-Maßstab weiterhin unumgänglich, wenn eine eindeutige Struktur-Bestimmung durch NMR-Experimente erreicht werden soll. Bereits durch den Einsatz einer weiteren Ionenquelle, wie z. B. API, oder eines

Massenanalysators mit höherer Auflösung (vgl. Einleitung) könnte die Effizienz der LC-MS-Analytik von Sekundärstoffmischungen deutlich verbessert werden. Die Verwendung von LC-NMR und LC-MSⁿ erscheint zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der hohen Kosten für die Anschaffung / Instandhaltung der Geräte und der Kinderkrankheiten dieser modernen Verfahren im universitären Betrieb nicht angebracht. Die Isolierung der Reinsubstanzen sollte nur dann durchgeführt werden, wenn ausgehend vom biologisch-chemischen Screening sowie einer verbesserten LC-MS-Analytik die Präsenz eines attraktiven Sekundärstoffs angenommen werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass endophytische Pilze und andere Mikroorganismen auch weiterhin eine viel versprechende Quelle neuer Naturstoffe repräsentieren. Man geht davon aus, dass heute nur ca. 1% der weltweit vorkommenden Mikroorganismen und Pilze isoliert und sogar nur 0.1% auf ihre Sekundärstoffproduktion überprüft wurden, so dass trotz allen Pessimismus der pharmazeutischen Industrie noch sehr viele neue Naturstoffe auf ihre Entdeckung warten. Aufgrund der enormen Diversität dieser Organismen, können die Auswahlkriterien für eine Bearbeitung nach konventionellen Methoden sehr eng gesteckt werden. Durch eine sorgfältigere Auswahl der zu bearbeiteten Spezies und eine weitere Verbesserung der Dereplikations-Techniken sollte in Zukunft der Anteil der neuen Naturstoffe erhöht und die Re-Isolierung bekannter Verbindungen verringert werden.

7. Abbaureaktionen an Simocyclinon D8

7.1 Die Substanzklasse der Simocyclinone

Simocyclinon D8 (**85**) wurde neben einer Reihe anderer Simocyclinone aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 isoliert und im Jahr 2000 im Arbeitskreis ZEECK in seiner Struktur aufgeklärt¹⁷⁴. Die Simocyclinone werden anhand ihres modularen Aufbaus aus einem polyketidischem Angucyclinon, einer Didesoxyhexose, einer Tetraenseitenkette und einem Aminocoumarin in vier Reihen (A-D) klassifiziert. Nur die Simocyclinone der D-Reihe enthalten alle genannten Elemente, während die der A-Reihe lediglich aus dem Angucyclinon bestehen (Abbildung 42).

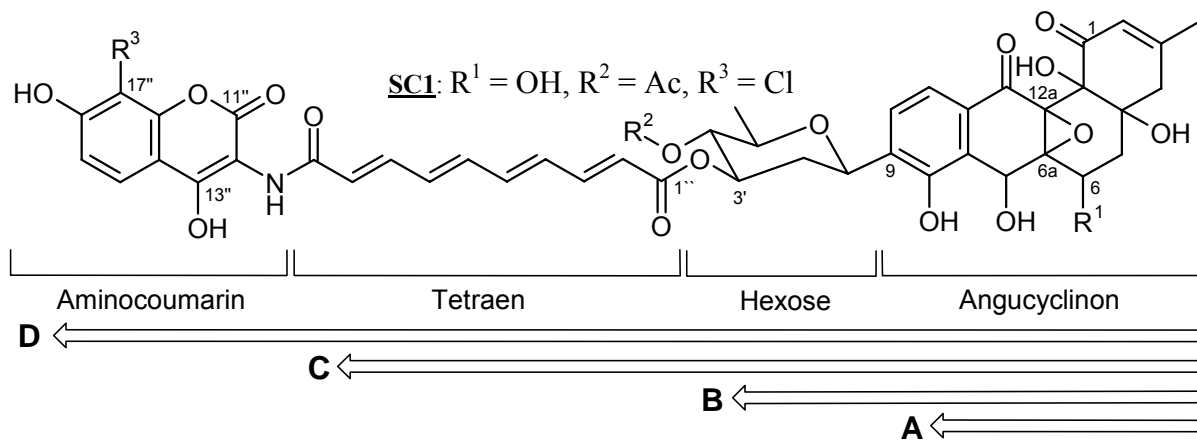


Abbildung 42: Allgemeine Struktur der Simocyclinone.

Allen Simocyclinonen gemeinsam ist das stark sauerstoffhaltige Angucyclinon Grundgerüst vom Aquayamycin-Typ¹⁷⁵, welches an den Kohlenstoffatomen 6a und 12a zusätzlich ein Epoxid trägt. Bei der an Position 9 des Angucyclinons C-glykosidisch gebundenen Desoxyhexose handelt es sich um die D-Olivose, welche bei einigen Derivaten an der 4'-Hydroxylgruppe acetyliert ist. Für glykosylierte Angucyclinone ungewöhnlich ist die Veresterung des Zuckers an der 3'-Hydroxylgruppe mit Decatetraensäure, die sonst nur bei den acyclischen, polyenen Fumagillinen (siehe Seite 96) vorkommt¹⁷⁶. Die amidische Bindung des in der Natur recht seltenen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarins erfolgt auf der anderen Seite der Disäure. Innerhalb der Substanzfamilie unterscheiden sich die Simocyclinone durch eine optionale Hydroxylierung am Angucyclinon (R^1), die Acetylierung des Zuckers (R^2) bzw. Chlorierung des Aminocoumarins (R^3).

Von den daraus resultierenden 18 möglichen Derivaten konnten durch Variation der verwendeten Kultivierungsbedingungen (OSMAC) alle bis auf vier aus Kulturen von Tü 6040 isoliert werden¹⁷⁷. Simocyclinon D8 (**85**) stellt zugleich den Hauptmetabolit des Stamms Tü 6040, als auch den höchst substituierten Vertreter ($R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{Cl}$) dieser Substanzklasse dar.

7.2 Die Biosynthese der Simocyclinone

Durch ihre modulare Struktur vereinen die Simocyclinone der D-Reihe mehrere Bausteine biologisch aktiver Naturstoffe. Dies spiegelt sich auch in der Biosynthese wieder, welche Intermediate des Carbonsäure-, des Zucker- und des Aminosäurepools der Zelle kombiniert und somit auf drei zentrale Stoffwechselwege zurückgreift. Den polyketidischen Charakter des Angucyclinons und der Decatetraendisäure konnte man durch Fütterung mit $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ - sowie $[2-^{13}\text{C}]$ Malonat eindeutig belegen¹⁷⁸. Der Einbau von Acetat konnte nicht überprüft werden, da dieser die Simocyclinon-Biosynthese hemmt. Das Einbaumuster entsprach dem für Angucyclinone zu erwartenden Decaketid bzw. dem vom Fumagillin bekannten Pentaketid¹⁷⁹. Die Aminocoumarin-Einheit leitet sich von *L*-Thyrosin (**82**) ab, was anhand des strukturverwandten Novobiocins durch Fütterung der $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ - bzw. $[\text{O}-^{18}\text{O}]$ -markierten Aminosäure gezeigt werden konnte¹⁸⁰. Ausgangsstoff der Didesoxyhexose ist ganz analog zum Urdamycin bzw. Aquayamycin die *D*-Glucose¹⁸¹. Die neben Simocyclinon D8 (**85**) aus Tü 6040 isolierten Simocyclinone der A-, B- und C-Reihe legen nahe, dass der Aufbau dieser Verbindungen ausgehend vom aromatischen System stufenweise erfolgt. Das Angucyclinon wird glykosidiert, an der 3'-Hydroxylgruppe verestert und dann mit dem Aminocoumarin über eine Amidbindung verknüpft. Diese anhand von Fütterungsexperimenten bzw. Variation der Kultivierungsbedingungen gewonnen Kenntnisse spiegeln sich auch in der Sequenzierung des Simocyclinon-Genclusters wieder. Mit insgesamt 49 open-reading-frames und einer Größe von 120 kb erweist sich dieser als ähnlich komplex wie die chemische Struktur der Simocyclinone erwarten lässt¹⁸². Durch Homologie zu bekannten Genclustern stellte sich heraus, dass für die Biosynthese des Angucyclinons eine iterative PKS vom Typ II genutzt wird, die neben der minimalen PKS auch die für die Modifikation des Decaketids (**77**) benötigten Cyclasen und Ketoreduktasen enthält. Die für die chemische Modifikation der *D*-Glucose zur *D*-Olivose benötigte Reaktionssequenz, erschloss sich ebenfalls durch Analyse der verantwortlichen Gene¹⁸³. Es wird postuliert, dass Glucose-1-phosphat (**78**) zunächst auf ein Nukleosiddiphosphat (NDP) übertragen und durch jeweils zwei Dehydratasen und Ketoreduktasen zur NDP-*D*-Olivose (**79**) reduziert wird.

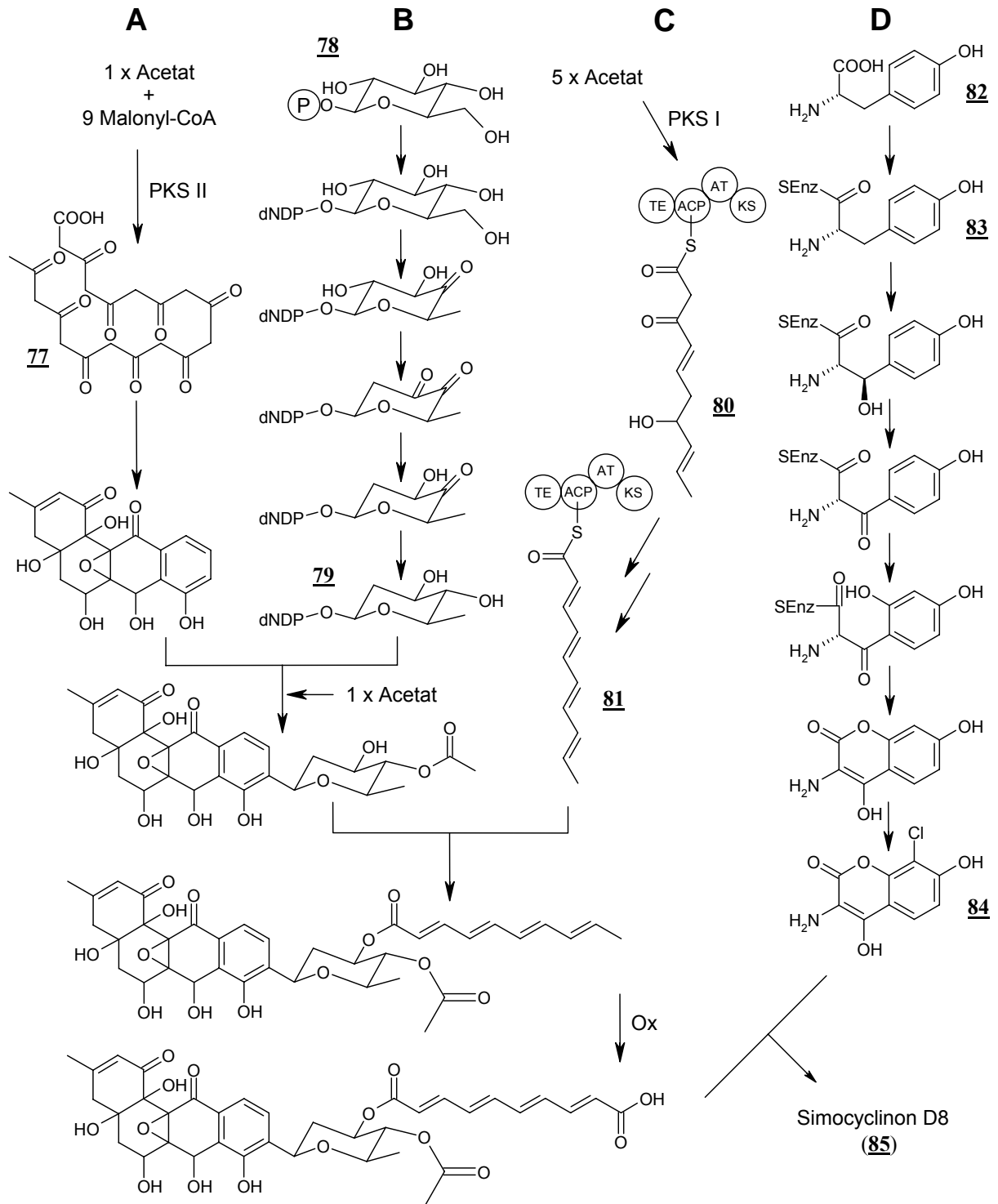


Abbildung 43: Die aufgrund der Analyse des Genclusters angenommene modulare Biosynthese von Simocyclin D8 (**85**): Ausgehend vom Angucyclinon (A) erfolgt die C-glykosidische Verknüpfung mit der Zuckereinheit (B). Die Fettsäureseitenkette (C) wird O-glykosidisch an den Zucker gebunden, am Ende oxidiert und abschließend über eine Amidbindung mit dem Aminocoumarin (D) gekoppelt.

Innerhalb des Simocyclinon Genclusters konnte eine Glykosyltransferase für die Verknüpfung des Zuckers mit dem Angucyclinon und eine Acyltransferase für die Acetylierung an der 4'-Hydroxylgruppe identifiziert werden. Eine weitere PKS, diesmal vom modularen Typ I, ist für die Biosynthese der Decatetraendisäure zuständig und laut Sequenzierung aus vier Modulen aufgebaut. Diese einzelnen Domänen führen allerdings nicht zu dem erwarteten vierfach ungesättigten Pentaketid (**81**). Erst nach Reduktion und Dehydratisierung durch zwei außerhalb des PKS-Gens nachgewiesene Enzyme (KR, DH) kann der Vorläufer der Seitenkette (**80**) an die *D*-Olivose übertragen werden. Für die Oxidation der Decatetraensäure zur Dicarbonsäure werden Enzyme verantwortlich gemacht, die in ihrer Sequenz eine große Ähnlichkeit zu Dioxygenasen bzw. Aldehyd-Dehydrogenasen anderer Organismen aufweisen und wahrscheinlich erst nach der Kopplung der Seitenkette aktiv werden. Ausgangssubstrat der Aminocoumarin-Biosynthese ist das schon erwähnte *L*-Tyrosin (**82**). Die ausgeprägte Homologie zu sechs an der Biosynthese von Coumermycin (**86**) und Novobiocin (**87**) involvierten Enzymen legt nahe, dass diese ebenfalls über eine Folge von Hydroxylierungen und Dehydrierungen eines enzymgebundenen Intermediats (**83**) erfolgt. Dieses wird abschließend enzymvermittelt lactonisiert und an Position 8 wird durch eine Halogenase ein Chloratom eingeführt. Für die Verknüpfung des Aminocoumarins (**84**) mit der Seitenkette des Angucyclinons wird eine Amidsynthetase verwendet. Die freie Carboxylgruppe des Tetraens wird in Gegenwart von ATP zum Acyl-AMP-Intermediat umgesetzt und anschließend durch die Aminogruppe des Aminocoumarins nukleophil angegriffen.

7.3 Zur biologischen Aktivität der Simocyclinone

Die Simocyclinone der A-, B-, C- und D-Reihe unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe sondern auch in ihrer biologischen Aktivität. Alle isolierten Simocyclinone wurden auf ihre antibakterielle und fungizide Wirkung getestet, wobei sowohl für die A- als auch die B-Reihe keine Wirkung zu verzeichnen war. Die Verbindungen der C-Reihe zeigen bereits eine schwache aber selektive Hemmung des Wachstums von Gram-positiven Bakterien, werden jedoch von denen der D-Reihe, insbesondere von Simocyclinon D8 (**85**), deutlich in den Schatten gestellt. Zu der weiterhin selektiven antibiotischen Wirkung auf Gram-positive Keime kommt eine cytostatische, jedoch auch in hohen Konzentrationen nicht cytotoxische Wirkung. Einige Tumorzelllinien aus der Bauchspeicheldrüse und der weiblichen Brust (HMO 2 und MCF 7) werden durch (**85**) stärker in ihrer Proliferation inhibiert als durch das klinischen verwendete 5-Fluoruracil. Aufgrund der ebenfalls antibiotisch wirksamen

Aminocoumarine Coumermycin A₁ (**86**), Novobiocin (**87**) und Chlorobiocin (**88**) wurde zunächst ein ähnlicher Wirkmechanismus vermutet¹⁸⁴. Die klassischen Aminocoumarine wirken an der B-Untereinheit der Gyrase und hemmen dort kompetitiv die ATPase. In der Tat ist es das gleiche Enzym, das von den Simocyclinonen inaktiviert wird. Die Hemmung der Gyrase durch Simocyclinone ist allerdings unabhängig von ATP und impliziert somit einen anderen Wirkmechanismus. Es zeigte sich, dass die die Simocyclinone, ähnlich dem synthetischen Chinolon-Antibiotikum Ciprofloxacin (**89**), die Komplexbildung zwischen dem Enzym Gyrase und DNA beeinflussen. Es kommt dabei jedoch nicht zu einer Chinolon-typischen Stabilisierung des Komplexes, sondern zu einer Blockade des N-terminalen Endes der A-Untereinheit und somit zur Verhinderung der Bindung zwischen DNA und Enzym¹⁸⁵.

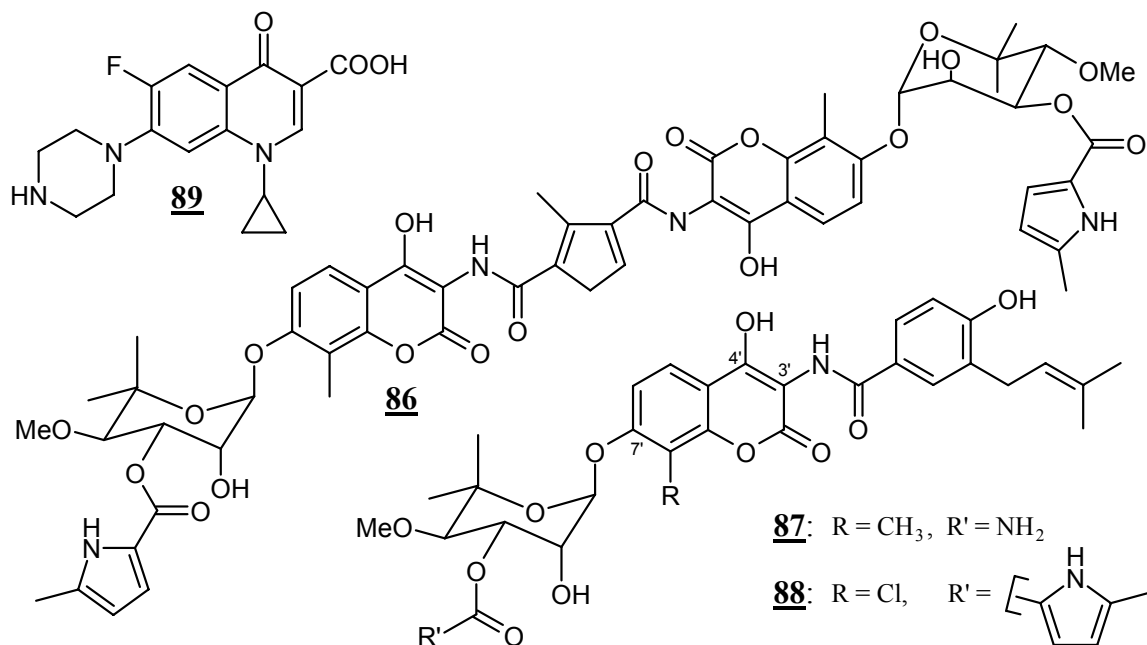


Abbildung 44: Hemmstoffe der bakteriellen Gyrase: Ciprofloxacin (**89**), Coumermycin A₁ (**86**), Novobiocin (**87**) und Chlorobiocin (**88**).

Um einen genaueren Einblick in die Strukturwirkungsbeziehung zwischen den Aminocoumarinen und der Gyrase zu erhalten, wurden durch kombinatorische Biosynthese neue Derivate generiert und diese auf ihre inhibitorischen Eigenschaften überprüft. Aufgrund der geringen Substratspezifität der Simocyclinon-Amidsynthetase (*SimL*) gelang es eine Tetraseitenkette auf den Novobiocin-Chromophor zu übertragen. Dazu wurde eine Tandem-Inkubation von *SimL*, der für das Tailoring an Position 7' des Novobiocins verantwortlichen Enzyme (*NovM*, *NovN* und *NovP*) sowie deren Substrate 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin, Decatetraensäure, ATP, SAM und Carbamoylphosphat

durchgeführt¹⁸⁶. Das so erzeugte Novobiocinanalogue (**90**) zeigte eine um den Faktor sieben ($IC_{50} = 0.6$ vs. $4.3 \mu M$) geringere Gyrase-Hemmung als **87**, wobei der genauen Angriffspunktes an der Gyrase unbestimmt ist. Weitere Arbeiten an Novobiocin-Analoga konnten bestätigen, dass die Zuckereinheit entscheidend für die ATPase-Hemmung ist¹⁸⁷. Nur durch die an 3'-OH acylierte Noviose kommt es durch Wasserstoffbrücken zu hydrophilen Aminosäuren im aktiven Zentrums zu einer kompetitiven Abschirmung der Bindungsstelle des Adeninrings von ATP. Der Einfluss der amidischen Seitenkette hat bei diesen Verbindungen nur Einfluss auf die Wirkstärke, während der Zucker die Selektivität dominiert. Welche Strukturelemente für die Bindung an das N-terminale Ende der B-Untereinheit essentiell sind ist bisher nicht bekannt. Da bereits die Simocyclinone der C-Reihe eine schwache und erst die der D-Reihe starke antibiotische Wirkung aufweisen, scheint ein Wechselspiel des Aminocoumarins mit der Tetraenstruktur entscheidend zu sein.

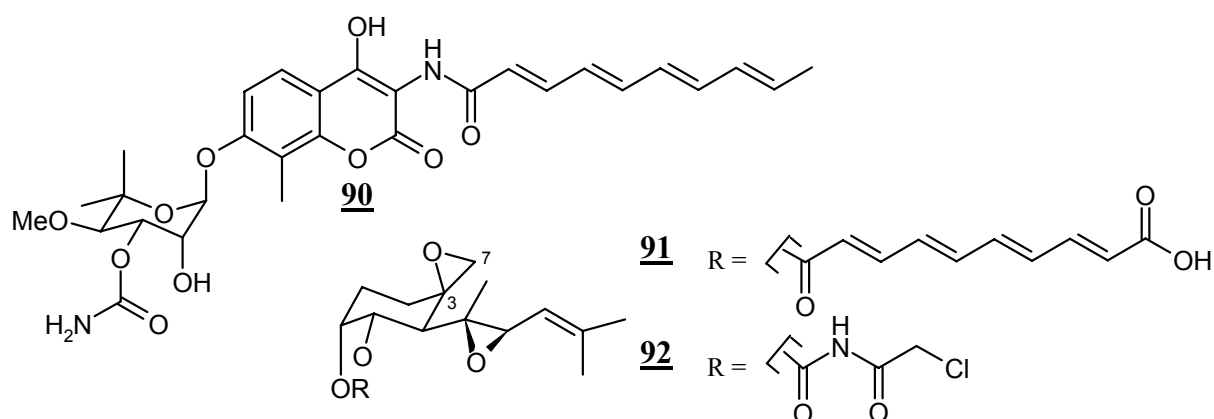


Abbildung 45: Novobiocinanalogue (**90**), Fumagillin (**91**) und TG-450 (**92**).

Unterstützt wird diese These durch die antiangiogene Wirkung des Fumagillins (**91**), welches ebenfalls eine Decatetraendisäure-Einheit als Seitenkette enthält¹⁸⁸. **91** hemmt die komplexen Mechanismen der Blutgefäßbildung selektiv indem es den Zellzyklus der Endothelzellen durch Blockade der Methionin-Aminopeptidase 2 (MetAP-2) in der späten G_1 -Phase arretiert. Es gelang MetAP-2 mit gebundenem **91** zu kristallisieren und durch Röntgenstrukturbestimmung einen genauen Einblick in die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und aktivem Zentrum zu erhalten¹⁸⁹. Das Epoxid an den Kohlenstoffatomen C-3 und C-7 bindet kovalent an einen Histidin-Rest, während die Seitenketten das Molekül durch hydrophobe Wechselwirkung in eine definierte Lage innerhalb des aktiven Zentrums gebracht wird. Durch TG-450 (**92**), einem synthetischen Abkömmling des Fumagillins (**91**), wird zusätzlich die für die Angiogenese benötigte Phosphorylierung des Genprodukts der

Retinoplasten, die Cyclin-abhängige Aktivierung der cdk2ya-Kinase und die Expression der Cycline A und E inhibiert. Der Mechanismus der Inhibition bleibt unverändert, auch hier erfolgt die Bindung kovalent an die aktiven Zentren der betroffenen Enzyme. Für eine selektive biologische Aktivität ist demnach nicht nur ein potenter Pharmakophor nötig, sondern zusätzlich eine dirigierende Gruppe die individuell an den Wirkort angepasst ist.

Bisher ist es durch kombinatorische Biosynthese nicht gelungen, Simocyclinon-Derivate zu erzeugen, die nicht über die Desoxyhexose- und Angucyclinon-Einheit verfügen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, das Aminocoumarin mit der Decatetraendisäure als Seitenkette durch Spaltung von Simocyclinon D8 (**85**) zu erhalten und die biologische Aktivität der Spaltprodukte zu testen. Aufgrund der chemischen Labilität von **85** ist es nicht möglich, selektiv die C-glykosidische Bindung zwischen Angucyclinon und *D*-Olivose selektiv zu spalten und so zu ermitteln, inwiefern die Hexose für die Gyrase-Inhibition essentiell ist.

7.4 Abbaureaktionen

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Abbaureaktionen war eine selektive Spaltung der acylischen Bindung zwischen der *D*-Olivose und der Decatetraendisäure des Simocyclinon D8 (**85**). Der für die Abbaureaktionen verwendete Naturstoff wurde von Prof. H.-P. FIEDLER als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt. Aufgrund der labilen chemischen Struktur von **85** wird klar, dass die für eine Spaltung nötigen Reaktionsbedingungen mit Bedacht gewählt werden müssen. Aufgrund der zu erwartenden höheren Reaktivität des Esters gegenüber dem Amid erschien eine selektive Spaltung generell erreichbar zu sein. Die Säurelabilität der Polyenamid- und Lactonbindung des Aminocoumarins gab vor, dass bevorzugt basische Bedingungen für die Spaltung der Esterbindung verwendet werden sollten. In der Literatur findet man für die Verseifung von komplex aufgebauten Naturstoffen zahlreiche Beispiele. So haben Hydrolyseversuche am Bafilomycin C₁ (**93**) gezeigt, dass eine selektive Abspaltung der Seitenkette an C-21 durch Derivatisierung und anschließende Umsetzung mit Natriumhydroxid ohne Nebenprodukte möglich ist. Wird vor der Hydrolyse das Halbacetal an C-19 durch Methylierung stabilisiert, kann die ansonsten bereits in leicht alkalischer Lösung ablaufende Öffnung des Pyrans verhindert werden¹⁹⁰. Ein anderes Reagenz kam beim Abbau von Zofimarin (**94**) zum Einsatz¹⁹¹. Hier erfolgte die Hydrolyse unter Verwendung von Natriummethanolat als Base und es konnte das 3'-Hydroxy-sordarin erhalten werden. In der Zuckerchemie wird häufig eine Acetylierung von Hydroxylgruppen

durchgeführt, um diese vorübergehend zu schützen. Die Entschützung dieser Gruppen findet in der Regel unter Verwendung von Methanolaten oder Ammoniak als Base statt¹⁹². Besonders die Verwendung von Ammoniak hat sich durch die hohe Regioselektivität bei Anwesenheit weiterer hydrolyseempfindlicher Gruppen bewährt¹⁹³. Die Ähnlichkeiten der hier beschriebenen Reaktionen zu der an Simocyclinon D8 (**85**) geplanten Spaltung gaben erste Anhaltspunkte, welche Reagenzien in Frage kommen, um das Ziel zu erreichen.

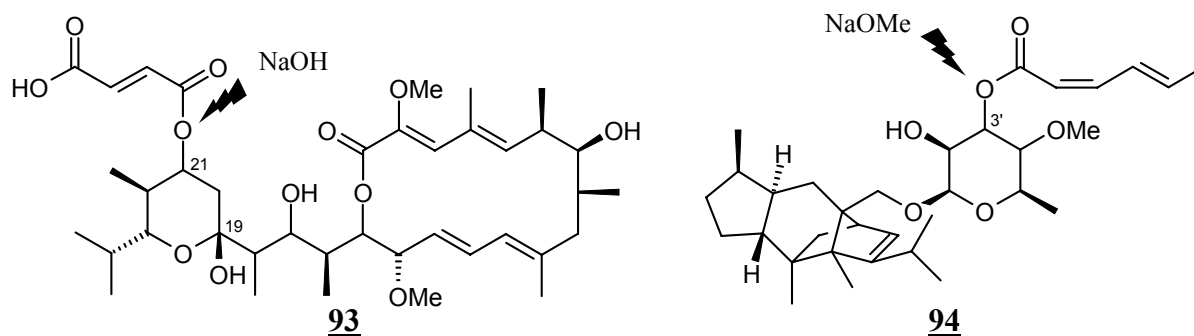


Abbildung 46: Die an den Naturstoffen Bafilomycin C₁ (**93**) und Zofimarin (**94**) durchgeführten Spaltung der acylischen Bindung zur Seitenkette.

7.4.1 Vorversuche

Um die geeigneten Bedingungen für die Verseifung zu finden wurden Testreaktionen mit den Basen Natriumhydroxid, Natriumhydrogencarbonat, Natriummethanolat und Ammoniak durchgeföhrt. Als Lösungsmittel eignete sich Methanol aufgrund der mäßigen Löslichkeit von Simocyclinon D8 in lipophilen Solventien und der geplanten Verwendung von wässrigen Reagenzien am besten. Die Reaktionen wurden jeweils mit Lösung von 5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) in 2.0 mL Methanol durchgeföhrt, um einen quantitativen und qualitativen Vergleich der Reaktionsgemische zu ermöglichen. Der Reaktionsverlauf der Vorversuche wurde durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Mittels LC-MS wurden die Rohprodukte auf ihre Zusammensetzung überprüft und gegebenenfalls eine Gelchromatographie an Sephadex LH-20 durchgeföhrt, um die erhaltenen Reaktionsprodukte NMR-Experimenten zugänglich zu machen. Die Molmassen der zu erwartenden Spaltprodukte sind in Tabelle 9 angegeben. Es muss auch beachtet werden, dass aufgrund des gewählten Reagenzien eine Bildung der Methylester möglich ist und nicht die freie Carbonsäure erhalten wird. Für die geplanten Aktivitätstest stellen sowohl die freie Säure als auch der Methylester interessante Verbindungen dar.

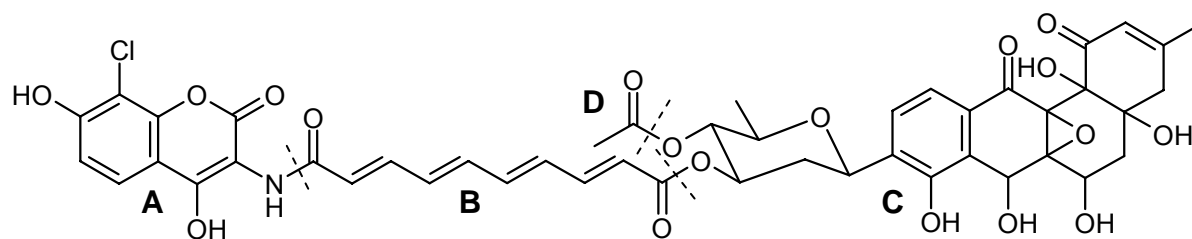


Abbildung 47: Fragmentierung von (**85**) unter basischen Bedingungen.

Tabelle 9: Zu erwartende Molmassen und ESI-Ionen der möglichen Spaltprodukte. Die gewünschten Spaltprodukte sind in der Tabelle grau hinterlegt.

Fragment	Molmasse [g/mol]	pos. Ionen $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ [m/z]	neg. Ionen $[M-H]^-$ [m/z]
D	60	61, 83	59
D (Methylester)	74	75, 97	73
B	194	195, 217	193
B (Dimethylester)	222	223, 245	221
A	227	228, 250	226
A + B	403	404, 426	402
A + B (Methylester)	417	418, 440	416
C	504	505, 527	503
C + D	546	547, 569	545
A + B + C	889	890, 912	888
A + B + C + D	931	932, 954	930

Spaltung mit Natriumhydroxid

5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) wurden in methanolischer NaOH-Lösung (pH = 10) gelöst und bei RT für drei Stunden gerührt. Nach Neutralisation mit verdünnter Salzsäure wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organische Phasen mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Auswertung der Dünnschichtchromatogramme ergab eine unselektive Zersetzung von **85** in zahlreiche Produkte. Auf eine weitere Analytik wurde daher verzichtet.

Spaltung mit Natriumhydrogencarbonat

Zu einer methanolischen Lösung von **85** (5.0 mg, 0.005 mmol) wurde ein Gewichtsäquivalent gepulvertes Natriumhydrogencarbonat (5.0 mg, 0.060 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Da nach zwei Stunden kein Umsatz des Edukts zu erkennen war, wurde die Reaktion weitere 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt und anschließend analog der Umsetzung mit Natriumhydroxid aufgearbeitet. Die LC-MS-Analytik zeigte, dass es sich hierbei im wesentlichen um Fragment C ($R_t = 7.1$ min) handelt. Das A+B Fragments oder

seine Methylesters konnten auch durch gezielte Suche der Ionen in den LC-MS-Chromatogrammen nicht nachgewiesen werden.

Spaltung mit Natriummethanolat

Das in Methanol gelöste Simocyclinon (5.0 mg, 0.005 mmol) wurde unter Rühren mit vier Äquivalenten einer 0.1 M Natriummethanolat-Lösung (200 μ L, 0.020 mmol) umgesetzt. Die Reaktion erfolgte zunächst bei -20 °C, wobei kein Umsatz des Edukts erfolgte. Erst nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur konnte man die Bildung von Spaltprodukten bei der Reaktionskontrolle erkennen. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach ca. vier Stunden indem die Reaktionslösung in 5 mL eiskalte 1 M HCl gegossen wurde. Extraktion mit Ethylacetat und Waschen der organischen Phase lieferte das Rohprodukt, welches durch LC-MS-Analytik auf seine Zusammensetzung überprüft wurde. Hauptkomponente war nicht umgesetztes **85** mit einer Retentionszeit von 16.8 min. Die gewünschten Produkte konnten in geringem Umfang mit $R_t = 7.2$ min (Fragment C) und 15.5 min (Methylester des Fragments A+B) nachgewiesen werden. Minderkomponenten der Reaktion waren Fragment A ($R_t = 20.2$ min) und der Dimethylester von Fragment B ($R_t = 12.7$ min).

Spaltung mit Ammoniak

Für die Spaltung von **85** (5.0 mg, 0.005 mmol) mit Ammoniak wurde dieses in Methanol gelöst und bei 0 °C mit dem gleichen Volumen einer 7 M Lösung der Base, die zuvor durch Verdünnen einer 28%igen wässrigen Ammoniaklösung mit Methanol hergestellt wurde, umgesetzt. Bereits nach einer halben Stunde waren bei der Reaktionskontrolle zwei neue Zonen knapp ober- und unterhalb des Edukts zu erkennen. Die Intensität dieser Zonen nahm im Verlauf der nächsten sechs Stunden nur langsam zu. Weitere Reaktionsprodukte waren im DC nicht nachweisbar. Ein vollständiger Umsatz von **85** erfolgte auch nach dem Entfernen der Kühlung und Fortsetzen der Reaktion für weitere 12 Stunden nicht. Daraufhin wurde die Reaktion abgebrochen, indem die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt wurde. Die LC-MS-Analyse des Rohprodukts ergab als Hauptprodukt der Reaktion den Methylester des gewünschten Fragments A + B ($R_t = 15.6$ min). In wesentlich geringerem Umfang konnte erstmals auch die freie Säure A + B ($R_t = 14.3$ min) nachgewiesen werden. Als Nebenkomponenten wurden die Fragmente C (**96**) ($R_t = 7.4$ min) und A ($R_t = 20.3$ min) gebildet. Der Anteil des nicht umgesetzten Simocyclinon D8 (**85**) ($R_t = 16.8$ min) blieb weiterhin relativ hoch.

Diskussion der Vorversuche

Sowohl die Spaltungen mit Natriummethanolat als auch mit Ammoniak lieferten das Aminocoumarin mit der amidisch gebundenen Decatetraendisäure. Ein quantitativer Umsatz von **(85)** konnte im Rahmen der Vorversuche nicht erreicht werden. Aufgrund der relativ hohen Reaktivität des Methanolats zeigt sich eine hohe Tendenz zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Insbesondere die Spaltung der Amidbindung scheint unter diesen Bedingungen in höherem Maße statt zu finden. Aus diesen Gründen wurde eine Optimierung der Verseifung mit Ammoniak durchgeführt. Eine Konzentrationserhöhung der eingesetzten Reagenzien erschien wenig sinnvoll, da bereits bei den beschriebenen Bedingungen unerwünschte Nebenprodukte auftraten. Vielmehr sollte durch die Optimierung der Reaktionszeit eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden. Die Detektion von geringen Spuren der freien Säure des gesuchten Spaltprodukts erlaubt die Annahme, dass dieses nicht das bevorzugt gebildete Reaktionsprodukt ist. Unter den vorliegenden basischen Bedingungen und der Präsenz des als Lösungsmittel verwendeten Methanols erscheint die Spaltung durch Angriff eines *in situ* erzeugten Methanolat-Ions zu erfolgen. Diese *in situ*-Bildung scheint, im Vergleich zur direkten Spaltung mit Methanolat, durch die geringere Konzentration des reaktiven Nukleophils eine erhöhte Selektivität mit sich zu bringen. Aufgrund der geringen Umsatzrate ergab die Auftrennung der Reaktionsgemische an Sephadex LH-20 (Eluent: MeOH) keine für die Spektroskopie ausreichenden Substanzmengen. Die Trennschärfe fiel trotz der großen Unterschiede in den Molmassen ungewöhnlich schlecht aus. Dieses Phänomen lässt sich auf die schlechte Löslichkeit des Edukts bzw. der Spaltprodukte in Methanol sowie auf deren strukturelle Verwandtschaft zurückführen. Aus diesem Grund wurde bei zukünftigen Versuchen ebenfalls eine Optimierung der Trennungen angestrebt.

7.4.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Simocyclinon D8 **(85)** und seinen Spaltprodukten wurde zunächst die Konzentration von 2.5 mg/mL auf 0.1 mg/mL deutlich herabgesetzt. Zum besseren Verständnis des Reaktionsverlaufs, erfolgte die Durchführung des Experiments unter ständiger Kontrolle der Reaktionslösung mittels analytischer HPLC. Hierzu wurden über einen Zeitraum von sechs Stunden zunächst alle 60 Minuten 250 µL des Reaktionsgemisches entnommen. Nachdem die Probe im Vakuum von Lösungsmittel und Base befreit wurde, nahm man den Rückstand in 250 µL Methanol auf. Eventuell auftretende Schwebstoffe wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Bis zur zwölften Stunde wurde diese Prozedur in Abständen von 90 Minuten wiederholt und eine letzte Probe nach 20 Stunden entnommen.

Für die Analytik kam ein von den LC-MS-Bedingungen abgeleitetes HPLC-System (HPLC B, Programm E, Säule B) zum Einsatz, um die Identifikation der Produkte anhand ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren zu erleichtern. Die Absolutwerte der Retentionszeiten stimmten mit den LC-MS-Chromatogrammen nicht überein. Aufgrund gerätespezifischer Parameter kam es zu einer insgesamt späteren Elution der Substanzen. Die aus den Chromatogrammen ermittelten UV-Spektren waren mit den LC-MS Experimenten vergleichbar, so dass dennoch eine eindeutige Zuordnung der Peaks vorgenommen werden konnte. Eine Bestimmung der Peakflächen in den erhaltenen Chromatogrammen ermöglichte eine quantitative Abschätzung der Produktmengen im Gemisch. Da sowohl Simocyclinon D8 (**85**) als auch das gesuchte Spaltprodukt Fragment A+B (**95**) ein charakteristisches UV-Adsorptionsmaximum bei $\lambda = 360$ nm aufweisen, erschien diese Wellenlänge für die Bestimmung der Peakflächen am besten geeignet zu sein. Die Auswertung der HPLC-Daten brachte zu Tage, dass die Konzentration des Edukts während der ersten sechs Stunden der Reaktion ungewöhnlicher Weise annähernd konstant blieb, während die Konzentration des Spaltproduktes von Beginn an steigt und einem maximalen Wert entgegenstrebt. Da es sich bei der alkalischen Verseifung bzw. Methanolyse um einen irreversiblen Prozess handelt, stellt dieses einen zunächst unerwarteten Befund dar. Eine Erklärung liefern die durch Zentrifugation abgetrennten Schwebstoffe. Sowohl die Löslichkeit von **85** als auch die der erhaltenen Spaltprodukte schienen unter leicht wässrigen Bedingungen überschritten worden zu sein, so dass die Eduktkonzentration der gesättigten Lösung nahezu konstant blieb, weil sich das verbrauchte Edukt nachlöst.

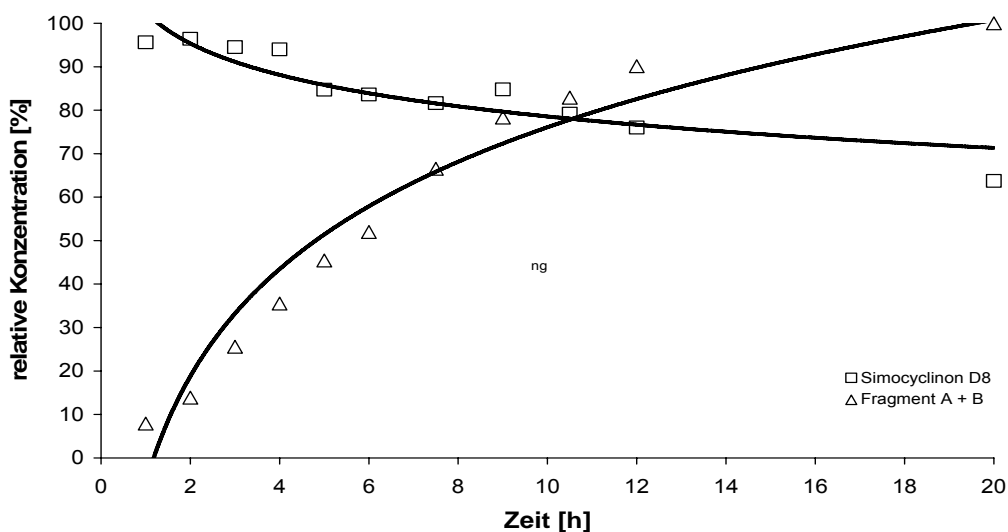


Abbildung 48: Reaktionsverlauf der Ammoniakspaltung anhand der aus den HPLC Chromatogrammen bestimmten Peakflächen. Die Konzentration des Edukts wurde auf die Peakfläche zu Beginn der Reaktion als 100 % referenziert, während für das Produkt der Wert nach 20 h als 100 % festgelegt wurde.

Eine Verbesserung der Spaltreaktion brachte die Verwendung einer rein methanolischen Ammoniak-Lösung. Die Reaktion wurden nun 10.0 mg (0.010 mmol) **85** durchgeführt, welches in 50 mL Methanol gelöst, und mit dem gleichen Volumen einer 7 M methanolischen Ammoniak-Lösung versetzt wurde. Die analog zum vorherigen Experiment durchgeführte HPLC-Analytik (HPLC B, Programm E, Säule B) zeigte, dass nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden ein fast vollständiger Umsatz von **85** ohne die Bildung signifikanter Nebenprodukte erreicht werden konnte (siehe Abbildung 49).

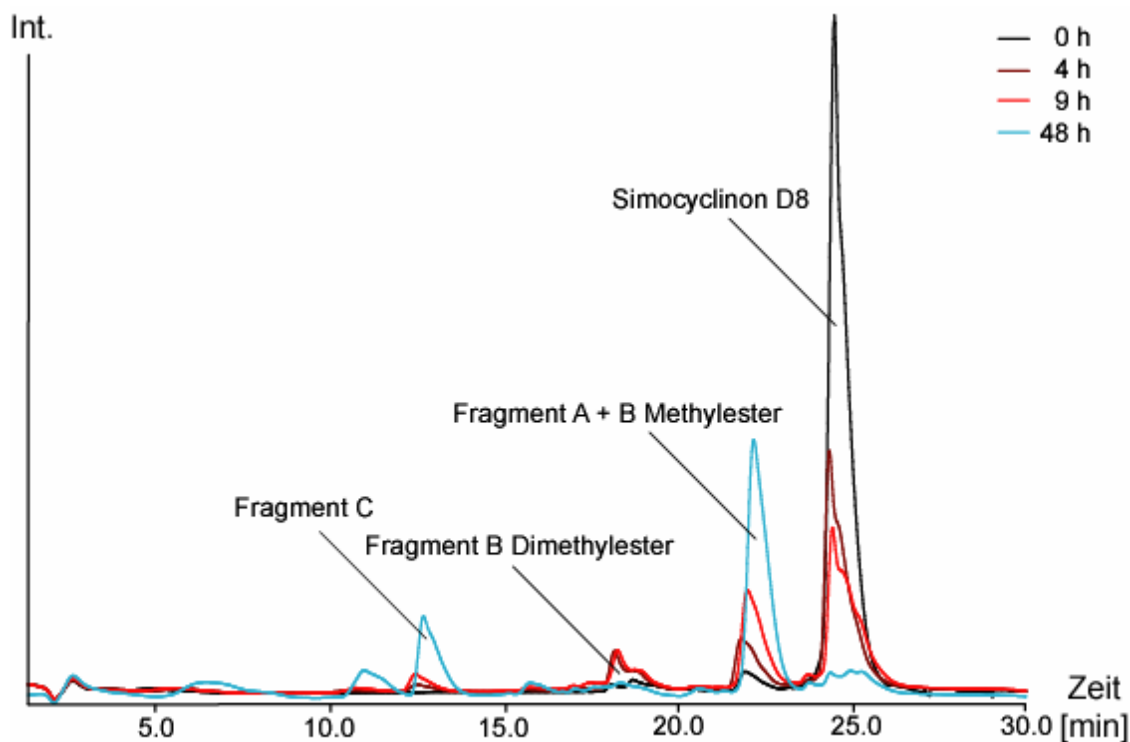


Abbildung 49: HPLC-Chromatogramme der optimierten NH₃-Spaltung von **85** bei $\lambda = 360$ nm.

Da unter annähernd wasserfreien Bedingungen gearbeitet wurde, konnte die Bildung der freien Säure von Fragment A+B erwartungsgemäß durch LC-MS des Rohproduktes nicht nachgewiesen werden. Es waren aber geeignete Reaktionsbedingungen für eine selektive und quantitative Spaltung gefunden, wodurch es galt als nächstes die Trennung der erhaltenen Substanzmischung zu optimieren. Um genügend Substanzmenge zu erhalten wurde das Experiment mit 50.0 mg (0.050 mmol) **85** wiederholt.

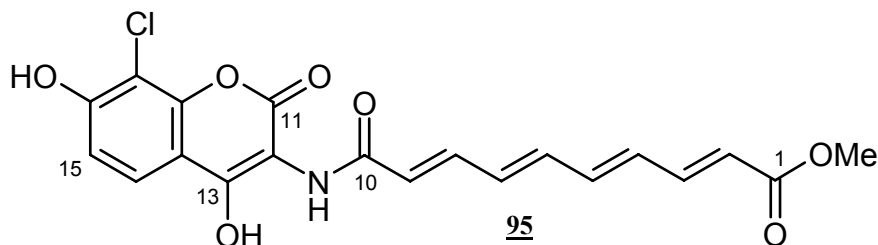
7.4.3 Optimierung der Trennung

Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass eine Trennung an Sephadex LH-20 (MeOH) aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindungen nicht realisierbar war. Im Dünnschichtchromatogramm konnte durch Verwendung verschiedener Laufmittelsysteme (Cyclohexan/Eisessig/Methanol, Chloroform/Methanol, Aceton/Wasser, Methanol/Wasser) und stationären Phasen (KG-60, RP-18) zum Teil sehr gute Trennleistung erzielt werden. Die schlechte Löslichkeit in den genutzten Laufmitteln verbot jedoch die präparative Nutzung von Kieselgel-Materialien. Vielmehr wurde die gute Trennleistung des für die LC-MS genutzten Systems für eine präparative HPLC-Trennung optimiert.

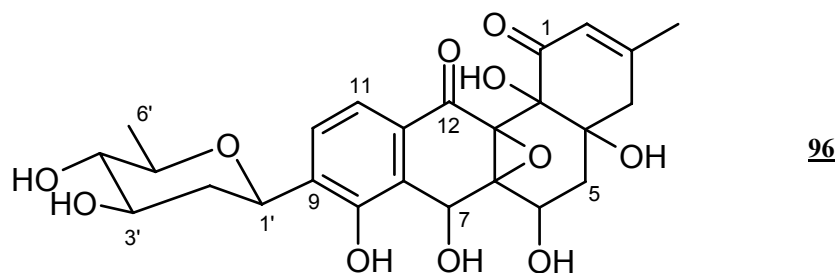
Das Reaktionsgemisch wurde mit 5.0 mL einer Methanol/Wasser-Mischung (3:2) versetzt, wobei sich nur ein Teil des Rohprodukts löste. Nach Zentrifugation konnte der Überstand für die HPLC verwendet werden. Durch Nutzung einer präparativen Säule gleichen RP-Füllmaterials (Supersphere®) und Variation des für die LC-MS genutzten Gradientensystems konnten bei kleiner Auftragsmenge eine gute Trennung des Reaktionsgemischs erreicht werden (HPLC E, Programm F, Säule E). Bei Erhöhung der Auftragsmenge kam es auch bei diesem System zu einer Verbreiterung der Signals, was auf die schlechte Wasserlöslichkeit und ein Ausfallen der Verbindungen auf der Säule zurückzuführen ist. Es gelang aus dem Überstand 2.3 mg von Fragment A+B Methylester (**95**) zu isolieren. Das glykosylierte Angucyclinon (Fragment C, **96**) konnte mit einer Ausbeute von 5.6 mg isoliert werden. Durch analytische HPLC-Untersuchung (HPLC B, Programm E, Säule B,) konnten auch im durch Zentrifugation abgetrennten Rückstand größere Mengen **95** nachgewiesen werden. Die tatsächliche Ausbeute an diesem Fragment liegt demnach deutlich höher als 2.3 mg. Es zeigte sich, dass die Löslichkeit von **95** gegenüber **85** in den verwendeten Lösungsmitteln noch einmal geringer war. Auch Versuche in unpolaren Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform oder Cyclohexan erbrachten keine Verbesserung, wodurch die Verwendung von Normalphasen-Materialien für die präparative HPLC ebenfalls ausschied. Durch Aufnahme des verbleibenden Rohprodukts in 25.0 mL Dichlormethan und Zentrifugation gelang es aus dem Überstand weitere 4.5 mg **95** zu gewinnen, dessen Reinheit mit Hilfe der analytischen HPLC (HPLC B, Programm E, Säule B) auf ca. 85 % abgeschätzt werden kann. Wiederholung dieses Prozesses ergab erneut 3.9 mg **95** einer Reinheit von ca. 70 %. Bei vollständigen Umsatz der eingesetzten 60.0 mg (0.060 mmol) **85** wären ca. 25.0 mg des Fragments A+B Methylester (**95**) zu erwarten. Somit ergibt sich eine Gesamtausbeute von mindestens 40 Prozent.

7.4.4 Charakterisierung der Spaltprodukte

Fragment A+B Methylester (95)



Das Hauptprodukt der Methanolyse (95) wurde bei der präparativen HPLC bei einer Retentionszeit von 22.5 min mit UV-Maxima bei 213 und 357 nm erhalten. Diese Daten stimmten mit den entsprechenden LC-MS-Daten annähernd überein. Das ESI-Massenspektrum der isolierten Verbindung bestätigte durch das im negativen Modus detektierte Ion bei $m/z = 416 [M-H]^+$ und das für Chlorverbindungen typische Isotopenmuster die erwartete Molmasse von 417 g/mol. Um die vorhergesagte Konstitution der Verbindung zu ermitteln, wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Das ^1H -NMR-Spektrum in $\text{DMSO-}d_6$ zeigte insgesamt vierzehn Signale. Ein Vergleich mit den NMR-Daten von 85 ermöglichte eine Zuordnung. Die drei breiten Singulets einfacher Intensität bei $\delta_{\text{H}} = 11.99$, 9.94 und 9.22 repräsentieren die Amino- bzw. Hydroxylgruppen des Aminocoumarins. Die Protonen des Coumaringerüsts wurden in Form von Dubletts ($J = 8.0$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 7.15$ und 7.17 detektiert. Den terminalen Protonen des Tetraensystems entsprach das Dubletts ($J = 15.0$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 6.52$ und 6.05. Die sechs Dubletts von Dublett bzw. Triplets ($\delta_{\text{H}} = 7.35$, 7.22, 6.89, 6.80, 6.64 und 6.62) mit Kopplungskonstanten von 15.0 und 11.0 Hz, bildeten die verbleibenden Doppelbindungsprotonen ab. Die Methylgruppe des Esters gibt sich durch ein Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 3.65$ zu erkennen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren insgesamt 19 Signale im Bereich zwischen $\delta_{\text{C}} = 167$ bis 105 zu erkennen. Die Carbonylgruppen erschienen bei $\delta_{\text{C}} = 167.0$ (C-10), 165.4 (s, C-1) und 158.7 (s, C-11), die Sauerstoff-substituierten sp^2 -Kohlenstoffatome wiesen chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 160.1$ (C-13), 150.4 (C-16) und 144.8 (C-17a) auf. Bei $\delta_{\text{C}} = 51.9$ wurde die Methylgruppe des Esters dargestellt. Die Gesamtheit der NMR-Daten zeigte nur geringer Abweichungen von den für 85 angegebenen Werten und bestätigen somit die Richtigkeit der angenommenen Struktur.

Fragment C

Bei der präparativen HPLC-Aufreinigung (HPLC E, Programm F, Säule E) wurde das C-glykosylierte Angucyclinon (**96**) mit einer Retentionszeit von 12.8 min eluiert. Durch ESI-Massenspektroskopie wurde für das Isolat eine Molmasse von 504 g/mol bestimmt. Im ^1H -NMR-Spektrum (DMSO-d_6) konnten alle Protonen des Angucyclinons und der *D*-Olivose erkannt werden. Während die chemischen Verschiebungen der Protonen des Angucyclinongerüsts im Vergleich zu **85** kaum Veränderungen aufweisen, erfuhren die Protonen der Didesoxyhexose eine Verschiebung auf $\delta_{\text{H}} = 4.82$ ($1'\text{-H}$), 1.28 ($2'\text{-H}_{\text{ax}}$), 2.17 ($2'\text{-H}_{\text{eq}}$), 3.50 ($3'\text{-H}_{\text{ax}}$), 2.86 ($4'\text{-H}_{\text{ax}}$), 3.38 ($5'\text{-H}_{\text{ax}}$) und 1.23 ($6'\text{-H}_3$). Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen stimmten mit denen von Aquyamycin¹⁹⁴, welches die *D*-Olivose in gleicher Position enthält, gut überein. Auch die ^{13}C -Daten stehen im Einklang mit der angenommenen Struktur.

7.4.5 Zur biologischen Aktivität der Spaltprodukte

Der Methylester von Fragment A+B (**95**) wurde im Arbeitskreis von Prof. A. MAXWELL (Department of Biological Chemistry, Norwich UK) auf seine inhibitorische Wirkung gegenüber der Gyrase getestet. Erste Testergebnisse deuten auf eine gegenüber Simocyclinon D8 (**85**) deutlich abgeschwächte Wirkung hin. Die IC_{50} -Werte der Gyrasehemmer **85**, Simocyclinon D₄, Novobiocin (**87**) und Ciprofloxacin (**89**) liegen im 100 μM -Bereich (vergleiche Tabelle AKT1), während **95** erst bei Konzentrationen von ca. 0.1 mM eine signifikante Wirkung erzeugt. Die Aktivität entspricht etwa der von Simocyclinon C2, welches nur aus dem Angucyclinon, der *D*-Olivose und der Decatetraendisäure aufgebaut ist.

Die schwächere Wirkung des Spaltprodukts **95** wird auch im Plattendiffusionstest erkenntlich. Keiner der verwendeten Testkeime zeigte eine Wachstumshemmung bei Exposition mit **95**, gleiches gilt für das Spaltprodukt **96**. Für die Angucyclinone konnte gezeigt werden, dass die in 3'-Position acetylierte Hexose eine essentielle Funktion für die Wechselwirkung mit der B-

Untereinheit der Gyrase besitzt (siehe Seite 96). Die fehlende Aktivität des erzeugten Spaltprodukts **96** bestätigt diesen Sachverhalt.

Tabelle 10: IC₅₀-Werte und Wirkorte von Gyrase-Hemmstoffen.

Wirkstoff	IC ₅₀ [nM]	Wirkort
Simocyclinon D8 (85)	~ 100	Untereinheit A
Simocyclinon D4	~ 450	Untereinheit A
Simocyclinon C2	~ 100000 = 0.1 mM	unbestimmt
Fragment A+B (95)	~ 100000	unbestimmt
Novobiocin (87)	~ 250	Untereinheit B
Cycprofloxacin (89)	~ 700	Untereinheit B

7.5 Diskussion der Testergebnisse

Welche Untereinheit der Gyrase durch **95** gehemmt wird, ist bis dato noch nicht bekannt. Die noch ausstehenden Testergebnisse werden zeigen, ob die selektive Blockade der A-Untereinheit erhalten geblieben ist, oder ob es aufgrund der Aminocoumarin-Struktur zu einer Hemmung der ATPase in der B-Untereinheit kommt. Es muss angenommen werden, dass für die hohe und selektive Gyrase-Aktivität der Simocyclinone der D-Reihe ein Zusammenspiel mehrerer Strukturbestandteile nötig ist. Die Simocyclinone verhindern eine Bindung der DNA an die Gyrase durch Abschirmung des N-terminalen Endes der A-Untereinheit. Eine Beteiligung der Zuckereinheit könnte für diesen Mechanismus ebenfalls von Bedeutung sein, da durch diese eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Desoxyribosen des Erbgutträgers entsteht.

Die Erzeugung von Simocyclinon-Derivaten ohne die Angucyclinon-Einheit erscheint durch Spaltreaktionen nicht möglich, da die C-glykosidische Bindung im Vergleich zu den amidischen und acylischen Bindung eine viel größere Stabilität aufweist. Vielmehr könnten solche Derivate durch eine synthetische Kopplung der D-Olivoose an das im Rahmen dieser Arbeit erzeugten **95**, vielmehr dessen freier Carbonsäure zugänglich werden. Allerdings müsste hier zunächst eine Verseifung des Methylesters erfolgen oder die freie Säure durch weitere Variation der Reaktionsbedingungen direkt zugänglich gemacht werden. Die regioselektive Kopplung der 3'-OH-Gruppe der D-Olivoose mit der Decatetraendisäure-Einheit

ist nur durch die Verwendung einer selektiven Schutzgruppe der 4'-OH-Gruppe möglich. Um **95** als Ausgangssubstanz für die Synthese der Derivate nutzen zu können, müsste die Trennung des Reaktionsgemisches der **85**-Spaltung weiter optimiert werden. Die hier vorgestellte Aufreinigung ist für die Gewinnung größerer Substanzmengen nicht geeignet. Die Löslichkeit der Verbindung in den für die Chromatographie verwendeten Laufmitteln ist ungenügend. Dieses könnte durch Verwendung eines leicht alkalischen Puffersystems möglich sein, da **95** nach Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppen eine wesentlich bessere Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder Methanol zeigen sollte. Auch eine Ausnutzung des Biosynthesepotentials von *S. antibioticus* Tü 6040 durch vorläuferdirigierte Biosynthese erscheint möglich. Durch die Fütterung von Decatetraendisäure, die bereits mit der 3'-Hydroxylgruppe der *D*-Olivose verestert ist, könnte eine biosynthetische Kopplung mit dem Aminocoumarin gelingen. Um eine gute Resorption der gefütterten Verbindung zu gewährleisten, sollte diese an der noch freien Carbonsäure zum SNAC-Ester funktionalisiert werden. Um die Isolierung des so erzeugten Derivates zu erleichtern und um die Umsetzung des gefütterten Vorläufers zu erhöhen, könnte *S. antibioticus* Tü 6040 zudem gentechnisch verändert werden. Insbesondere die Erzeugung einer Knock-Out-Mutante, bei der das für das Angucyclinon verantwortliche PKS-II Gen inaktiviert und somit die reguläre, modulare Biosynthese der Simocyclinone gehemmt ist, wäre vielversprechend. Der einzigartige Wirkmechanismus der Simocyclinone rechtfertigt den hierfür nötigen Aufwand. Nur durch ein vollständiges Verständnis der Wechselwirkung zwischen der Gyrase und Gyrase-Inhibitoren wird es gelingen, für dieses Wirkprinzip kommerziell nutzbare Substanzen zu entwickeln.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

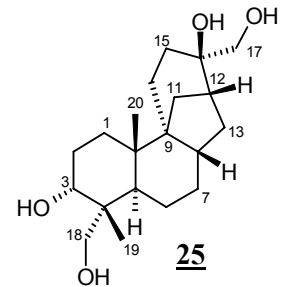
8.1 Naturstoffe aus endophytischen Pilzen

Endophyten als Produzenten von Sekundärstoffen

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Endophytische Pilze aus Algen und Pflanzen verschiedener Meeresbiotope“ wurden vier in Braunschweig und zwei in Göttingen isolierte Pilzstämme in größerem Maßstab kultiviert, deren Sekundärstoffe isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Die Wahl der Pilzstämme und der verwendeten Kultivierungsbedingungen basierte hierbei auf den Ergebnissen eines im Vorfeld dieser Arbeit stattgefundenen chemischen und biologischen Screenings. Es hat sich gezeigt, dass es besonders durch die Ergebnisse der von der BASF durchgeführten Mikrotest möglich war eine zielorientierte Isolierung der biologisch aktiven Sekundärstoffe durchzuführen. Es konnten 13 Naturstoffe isoliert werden, von denen fünf eine in Hinsicht auf den Pflanzenschutz relevante biologische Aktivität aufwiesen.

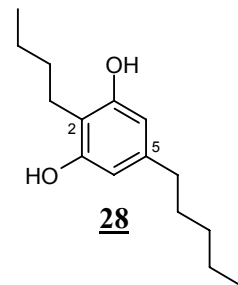
Aphidicolin aus Stamm BS 6612

Die im biologischen Screening aufgefallene insektizide Wirkung gegen *Anthonomous grandis*, *Certitis capitata* und *Heliothis virescens* ist auf das Terpenoid Aphidicolin (**25**) zurückzuführen. Bei dieser bereits aus anderen Pilzen isolierten Verbindung handelt es sich um einen DNA-Topoisomerase-Inhibitor, dessen Biosynthese und biologische Aktivität bereits hinreichend seit 1982 in der Literatur beschrieben ist.



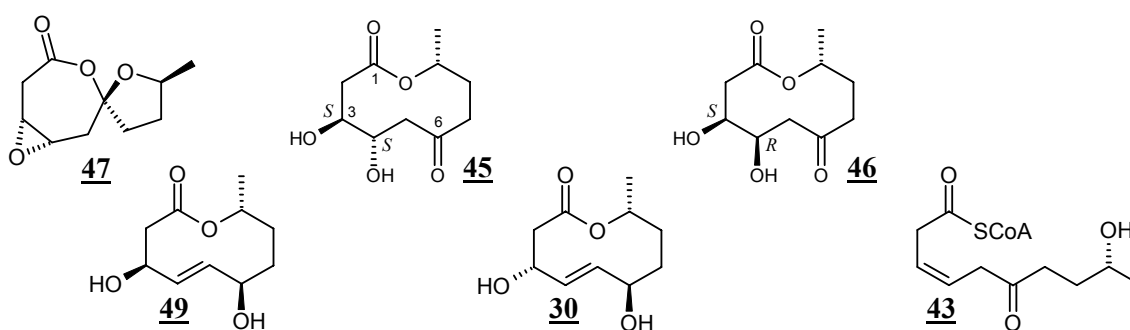
Stemphol aus Pleospora sp. Stamm BS 6631

Die Extrakte der Festphasenkulturen zeigten im Rahmen des biologischen Screenings eine insektizide Wirkung gegen alle verwendeten Testorganismen. Diese Aktivität ist auf das isolierbare Stemphol (**28**) zurückzuführen. In der Literatur wird für dieses pilzliche Polyketid eine antibakterielle sowie fungizide aber keine insektizide Wirkung beschrieben. Aufgrund zu geringer Substanzmengen konnte nur die antibakterielle Wirkung dieser Substanz durch Plattendiffusionstest bestätigt werden.

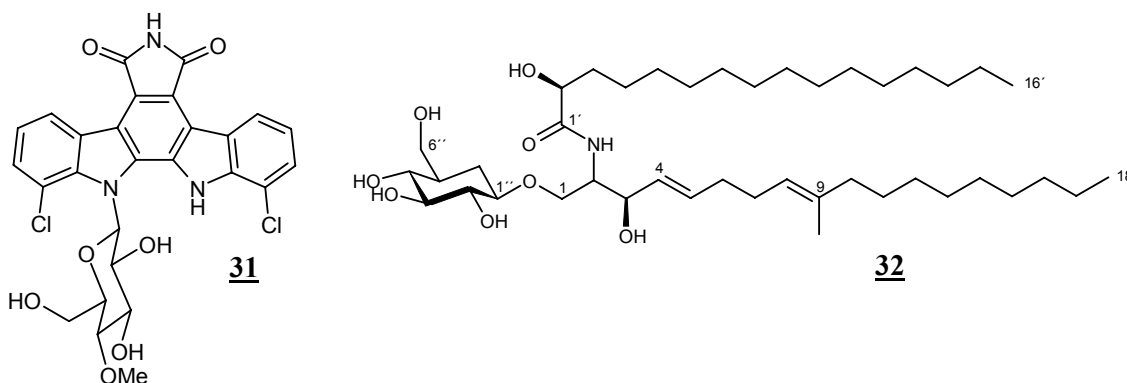


Metabolite aus Beauveria sp. Stamm BS 6750

Neben dem schon beschriebenen Beauveriaspirolid (**47**) konnten nach Variation der Kultivierungsbedingungen (OSMAC) weitere Pentaketide isoliert werden. Bei den nur durch Kultivierung in P-Kolben gebildeten Naturstoffen handelt es sich um Cephalosporolid C (**45**), Cephalosporolid G (**46**), Decarestrictine C₃ (**49**) und dessen bisher unbekanntes Epimer Decarestrictin C₄ (**30**). Durch die Derivatisierung von **46** mit chiralen Mandelsäuren gelang es, dessen 3*S*,4*R*,9*R*-Konfiguration erstmalig zu belegen. Ausgehend von Konfigurationen der Verbindungen, war es möglich einen Biosyntheseweg vorzuschlagen, der über einen gemeinsamen Vorläufer (**43**) zu den fünf Pentaketiden führt. Für keine der Substanzen konnte bis dato eine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

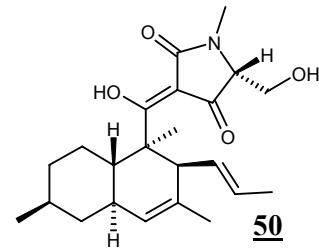


Aus den P-Kolben-Kultivierungen unter Verwendung des Nährmediums SGG konnte neben dem bereits aus Stamm BS 6612 isolierten Aphidicolin (**25**) erstmalig für Pilze das Indolcarbazol Rebeccamycin (**31**) isoliert werden. Eine Bestätigung der Produktion durch eine erneute Kultivierung dieses Topoisomerase-I-Inhibitors steht noch aus. Des Weiteren gelang mit Cerebrosid B (**32**) die Isolierung eines am Primärstoffwechsel beteiligten Sphingolipids, welches als Membranbestandteil über keine für den Pflanzenschutz relevante Aktivität verfügt.



Setin aus Phoma sp. Stamm BS 6771

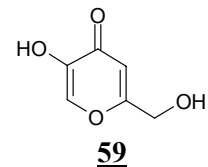
Das biologische Screening der Extrakte deutete auf eine Verbindung mit sehr breiter biologischer Aktivität hin. Es wurde eine starke Wachstumshemmung von pathogenen Pilzen sowie eine herbizide Wirkung beobachtet. Durch die Isolierung eines Equisetin-Analogons, der Acyltetramsäure CJ-21,058 (**50**), konnte



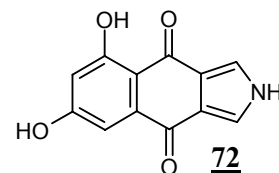
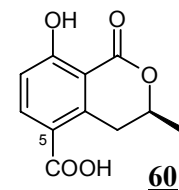
das aktive Prinzip dieser Extrakte identifiziert werden. Wegen der Tautomerie der Tetramsäure-Einheit war es bisher nicht möglich die relative Konfiguration des Decalinsystems durch NMR-Spektroskopie aufzuklären. Durch Tieftemperatur-NMR-Spektroskopie ist es gelungen einen Spektrensatz zu erhalten, der in Kombination mit CD-Spektren eine Bestimmung der absoluten Konfiguration ermöglichte. Die mit der Reinsubstanz durchgeführten Tests bestätigten das enorme Wirkpotential dieser Verbindung.

Koji-Säure aus Chaetomium sp. Stamm Gö 212

Bei dem γ -Pyrone Koji-Säure (**59**) handelt es sich um einen vor allen aus der Gattung *Aspergillus* bekannten Naturstoff, für den in der Literatur eine moderate fungizide, antibakterielle und insektizide Aktivität angegeben ist.

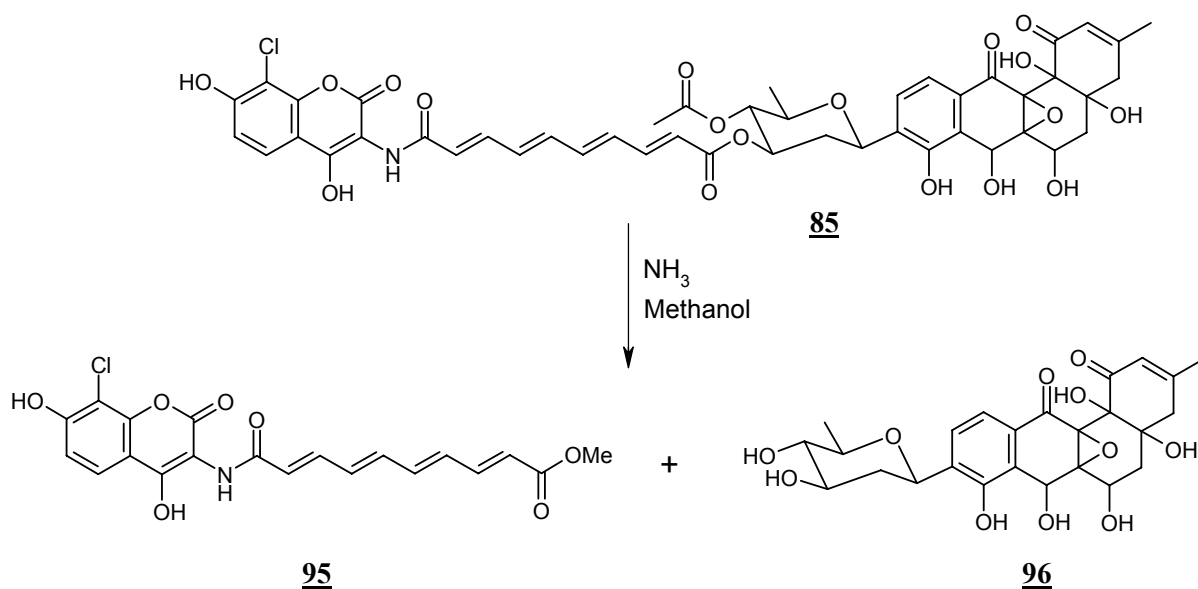
*Aromatische Polyketide aus Nodulisporium sp. Stamm Gö 223*

Das chemische Screening zeigte die Produktion von zahlreichen interessanten Sekundärstoffen, von denen zwei isoliert werden konnten. Der Hauptmetabolit ist 5-Carboxymellein (**60**), eine in Ascomyceten häufig zu findende Verbindung ohne eine für den Pflanzenschutz relevante Aktivität. Das Hexaketid 7-*O*-Desmethyl-azamonosporascone (**72**) wurde erstmals isoliert. Durch eine umfangreiche LC-MS-Analytik konnte die Anwesenheit von fünf ebenfalls neuen 7-*O*-Desmethyl-Sauerstoff-Analoga dieser Verbindung nachgewiesen werden. Aus den Daten wurde ein Vorschlag für die Biosynthese dieser Hexaketide entwickelt.



8.2 Abbaureaktionen an Simocyclinon D8 (**85**)

Um eine selektive Spaltung der Esterbindung zwischen der Decatetraendisäure und der *D*-Olivose von Simocyclinon D8 (**85**) zu erreichen, wurden Testreaktionen mit den Basen Natriumhydroxyd, Natriumhydrogencarbonat, Natriummethanolat und Ammoniak durchgeführt. Die LC-MS-Analytik der Rohprodukte zeigte, dass durch Verwendung von 7 M Ammoniaklösung die höchste Selektivität erreicht wird. Nach einer Optimierung der Reaktionsbedingung gelang eine annähernd vollständige Umsetzung von Simocyclinon D8 (**85**) zu den gewünschten Spaltprodukten **95** und **96** ohne die signifikante Bildung von Nebenprodukten. Trotz der schlechten Löslichkeit der Reaktionsprodukte in Wasser und organischen Lösungsmitteln konnten durch eine optimierte präparative HPLC-Trennung sowohl **95** als auch **96** in Reinform erhalten werden. Das erstmals erzeugte Aminocoumarin **95** befindet sich in Kooperation mit dem Arbeitskreis von H. P. FIEDLER (Institut für Mikrobiologie, Tübingen), in einem umfangreichen Testprogramm. Es soll überprüft werden, ob weiterhin eine Hemmung der Gyrase durch die Blockade der A-Unterheit dieses Enzyms erreicht werden kann. Erste Testergebnisse deuten an, dass die inhibitorische Wirkung von **95** um mehrere Größenordnungen geringer als bei der Ausgangsverbindung ist.



B. Experimenteller Teil

9. Instrumentelle Analytik

Massenspektren: ESI-MS: Finnigan LC-Q; HR-ESI-MS: Bruker APEX IV, Feldstärke 7 T; EI-MS: Finnigan MAT 95 A, 70 eV, Perfluorkerosin wurde als Vergleichssubstanz bei Hochauflösungen verwendet; DCI-MS: Finnigan MAT 95 A, 200 eV, Reaktandgas NH₃.

Infrarotspektren: Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR Spektrometer der Firma Perkin-Elmer Modell 1600 gemessen. Die Substanzen wurden in Form von KBr-Presslingen vermessen. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

UV-VIS-Spektren: Für sämtliche UV-Spektren wurde ein Varian Cary 3E UV-Spektrometer verwendet. Die Messung erfolgte jeweils anhand methanolischer Lösungen der Substanzen. Die UV-Spektren im sauren und basischen Milieu wurden nach Zugabe von einem Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH zu 2 mL der methanolischen Lösung vermessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, Angabe der molaren Extinktionskoeffizienten ϵ erfolgt in [$1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] und wurde unter Berücksichtigung gerätespezifischer Konstanten mit nachfolgender Gleichung berechnet:

$$\epsilon[1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}] = \frac{E * \text{Molmasse} * 10}{\text{Einwaage [mg]}}$$

CD-Spektren: Die Messung der Circulardichroismus (CD)-Spektren erfolgte mit einem Jasco J 500 Spektrometer. Die Berechnung der Spektren erfolgte mittels eines BMC IF 800 PC mit einem Jasco IF 500 A/D-Wandler. Die molaren Elliptizitäten θ sind in [$10^{-1} \text{ grad cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] angegeben.

¹H-NMR-Spektren:

Varian Inova 600 (600 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz), Varian Mercury 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz). Alle chemischen Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben; Kopplungskonstanten (J) in [Hz]. Soweit nicht anders angegeben handelt es sich bei den Kopplungen um skalare ³J(H,H)-Kopplungen. Alle ¹H-NMR-Spektren wurden

näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br. = breit.

¹³C-NMR-Spektren:

Varian Inova 600 (150.8 MHz), Varian Inova 500 (125.7 MHz), Varian Mercury 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Bruker AMX 300 (75.5 MHz). Alle chemischen Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben. Multiplizitäten wurden aus $^1J_{\text{CH}}$ -Korrelationsexperimenten oder APT-Spektren entnommen. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, APT = Attached Proton Test: CH (d) und CH₃ (q) stehen nach oben, C (s) und CH₂ (t) stehen nach unten.

2D-NMR-Spektren:

Abkürzungen: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Correlated spectroscopy), **HSQC** (Heteronuclear Singular Quantum Coherence), **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

10. Chromatographie

Lösungsmittel: Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel (Merck) und bidestilliertes Wasser verwendet. Vor Benutzung entgaste man die Lösungsmittel für die HPLC durch jeweils 15 Minuten langes Behandeln im Ultraschallbad und anschließendes Durchleiten von Helium.

Dünnschichtchromatographie (DC): Merck HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; MerckDC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; Merck DC-AlufolienRP-18 F_{254s}, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_F-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Sprühreagenzien:

Nach Merck, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie¹⁹⁵. Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100°C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd gab man in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

Ehrlichs Reagenz (Nr. 91): 1.0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung von 25 ml Salzsäure (36 %) in 75 ml Methanol.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120-122): 1.0 g Eisen-(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

Säulenchromatographie:

Für Schwerkraftchromatographie wurde ICN Kieselgel 60, 0.032-0.064 nm, verwendet; für Flash-Chromatographie (W. C. STILL¹⁹⁶) kam Macherey-Nagel Kieselgel 60, 0.040-0.064 nm, zum Einsatz. Pharmacia Sephadex LH-20 wurde zur Gelchromatographie verwendet.

Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC):

Pumpe: Knauer, HPLC Pumpe 64; Säule: Merck, Lobar-Fertigsäule, LiChroprep® RP-8, Größe C (440 - 37), 40 - 63 µm.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Anlagen:

Analytische HPLC mit DAD-Kopplung:

HPLC A: Pumpe: Kontron Modell P 322 (0.05-10 mL/min), Autosampler: Kontron Sa 360, Detektor: Kontron DAD 440, Datensystem: Kontron Kromasystem 2000® Version 1.60.

HPLC B: Pumpe: Jasco PU-2080plus; Mischkammer: Jasco LG-2080-02; Entgaser: Jasco DG-2080-53; PDA-Detektor: Jasco MD-210plus; Autosampler: Jasco AS-2055plus mit Rheodyne 100 µL Aufgabeschleife; Säulenofen: Jasco CO-2065; Fraktionensammler: Jasco SF-3120; Datensystem: Jasco Borwin® mit Jasco Borwin® PDA Version 1.50 (Chromatographie), Jasco Borwin® HSS-2000 Version 3.5.2. (Steuerung).

HPLC C: Pumpe: Jasco Pu-1580; Mischeinheit: Jasco LG-1580-02; Entgaser: Jasco DG-1580-53; Autosampler: Jasco AS 1555; Detektoren: Jasco UV-1570 M, CD-995; Datensystem: Jasco Borwin[®] Ver. 1.50 (Chromatographie), HSS-2000 Version 3.5.2. (Steuerung).

Analytische HPLC mit MS-Kopplung (LC-MS):

HPLC D: Pumpe und Mischkammer: Flux Instruments Rheos 4000; Entgaser: Flux Instruments ERC-3415 α ; Autosampler: Jasco 851-AS mit variabler Aufgabeschleife 0-100 μ L; PDA-Detektor: Finnigan Surveyor; Massendetektor: Finnigan LC-Q; Datensysteme: HPLC: Flux Instruments Janeiro (Steuerung); PDA- und MS-Detektor: Finnigan Xcalibur[®] Version 1.3 (Chromatographie- und Steuerung).

Präparative HPLC

HPLC E: Pumpe: Jasco PU-1587 (0-50 mL/min), Mischkammer: Jasco 1000 μ L; UV-Detektor: Jasco UV 1575; manuelles Probenaufgäbeventil: Rheodyne, präparative 2.0 mL Aufgabeschleife; Datensystem: Jasco Borwin[®] Ver. 1.50 (Chromatographie), Jasco Borwin[®] HSS-200 Version 3.5.2 (Steuerung),

HPLC-Säulen:

Analytisch:

Säule A: Jasco Nucleosil 100 C18, 5 μ m, 250 x 3 mm, Flussrate : 0.5 mL/min.

Säule B: Grom Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 100 x 2 mm mit Vorsäule Grom Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 10 x 2 mm, Flussrate: 0.3 mL/min.

Säule C: Merk LiChrosorb [®] Si60 HPLC-Kartusche 250-4, 5 μ m, 250 x 3 mm, Flussrate : 0.8 mL/min.

Semipräparativ:

Säule D: Merk LiChrosorb [®] Si60 HPLC-Kartusche 250-4, 5 μ m, 250 x 8 mm, Flussrate : 1.5 mL/min.

Präparativ:

Säule E: Grom Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 100 x 20 mm, Flussrate: 16.0 mL/min.

Verwendete Eluenten für die HPLC:

Programm A (Standardprogramm für Analytik): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B), jeweils mit 0.1% TFA; Gradient: von 10% auf 100% B in 25 min, 8 min bei 100% B, von 100% auf 10% B in 2 min, 5 min bei 10% B.

Programm B (Standardprogramm für LC-MS): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 2 min, 5 min bei 20% B.

Programm C: (Analytik der Cephalosporolid-MTPA-Ester) Laufmittelsystem: Hexan (A) / Ethylacetat (B), isochratisch: 78% A, 22% B, Laufzeit: 40 min.

Programm D: (Trennung der Cephalosporolid-MTPA-Ester) Laufmittelsystem: Hexan (A) / Ethylacetat (B), isochratisch: 76% A, 24% B, Laufzeit: 40 min.

Programm E: (Analytik der Simocyclinon-Reaktionen) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 20% auf 100% B in 20 min, 15 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 5min, 5 min bei 20% B.

Programm F: (Trennung der Simocyclinon-Spaltprodukte) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 25% auf 100% B in 20 min, 15 min bei 100% B, von 100% auf 25% B in 2min, 5 min bei 25% B.

11. Mikrobiologische Methoden und Geräte

Nährmedienbestandteile:

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen: Malzextrakt, Fleischpepton von der Fa. Merck, D-Glucose und Stärke aus Kartoffeln von der Fa. Roth, D-Maltose von der Fa. Fluka, Agar von der Fa. Difco, Glycerin von der Fa. AppliChem, Hefeextrakt von der Fa. Oxoid, Cornsteep Powder von der Fa. Marcor, Sojamehl fettarm und Sojamehl vollfett von der Fa. Henselwerk GmbH, Sojapepton von der Fa. Sigma, Perlgrauen von der Fa. Brüggen, Vollkorn Dinkelflocken von der Fa. *Grünes Land*, Biomalt Gerstenmalzextrakt von der Fa. Villa Natura.

Verwendete Nährmedien:

Die Nährmedien wurden ausschließlich mit Leitungswasser angesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 20 g/L Agar zugesetzt. Nach Einstellen des pH-Werts mit 0.5 M HCl und 0.5 M NaOH wurde für 30 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

Zusammensetzung der Nährmedien:

1158: Malzextrakt 20g/L, D-Glucose 10 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NH₄HSO₄ 0.5 g/L, pH 6.0

E2: D-Glucose 20 g/L, Hafermehl 20 g/L, entfettetes Sojamehl 20g/L, keine pH-Einstellung

G20: Glycerin 20 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, keine pH-Einstellung

1549: D-Glucose 10 g/L, D-Maltose 10 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Fleischpepton 5 g/L, pH 5.4

SGG: D-Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke 10 g/L, Cornsteep Powder 2.5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, CaCO₃ 3 g/L, pH 7.0

1405: D-Glucose 30 g/L, NaNO₃ g/L, K₂HPO₄ 1g/L, MgSO₄ x 7 H₂O 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, pH 7

Biomalz: Biomalt Gerstenmalzextrakt 20 g/L, pH = 5.6

DiGe (Feststoffmedium): Perlgrauen 200g, Vollkorn-Dinkelflocken 200g, Sojapepton 2g, MnCl₂-Lösung 1 mL (c = 20 mg MnCl₂ x 4 H₂O/L), 250 mL Wasser, keine pH-Einstellung

Stammhaltung:

Für die Kulivierung der Pilze wurden Agarplatten des Nährmediums 1158 verwendet. Nach dem Beimpfen wurde für 7 bis 21 Tage bei 25 °C inkubiert. Bewachsene Agarplatten wurden mit Verschluffolie (Brand Parafilm[®] M) verschlossen und bei 4 °C für maximal 4 Monate gelagert.

Langzeiterhaltung in flüssigem Stickstoff:

Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Agarstückchen ausgestantzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der an beiden Enden zugeschmolzen wurde. Mehrere Halme in einem Cryoröhrchen wurden in einem Dewargefäß über flüssigem Stickstoff eingelagert.

Plattendiffusionstest:

Als Testkeime wurden im Plattendiffusionstest *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, und *Candida albicans* verwendet. Auf die mit den Testkeimen angeimpften Agarplatten legte man Filterplättchen (Durchmesser: 5 mm, Dicke 0.5 mm) auf, die mit 20 µL einer Lösungen der Substanzen in Methanol (c = 2 mg/mL) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Die Agarplatten wurden bei 37°C (Bakterien) und bei 25°C (Pilze) für 24 Stunden inkubiert.

Medium für *S. aureus*: Bacto Nutrient Broth 8 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 15 g/L.

Medium für *B. subtilis*, *E. coli*: D-(+)-Glucose 5 g/L, Na-citrat x 2 H₂O 0.5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 7 g/L, MgSO₄ x 7 H₂O 0.1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L, Agar 15 g/L.

Medium für *C. albicans*: Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, D-(+)-Glucose 4 g/L, Agar 15 g/L, pH = 5.5.

Zum Ansetzen der Nährböden wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet, Glucose wurde erst nach dem Autoklavieren hinzu gegeben

12 Kultivierung, Aufarbeitung und Isolierung der Sekundärstoffe

12.1 Sekundärstoffe aus Stamm BS 6612

Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung wurde in P-Kolben unter Verwendung des Mediums G20+ durchgeführt. Hierzu wurden fünf 5 L P-Kolben mit jeweils einem Liter des Nährmediums befüllt und mit einer Schaumstoffkappe verschlossen. Die P-Kolben wurden nach dem Autoklavieren mit jeweils einem fünftel einer ca. 2 Wochen alten Agarkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 28 d. Eine starke Luftmyzelbildung und ein pH-Wert von 5.4 wiesen auf eine ausreichende Kultivierungszeit hin.

Durch Zentrifugation wurden Myzel und Kulturfiltrat getrennt. Der Extrakt des Kulturfiltrats wurde erhalten indem dreimal mit jeweils 5 L Ethylacetat ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingengt und der Rückstand lyophilisiert wurde. Für die Extraktion des Myzels im Ultraschallbad wurden zweimal 1 L Aceton verwendet. Erneut wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und lyophilisiert.

Isolierung von Aphidicolin (25)

Durch Waschen des Kulturfiltrat-Extraktes wurden die unlöslichen Bestandteile entfernt. Hierfür gab man 2.0 mL Aceton zum Rohextrakt und extrahierte diesen für 5 min im Ultraschallbad. Der Überstand konnte nach Zentrifugation mittels einer Watte-gefüllten Pipette aufgenommen werden. Das Myzel-Extrakt wurde ebenfalls für die Chromatographie vorbereitet indem er in jeweils 100 mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 bzw 4:1 aufgenommen und filtriert wurde. Die Rückstände konnten nach DC-Kontrolle (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) verworfen werden. Die löslichen Bestandteile führten anhand folgenden Schemas zu 25:

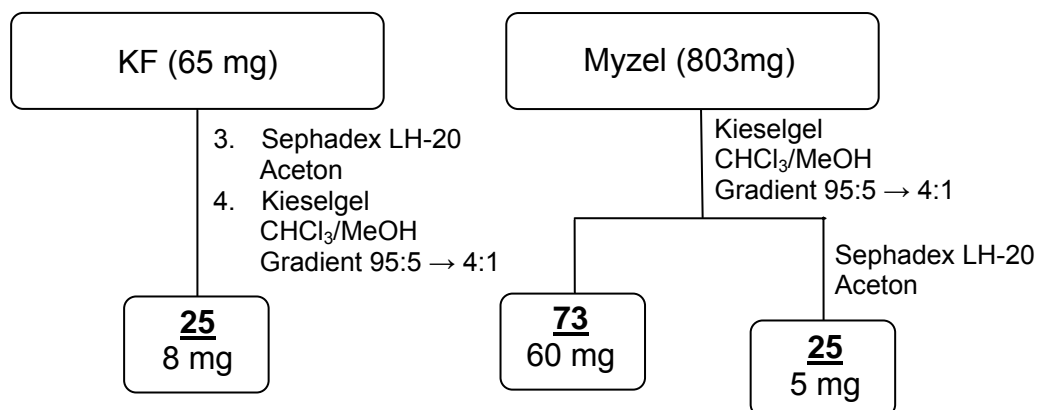


Abbildung 51: Isolierungsschema der Sekundärstoffe aus *n. b.* Stamm BS 6612.

12.2 Sekundärstoffe aus *Pleospora sp.* Stamm BS 6631

Es wurde eine Festphasenkultivierung auf Agarplatten durchgeführt. Dazu verteilte man ca. 12 L des agarhaltigen Biomalz-Nährmediums auf ca. 250 Agarplatten. Die Aufarbeitung erfolgte indem die Agarplatten lyophilisiert und anschließend dreimal mit 1 L Chloroform/Methanol 9:1 extrahiert wurden. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde mittels Schwerkraftchromatographie (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1) fraktioniert. Trennung der lipophilen Fraktion an Sephadex LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1) ergab 12.5 mg **28** und 53.4 mg **73**.

12.3 Sekundärstoffe aus *Beauveria sp.* Stamm BS 6750

Kultivierung und Aufarbeitung

Es erfolgte eine Kultivierung in den Medien Bio+ und SGG unter Verwendung von P-Kolben. Es wurden jeweils 5 L Nährmedium angesetzt und in Portionen von 1L auf 5L P-Kolben verteilt. Diese wurden anschließend mit einer Schaumstoffkappe verschlossen, autoklaviert und mit einem Fünftel einer zwei Wochen alten Agarkultur (Biomalz) beimpft. Die Fermentation geschah unter Lichtausschluss bei einer Temperatur von 30 °C und führte in beiden Fällen zu einem ca. 0.5 cm dicken, an der luftzugewandten Seite weißen, Luftmyzel. Der pH-Wert der stark gedunkelten Kulturbrühe betrug am Ende der 28-tägigen Kultivierungszeit 5.3(Bio+) bzw. 7.8 (SGG).

Die Aufarbeitung beider Ansätze erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Das Kulturfiltrat konnte vom sehr festen Myzel durch Dekantieren getrennt werden und wurde durch Zugabe von 2 M HCl auf pH = 4.5 eingestellt. Die Extraktion mit Ethylacetat erfolgte dreimal mit dem 1.5fachen des KF-Volumens. Der so erhaltene Extrakt wurde im Vakuum eingengt und anschließend lyophilisiert. Dreimaliger Aufschluss des Myzels mit 1.5 L Aceton im Ultraschallbad für 15 min lieferte nach dem Entfernen des Lösesmittels im Vakuum einen öligen Extrakt.

Isolierung der Sekundärstoffe

Medium Bio+:

Aus dem Kulturfiltrat wurden anhand der in Abbildung 52 dargestellten Reinigungsschritte die in Kapitel 3.3 angegebenen Reinsubstanzen isoliert. Die Chromatographie des Myzelextrakts erfolgte an Kieselgel unter Verwendung eines Eluentgradienten (Chloroform/Methanol 9:1 → 4:1) und führte zu 378 mg Ergosterol (**73**).

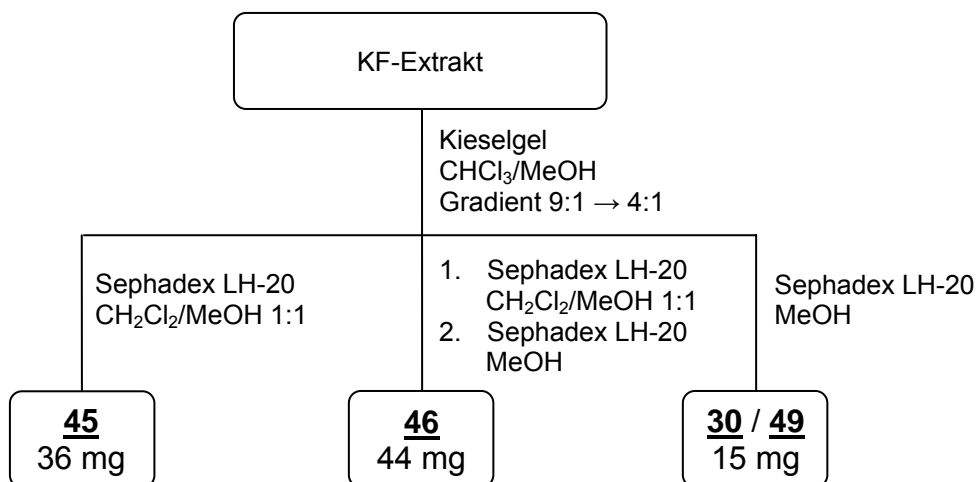


Abbildung 52: Isolierungsschema der Sekundärstoffe von *Beauveria sp.* Stamm BS 6750 aus der P-Kolben-Kultivierung im Nährmedium Bio+.

Medium SGG:

Anhand der in Abbildung 53 dargestellten Reinigungsschritte führten der Extrakt des Kulturfiltrats und des Myzels zu den in Kapitel 3.3 beschriebenen Reinsubstanzen.

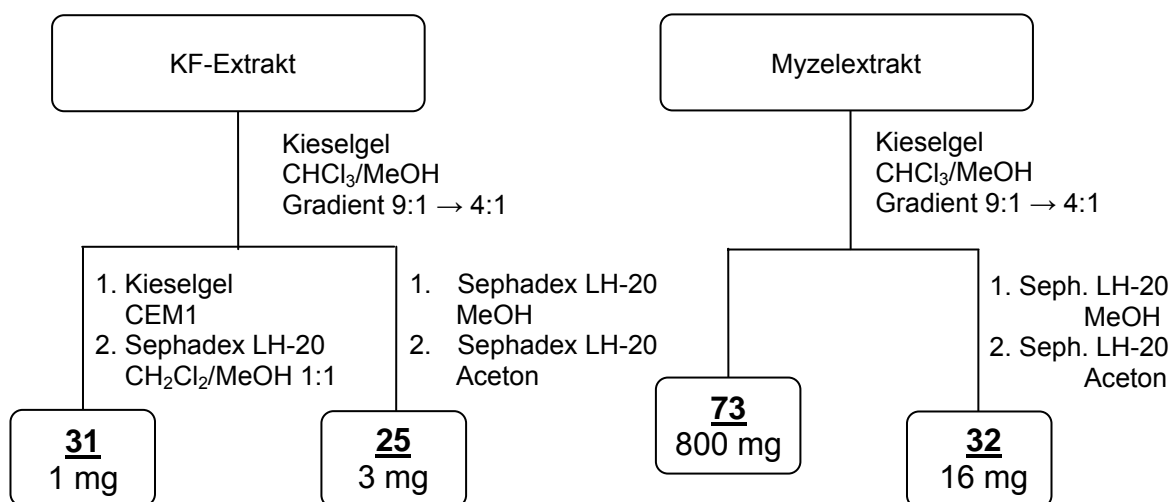


Abbildung 53: Isolierungsschema der Sekundärstoffe von *Beauveria sp.* Stamm BS 6750 aus der P-Kolben-Kultivierung im Nährmedium SGG.

12.4 Sekundärstoffe aus *Phoma sp.* Stamm BS 6771

Kultivierung und Aufarbeitung

Es wurden insgesamt 12 L Biomalz-Nährmedium aufgeteilt auf ca. 250 Agarplatten verwendet. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen bei Raumtemperatur.

Nachdem die Agarplatten lyophilisiert worden waren, erfolgte eine dreifache Extraktion mit je 1 L Ethylacetat/Methanol (9:1). Anschließend wurde der Extrakt im Vakuum eingengt.

Isolierung der Sekundärstoffe

Der Extrakt wurde der in Abbildung 54 dargestellten Chromatographie unterzogen.

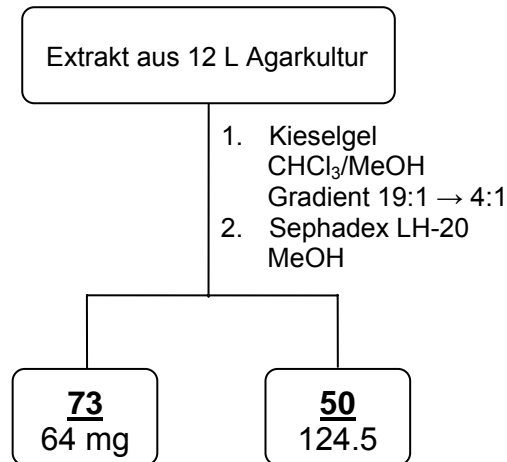


Abbildung 54: Isolierungsschema der Sekundärstoffe aus *Phoma sp.* Stamm BS 6771.

12.5 Sekundärstoffe aus *Chaetomium sp.* Stamm Gö 212

Die Kultivierung erfolgte im 4 L-Maßstab in P-Kolben unter Verwendung des Nährmediums G20. Hierzu wurde das Nährmedium auf vier 5 L P-Kolben verteilt, diese mit einer Stoffkappe verschlossen und anschließend autoklaviert. Die Inokulation der Kolben erfolgte jeweils mit einem Viertel einer gut bewachsenen und ca. 3 Wochen alten Agarplatte (Bio+) des Stamms. Die Fermentation erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen und wurde bei Raumtemperatur unter Tageslicht durchgeführt. Das schwarze Kulturfiltrats wurde vom weißen Myzel durch Zentrifugation getrennt. Der pH-Wert des Kulturfiltrats betrug 7.2 und machte somit vor der dreifachen Extraktion mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat das Ansäuern (2 M HCl) auf pH = 4.5 notwendig. Der erhaltene Extrakt wurde im Vakuum eingengt und anschließend lyophilisiert. Zur Extraktion des Myzels wurde dieses zweimal mit 1 L Aceton im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach dem Entfernen des Lösesmittels wurde ein öliger Myzelextrakt erhalten, welcher aufgrund des hohen Fettgehalts nicht lyophilisiert werden konnte.

Die Sekundärstoffe wurden aus den Extrakten erhalten indem diese jeweils an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1 → 4:1) chromatographiert wurden. Die mit 59 angereicherten Fraktionen wurden in Chloroform/Methanol 1:1 umkristallisiert. Aus dem Kulturfiltrat wurden 305 mg, aus dem Myzel 1192 mg 59 isoliert werden, was einer Ausbeute von 374 mg/L Kulturbrühe entspricht.

12.6 Sekundärstoffe aus *Nodulisporium sp.* Stamm Gö 223

Das Ansetzen der Kulturen erfolgte analog zu *Chaetomium sp.* Gö 212. Es wurde jeweils einmal mit den Medien E2 und 1158 im 5 L-Maßstab kultiviert. Die Kultivierungszeit wurde auf 21 Tage verkürzt, da *Nodulisporium sp.* Gö 223 ein schnelleres Wachstum zeigte. Alle anderen Fermentationsbedingungen wurden beibehalten. Die dunkelbraune Kulturbrühe war zum Zeitpunkt der Ernte mit lückenhaft mit einem weißen Luftmyzel bedeckt und hatte einen pH-Werte von 7.3 (E2) bzw. 7.4 (1158). Die Aufarbeitung erfolgte wie für *Chaetomium sp.* Gö 212 beschrieben. Um die stark lipophilen Substanzen aus den Extrakten zu entfernen wurden diese in 100 mL kaltem Pentan aufgenommen und filtriert. Für die weiteren Arbeiten wurden nach DC-Kontrolle nur die in Pentan unlöslichen Rückstände verwendet. Aufgrund der sehr ähnlichen Zusammensetzungen der Extrakte aus den beiden Fermentationsansätzen wurden diese zwar separat aber unter Verwendung der gleichen Chromatographietechniken aufgetrennt (vgl. Abbildung 55). Da die Auswaage der Rohextrakte sehr hoch war wurden jeweils nur ca. 2.5 g für die Chromatographie verwendet. Man erhielt die in Tabelle 11 angegebenen Mengen der Reinsubstanzen. Die nicht verwendeten Reste der Rohextrakte wurden vereinigt und führten nach Chromatographie an Kieselgel (CH₃Cl/MeOH 6:1) und Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (MeOH) zu 7.6 mg 72.

Tabelle 11: Aus *Nodulisporium sp.* Stamm Gö 223 isolierte Sekundärstoffe und auf den Gesamtansatz hochgerechnete Ausbeute.

		<u>72</u>	<u>60</u>	<u>75</u>	<u>74</u>	<u>76</u>
Medium E2	Kulturfiltrat (9.8 g)	1.1 mg	40.2 mg	4.9 mg	1.3 mg	10.9 mg
	Myzel (16.8 g)	0.7 mg	x	x	x	x
	Ausbeute ^a	1.8 mg/L	31.5 mg/L	3.9 mg/mL	1.0 mg/mL	8.5 mg/L
Medium 1158	Kulturfiltrat (5.7) ^b	0.9 mg	19.8 mg	4.2 mg	3.5 mg	x
	Myzel (12.6) ^b	0.5 mg	x	x	x	x
	Ausbeute ^a	0.9 mg/L	18.3 g/L	1.9 mg/mL	1.6 mg/L	x

x = nicht bestimmt; ^a Summe aus Kulturfiltrat- und Myzelextrakt; ^b nach Entfettung

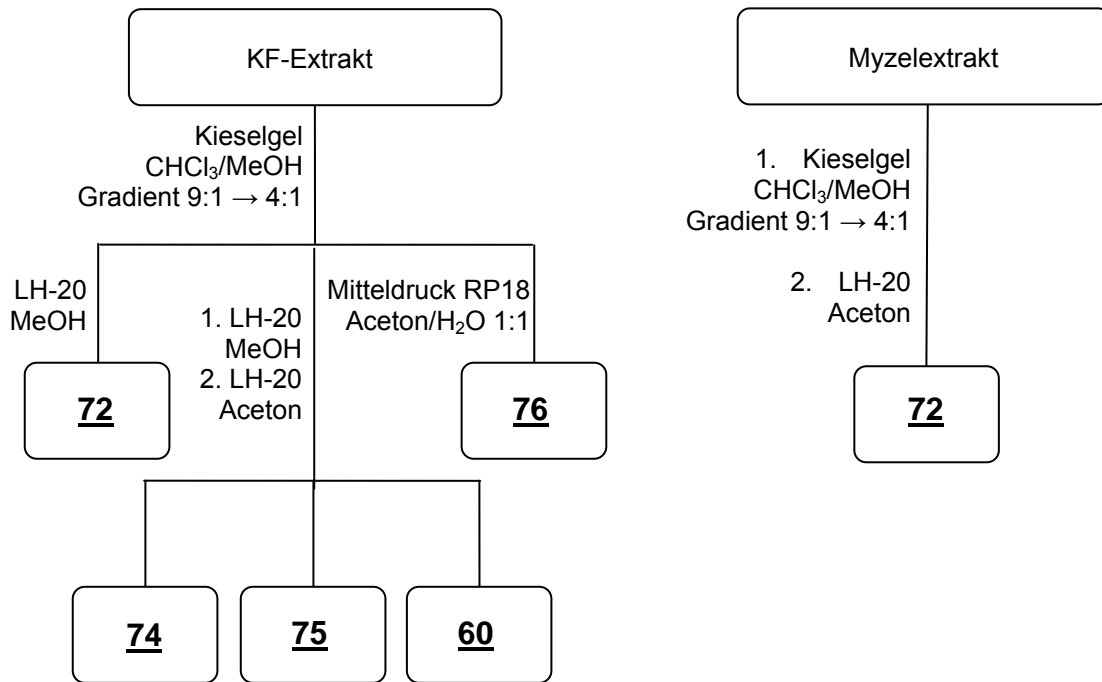


Abbildung 55: Isolierungsschema P-Kolben von *Nodulisporium* sp. Stamm Gö 223 (LH-20 = Sephadex LH-20).

13. Derivatisierungen

13.1 Veresterung von Cephalosporolid G (46) mit MTPA

Im Rahmen der Strukturaufklärung von Cephalosporolid G (46) erfolgte eine Veresterung mit (*R*)- α -Methoxy- α -trifluormethyl- α -phenylessigsäure (MTPA) bzw. (*S*)-MTPA. Es fand jeweils folgende Arbeitsvorschrift Verwendung:

6.7 mg (0.030 mmol) Cephalosporolid G (46) wurden in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Bei RT gab man jeweils 14.8 mg 1-(3-dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDAC) und 18.1 mg MTPA (jeweils 0.075 mmol, 2.5 Äquivalente) hinzu und rührte unter N₂-Atmosphäre. Des Weiteren wurden 0.4 mg (0.1 Äquivalente) DMAP als Katalysator hinzugeben. Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs geschah mittels Dünnschichtchromatographie. Nach 4 und 8 Stunden wurde bei unvollständiger Umsetzung des Diols je eine weitere Spatelspitze EDAC und MTPA hinzugefügt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 20 mL ges. NH₄Cl-, ges. NaHCO₃- sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereint und mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhält das Rohprodukt in Form eines gelben Öls.

Die Rohprodukte wurden an Sephadex LH-20 (MeOH) aufgetrennt. Eine abschließende Reinigung der Zielverbindung erfolgte mittels präparativer HPLC (HPLC B, Säule D, Programm D). Die Ausbeuten und Retentionszeiten der erhaltenen Derivate sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Ausbeute und Retentionszeit der bei der Umsetzung von Cephalosporolid G (46) mit (*R*)- bzw. (*S*)-MTPA erhaltenen Produkte.

Derivat	R _t [min]	Ausbeute [mg]
3-(<i>R</i>)-MTPA-Ester	12.9	2.4
4-(<i>R</i>)-MTPA-Ester	4.2	1.6
3-(<i>S</i>)-MTPA-Ester	13.6	1.9
4-(<i>S</i>)-MTPA-Ester	5.0	1.5

13.2 Methylierung von 7-*O*-Desmethyl-azamonosporascon (72)

5.0 mg (0.022 mmol) 7-*O*-Desmethylazamonosporascone (72) wurden in 10 mL Methanol gelöst und bei 0°C unter Rühren mit 2.5 mL Diazomethanlösung versetzt. Anschließend wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Reaktionsgemisch *in vacuo* eingengt.

Das Rohprodukt (5.6 mg) wurde an Sephadex LH-20 (Aceton) chromatographiert und ergab neben 1.2 mg 72 das einfach methylierte Produkt 73 mit einer Ausbeute von 3.6 mg (67 %).

14. Charakterisierung der Sekundärstoffe

14.1 Substanzen aus Stamm BS 6612

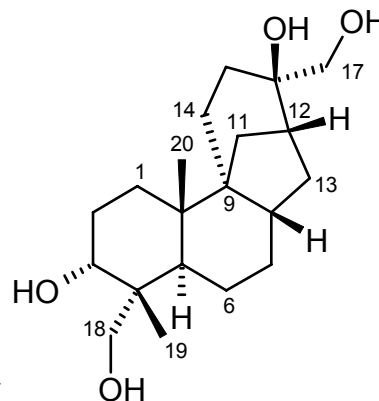
14.1.1 Aphidicolin (25)

farbloser Feststoff

$C_{20}H_{34}O_4$ (338.49)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd/ H_2SO_4)

$R_f = 0.24$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)



ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 677 [2M+H]^+$, $699 [2M+Na]^+$

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 711 [2M+Cl]^-$

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 361.2349307 [M+Na]^+$

gefunden $m/z = 361.2349540$ (Abweichung 0.06 ppm)

$[\alpha]_D^{20} = +12^\circ$ ($c = 1$ in Methanol)

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.61$ (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 3.48 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 18- H_b), 3.39 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, 17- H_b), 3.30 (m, 2H, 17- H_a /18- H_a), 2.14 (m, 1H, 12-H), 2.13 (m, 1H, 7- H_b), 2.02 (m, 1H, 8-H), 2.42 (dd, $J = 12.5, 3.5$ Hz, 1H, 5-H), 1.92 (m, 1H, 1- H_b), 1.91 (m, 1H, 15- H_b), 1.87 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H, 15- H_a), 1.83 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 11- H_b), 1.77 (dd, $J = 13.5, 8.0$ Hz, 1H, 13- H_b), 1.67 (ddd, $J = 12.0, 6.5, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 1.50 (m, 1H, 6- H_b), 1.49 (m, 1H, 1- H_a), 1.45 (dd, $J = 13.5, 6.2$ Hz, 1H, 14- H_b), 1.37 (m, 1H, 11- H_a), 1.36 (m, 1H, 2- H_a), 1.33 (m, 1H, 14- H_a), 1.29 (m, 1H, 6- H_a), 1.01 (s, 3H, 20- H_3), 0.99 (dd, $J = 13.5, 8.0$ Hz, 1H, 13- H_a), 0.93 (dt, $J = 12.5, 3.0$ Hz, 1H, 7- H_a), 0.72 (s, 3H, 19- H_3).

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 77.3$ (d, C-3), 75.6 (s, C-16), 72.1 (t, C-18), 68.7 (t, C-17), 50.3 (s, C-9), 42.3 (d, C-12), 41.4 (s, C-4), 41.3 (d, C-8), 40.9 (s, C-10), 34.8 (d, C-5), 33.7 (t, C-11), 32.4 (t, C-11), 28.8 (t, C-14), 27.9 (t, C-2), 27.6 (t, C-7), 27.4 (t, C-1), 25.7 (t, C-15), 24.2 (t, C-6), 18.0 (q, C-19), 15.62 (q, C-20).

14.2 Substanzen aus *Pleospora sp.* Stamm BS 6631

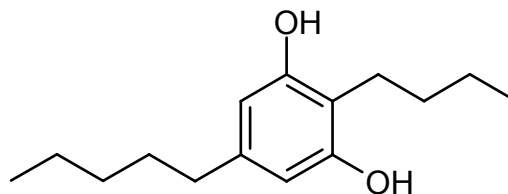
14.2.1 Stemphol (2-Butyl-5-pentyl-resorcin) (**28**)

farbloser Feststoff

$C_{15}H_{24}O_2$ (236.36)

Anfärbeverhalten: orange (Anisaldehyd/ H_2SO_4), braun (Orcin)

$R_f = 0.61$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)



DCI-MS: (200 eV): m/z (%) = 134 (56), 151 (100), 237 $[M+H]^+$ (14), 254 $[M+NH_4]^+$ (30), 271 $[M+NH_3+NH_4]^+$ (19)

EI-MS: (200 eV): m/z (%) = 236 $[M]^+$ (100), 193 $[M-C_3H_7]^+$ (64), 180 $[M-C_4H_8]^+$ (42), 105 (12), 94 (10)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 237 [M+H]^+$, 473 $[M+H]^+$

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 235 [M-H]^-$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3270-3290, 2920, 2850, 1625, 1588, 1528, 1430, 1285, 1270, 1200, 1100, 990, 840, 725, 660 \text{ cm}^{-1}$

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 273 \text{ nm} (3.48) 280 \text{ nm} (3.29) \text{ nm}$.

1H -NMR (600 MHz, CD_2Cl_2): 6.20 (s, 2H, 4/6-H), 4.89 (br s, 2H, OH), 2.56 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1'-H), 2.43 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 1.54 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2''-H), 1.49 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2'-H), 1.38 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3'-H), 1.31 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3''-H), 1.27 (sext., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4''-H), 0.92 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 0.88 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 5''-H).

1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6): 6.22 (s, 2H, 4/6-H), 3.24 (br s, 2H, OH), 2.61 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1'-H), 2.35 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 1.52 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2''-H), 1.49 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2'-H), 1.36 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3'-H), 1.31 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3''-H), 1.26 (sext., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4''-H), 0.89 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 0.85 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 5''-H).

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 6.21 (s, 2H, 4/6-H), 4.73 (br s, 2H, OH), 2.58 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1'-H), 2.43 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 1.54 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2''-H), 1.52 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 2'-H), 1.39 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3'-H), 1.30 (quint., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 3''-H), 1.28 (sext., $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4''-H), 0.82 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 0.87 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 5''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_2Cl_2): 154.7 (s, C-1/3), 142.5 (s, C-5), 112.8 (s, C-2), 108.2 (d, C-4/6), 35.7 (t, C-1''), 31.8 (t, C-4''), 31.7 (t, C-2'), 31.2 (t, C-2''), 23.1 (t, C-3'), 23.0 (t, C-1'), 22.8 (t, C-3''), 14.1 (q, C-4'/5'').

14.3 Substanzen aus *Beauveria* sp. Stamm BS 6750

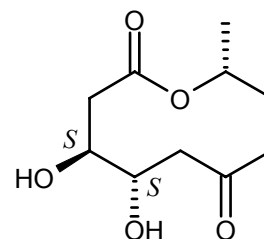
14.3.1 Cephalosporolid C (45)

farbloses Öl

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (216.24)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd/ H_2SO_4)

$R_f = 0.67$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)



DCI-MS: (200 eV): $m/z = 234$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 450 $[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ 3422, 2947, 1724, 1632, 1433, 1378, 1247, 1057, 961 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 203 (3.04) nm

(MeOH/HCl) λ_{max} (log ϵ) 203 (3.24) nm

(MeOH/NaOH) λ_{max} (log ϵ) 222 (3.34), 297 (3.71) nm

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 5.02$ (m, 1H, 9-H), 4.02 (ddd, $J = 11.0, 8.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 3.52 (ddd, $J = 6.5, 3.0, 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 2.86 (dd, $J = 17.5, 6.0$ Hz, 1H, 5- H_b), 2.77 (dd, $J = 17.5, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.69 (dd, $J = 17.5, 2.5$ Hz, 1H, 5- H_a), 2.41-2.32 (m, 3H, 2- H_a , 7- H_a/H_b), 2.03 (m, 2H, 8- H_2), 1.24 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 10- H_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 214.1$ (s, C-6), 171.0 (s, C-1), 74.4 (d, C-4), 73.5 (d, C-9), 69.8 (d, C-3), 46.1 (t, C-5), 41.3 (t, C-2), 41.1 (t, C-7), 34.3 (t, C-8), 19.7 (q, C-10).

14.3.2.1 Cephalosporolid G (46)

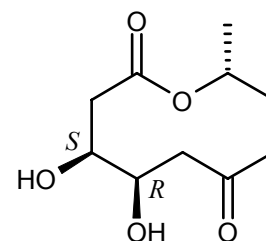
farbloser Feststoff

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (216.24)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd/ H_2SO_4)

$R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)

DCI-MS: (200 eV): $m/z = 234$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 450 $[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$



UV (MeOH)	λ_{\max} (log ϵ) 204 (2.99) nm
(MeOH/HCl)	λ_{\max} (log ϵ) 204 (3.14) nm
(MeOH/NaOH)	λ_{\max} (log ϵ) 222 (3.33), 295 (3.65) nm

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 5.03 (m, 1H, 9-H), 4.29 (ddd, J = 11.0, 5.0, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 4.19 (dt, J = 11.0, 2.5 Hz, 1H, 3-H), 2.72 (dd, J = 16.5, 11.5 Hz, 1H, 2-H_b), 2.68 (dd, J = 18.0, 5.0 Hz, 1H, 5-H_b), 2.58 (dd, J = 18.0, 11.5 Hz, 1H, 5-H_a), 2.48 (m, 1H, 7-H_b), 2.44 (dd, J = 16.5, 3.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.24 (m, 1H, 7-H_a), 2.03 (m, 1H, 8-H_b), 1.98 (m, 1H, 8-H_a), 1.21 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 10-H₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 212.2 (s, C-6), 171.5 (s, C-1), 73.5 (d, C-9), 70.4 (d, C-4), 67.6 (d, C-3), 48.0 (t, C-5), 41.2 (t, C-7), 37.0 (t, C-2), 34.9 (t, C-8), 19.7 (q, C-10).

14.3.2.2 3R-MTPA-Ester von Cephalosporolid G (46a)

farbloser Feststoff

C₂₀H₂₄F₃O₇ (433.41)

ESI-MS: (positive Ionen): m/z = 434 [M+H]⁺, 867 [2M+H]⁺

ESI-MS: (negative Ionen): m/z = 432 [M-H]⁻

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.60 – 7.40, (m, 5H, Ar-H), 5.57 (ddd, J = 11.5, 4.0, 2.5 Hz, 1H, 3-H), 4.38 (ddd, J = 11.0, 5.0, 2.5 Hz, 1H, 4-H), 3.58 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2.99 (dd, J = 11.5, 16.5 Hz, 1H, 2-H_a), 2.75 (dd, J = 18.0, 5.0 Hz, 1H, 5-H_a), 2.62 (dd, J = 18.0, 5.0 Hz, 1H, 2-H_b), 2.60 (dd, J = 18.0, 11.0 Hz, 1H, 5-H_b), 2.39 (ddd, J = 18.5, 11.0, 3.0 Hz, 1H, 7-H_a), 2.31 (ddd, J = 18.5, 7.0, 3.0 Hz, 1H, 7-H_b), 2.09 (m, 1H, 8-H_a), 2.00 (m, 1H, 8-H_b), 1.27 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 10-H₃).

14.3.2.3 3S-MTPA-Ester von Cephalosporolid G (46b)

farbloser Feststoff

C₂₀H₂₄F₃O₇ (433.41)

ESI-MS: (positive Ionen): m/z = 434 [M+H]⁺, 867 [2M+H]⁺

ESI-MS: (negative Ionen): m/z = 432 [M-H]⁻

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.60 - 7.40$, (m, 5H, Ar-H), 5.55 (ddd, $J = 12.0, 3.0, 2.5$ Hz, 1H, 3-H), 4.47 (ddd, $J = 11.0, 4.5, 2.5$ Hz, 1H, 4-H), 3.54 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2.88 (dd, $J = 17.0, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.79 (dd, $J = 18.0, 4.5$ Hz, 1H, 5-H_a), 2.62 (dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H, 5-H_b), 2.54 (dd, $J = 17.0, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.38 (ddd, $J = 18.5, 11.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_a), 2.32 (ddd, $J = 18.5, 7.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_b), 2.09 (m, 1H, 8-H_a), 2.00 (m, 1H, 8-H_b), 1.27 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 10-H₃).

14.3.2.4 4R-MTPA-Ester von Cephalosporolid G (**46c**)

farbloser Feststoff

C₂₀H₂₄F₃O₇ (433.41)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 434$ [M+H]⁺, 867 [2M+H]⁺

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 432$ [M-H]⁻

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.60 - 7.40$, (m, 5H, Ar-H), 5.77 (ddd, $J = 11.0, 5.0, 2.5$ Hz, 1H, 4-H), 5.01 (m, 1H, 9-H), 4.53 (ddd, $J = 10.5, 4.0, 2.5$ Hz, 1H, 3-H), 3.58 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2.69 (dd, $J = 18.0, 5.0$ Hz, 1H, 5-H_a), 2.65 (dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H, 5-H_b), 2.63 (dd, $J = 10.5, 16.5$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.59 (dd, $J = 16.5, 4.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.37 (ddd, $J = 18.0, 11.0, 4.0$ Hz, 1H, 7-H_a), 2.27 (ddd, $J = 18.0, 7.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_b), 2.04 (m, 1H, 8-H_a), 1.99 (m, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 10-H).

14.3.2.5 4S-MTPA-Ester von Cephalosporolid G (**46d**)

farbloser Feststoff

C₂₀H₂₄F₃O₇ (433.41)

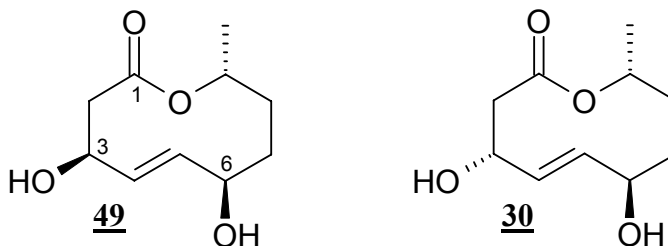
ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 434$ [M+H]⁺, 867 [2M+H]⁺

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 432$ [M-H]⁻

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.60 - 7.40$, (m, 5H, Ar-H), 5.76 (ddd, $J = 11.0, 4.5, 2.5$ Hz, 1H, 4-H), 5.05 (m, 1H, 9-H), 4.47 (ddd, $J = 12.0, 3.0, 2.5$ Hz, 1H, 3-H), 3.58 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2.83 (dd, $J = 18.0, 4.5$ Hz, 1H, 5-H_a), 2.80 (dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H, 5-H_b), 2.55 (dd, $J = 12.0, 17.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.50 (dd, $J = 17.0, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.41 (ddd, $J = 18.0, 11.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_a), 2.30 (ddd, $J = 18.0, 7.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_b), 2.07 (m, 1H, 8-H_a), 2.03 (m, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 10-H).

14.3.3 Decarestrictin C^A

Farbloser Feststoff

C₁₀H₁₆O₄ (200.24)**Anfärbeverhalten:** schwarz (Anisaldehyd/H₂SO₄)**R_f** = 0.35 (CHCl₃/MeOH 9:1)**DCI-MS:** (200 eV): $m/z = 218 [M+NH_4]^+$, $235 [M+NH_3+NH_4]^+$, $418 [2M+NH_4]^+$ **ESI-MS:** (positive Ionen): $m/z = 223 [M+H]^+$, $423 [2M+Na]^+$ **ESI-MS:** (negative Ionen): nicht erhältlich**IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 1720, 1460, 1359, 1260, 1170, 1121, 1061, 1010, 992, 965, 857 \text{ cm}^{-1}$ $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ (c = 1 in Methanol)**14.3.3.1 Decarestrictine C₃ (49)**

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 5.59$ (dd, $J = 16.0, 2.5$ Hz, 1H, 4-H), 5.50 (dd, $J = 16.0, 7.5$ Hz, 1H, 5-H), 4.92 (br s, 1H, 3-OH), 4.64 (qd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 1H, 9-H), 4.55 (br s, 1H, 6-OH), 4.50 (m, 1H, 3-H), 4.00 (m, 1H, 6-H), 2.42 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.36 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 1.82 (ddd, $J = 11.0, 7.5, 3.0$ Hz, 1H, 7-H_b), 1.66 (dd, $J = 13.0, 8.0$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.48 (m, 2H, 7-H_a, 8-H_a), 1.08 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 10-H₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 169.0$ (s, C-1), 132.1 (d, C-4), 131.2 (d, C-5), 73.1 (d, C-6), 71.7 (d, C-9), 66.1 (d, C-3), 44.5 (t, C-2), 37.3 (t, C-7), 31.0 (t, C-8), 21.4 (q, C-10).

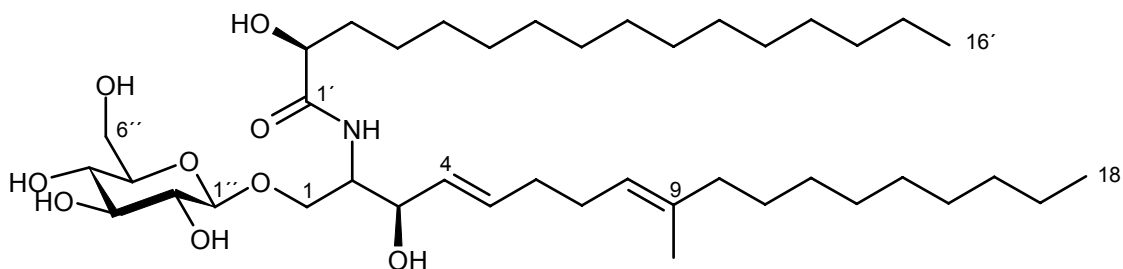
14.3.3.2 Decarestrictine C₄ (30)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 5.54$ (dd, $J = 19.0, 3.0$ Hz, 1H, 5-H), 5.45 (dd, $J = 19.0, 2.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.00 (br s, 1H, 3-OH), 4.88 (m, 1H, 9-H), 4.44 (m, 1H, 3-H), 4.24 (m, 1H, 6-H), 2.84 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.18 (dd, $J = 13.0, 6.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 1.92 (m, 1H, 8-H_b), 1.70 (m, 1H, 7-H_b), 1.52 (m, 1H, 7-H_a), 1.22 (m, 1H, 8-H_a), 1.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 10-H₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 170.1$ (s, C-1), 137.0 (d, C-5), 127.5 (d, C-4), 69.5 (d, C-9), 69.1 (d, C-3), 66.1 (d, C-6), 45.2 (t, C-2), 29.4 (t, C-7), 24.3 (t, C-8), 17.8 (q, C-10).

^A Die angegebenen Daten wurden aus einem 5:1-Gemisch von 49 und 30 ermittelt.

14.3.4 Cerebrosid B



farbloses Öl

$C_{41}H_{77}NO_9$ (728,07)

$R_f = 0.24$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 751 [M+Na]^+$, $1477 [2M+Na]^+$

ESI-MS: (negative Ionen): nicht erhältlich

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 728.5671095 [M+H]^+$

gefunden $m/z = 728.566978$ (Abweichung 0.18 ppm)

$[\alpha]_D^{20} = +5.4^\circ$ ($c = 1$ in Methanol)

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 5.71$ (dtd, $J = 15.0, 5.5, 1.0$ Hz, 1H, 5-H), 5.47 (ddt, $J = 15.0, 7.2, 1.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.14 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, 8-H), 4.27 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 1''-H), 4.12 (m, 2H, 1-H_b, 3-H), 4.10 (dd, $J = 10.0, 5.5$ Hz, 1H, 2'-H), 3.97 (m, 1H, 2-H), 3.85 (dd, $J = 12.0, 1.5$ Hz, 1H, 6''-H_b), 3.70 (dd, $J = 10.5, 3.5$ Hz, 1H, 1-H_a), 3.65 (dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, 1H, 6''-H_a), 3.34 (td, $J = 9.0, 1.0$ Hz, 1H, 3''-H), 3.27 (m, 1H, 5''-H), 3.26 (m, 1H, 4''-H), 3.18 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, 2''-H), 2.04 (m, 6H, 6-H₂, 7-H₂), 1.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 10-H₂), 1.69 (m, 3'-H), 1.59 (s, 3H, 19-H₃), 1.38 (m, 2H, 11-H₂), 1.28 (m, 36H, 12-H₂ bis 17-H₂, 4'-H₂ bis 15'-H₂), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, 18-H₃, 16'-H₃).

^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 177.2$ (s, C-1'), 136.8 (s, C-9), 134.6 (d, C-5), 131.1 (d, C-4), 124.8 (d, C-8), 104.7 (d, C-1''), 78.0 (d, C-3''), 77.9 (d, C-5''), 75.0 (d, C-2''), 73.1 (d, C-2'), 72.9 (d, C-3), 71.6 (d, C-4''), 69.7 (t, C-1), 62.7 (t, C-6''), 54.6 (d, C-2), 40.8 (t, C-10), 35.9 (t, C-3'), 33.8 (t, C-6), 33.1 (t, C-16, C-14'), 30.4 - 30.9 (t, C-12 bis C-15, C-5' bis C-14'), 29.1 (t, C-11), 28.8 (t, C-7), 26.2 (t, C-4'), 23.7 (t, C-17, C-15'), 16.2 (q, C-19), 14.5 (q, C-18, C-16').

14.4 Substanzen aus *Phoma sp.* Stamm BS 6771

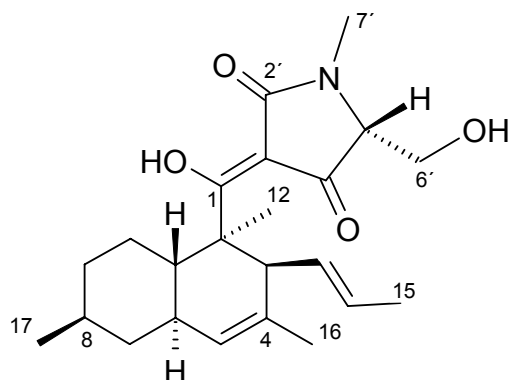
14.4.1 CJ-21,058 (50)

weißer Feststoff

$C_{23}H_{33}NO_4$ (387.52)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

$R_f = 0.45$ (CHCl₃/MeOH 9:1)



EI-MS: (70 eV): m/z (%) = 387 (10) [M]⁺, 369 (53) [M-H₂O]⁺, 351 (23) [M-2H₂O]⁺, 217 (95) [M-C₇H₈NO₄]⁺, 189 (78), 182 (100), 152 (51) [M-C₁₆H₂₅-H₂O]⁺, 119 (38), 105 (34), 91 (29), 56 (47)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 388$ [M+H]⁺

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 386$ [M-H]⁻, 795 [2M-2H+Na]⁻, 1198 [3M+Cl]⁻

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 388.248235$ [M+H]⁺

gefunden $m/z = 388.248245$ (Abweichung 0.03 ppm)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3404, 2916, 1695$ (sh), 1659, 1570, 1497, 1456, 1377, 1261, 1229, 1204, 1088, 1058, 1040, 968, 922 cm⁻¹

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 204$ (4.21), 252 (3.85), 293 (4.00) nm.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 204$ (4.20), 234 (3.84), 294 (4.04) nm.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 211$ (3.89), 254 (3.98), 292 (3.94) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max}([\Theta]) = 205$ (295700), 224 (29200), 233 (31800), 256 (14300), 289 (72900), 320 (-13000) nm.

¹H-NMR (600 MHz, -20 °C, CD₂Cl₂): $\delta = 5.20$ (dq, $J = 16.0, 7.0$ Hz, 1H, 14-H), 5.13 (br d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 5-H), 5.10 (dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, 1H, 13-H), 3.94 (dd, $J = 11.5, 3.0$ Hz, 1H, 6'-H_a), 3.85 (dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, 1H, 6'-H_b), 3.59 (dd, $J = 4.0, 3.0$ Hz, 1H, 5'-H), 2.99 (br d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 3-H), 2.98 (s, 3H, 7'-H₃), 1.90 (br dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1H, 10-H_a), 1.78 (br dt, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6-H), 1.75 (br dt, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 7-H_a), 1.71 (m, 1H, 9-H_a), 1.60 (br td, $J = 10.0, 2$ Hz, 1H, 11-H), 1.54 (s, 3H, 16-H₃), 1.51 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 15-H₃), 1.45 (m, 1H, 8-H), 1.33 (s, 3H, 12-H₃), 1.02 (qd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, 1H, 9-H_b), 1.00 (qd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, 1H, 10-H_b), 0.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 17-H₃), 0.82 (q, $J = 12.0$ Hz, 1H, 7-H_b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, CD_2Cl_2): $\delta = 198.3$ (s, C-1), 190.7 (s, C-4'), 176.9 (s, C-2'), 131.9 (s, C-4), 130.4 (d, C-13), 127.8 (d, C-14), 125.6 (d, C-5), 100.2 (s, C-3'), 67.1 (d, C-5'), 59.6 (t, C-6'), 49.2 (d, C-3), 49.0 (s, C-2), 42.3 (t, C-7), 39.5 (d, C-11), 39.1 (d, C-6), 35.7 (t, C-9), 33.5 (d, C-8), 28.1 (t, C-10), 27.0 (q, C-7'), 22.4 (q, C-17), 22.1 (q, C-16), 17.9 (q, C-15), 13.3 (q, C-12).

14.5 Substanzen aus *Chaetomium sp.* Stamm Gö212

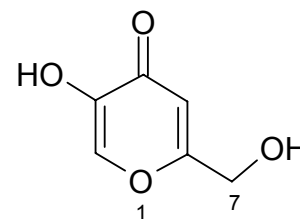
14.5.1 Koji-Säure (59)

blass gelbe Nadeln

$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ (142.11)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd/ H_2SO_4), gelb (Orcin)

$R_f = 0.21$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)



EI-MS: (70 eV): m/z (%) = 142 (100) $[\text{M}]^+$, 113 (64), 97 (28), 85 (45), 69 (12), 57 (10)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1648, 1601, 1571, 1382, 1340, 1216, 1050, 1063, 937, 857\text{ cm}^{-1}$

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon) = 217$ (4.26), 269 (3.92) nm.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon) = 270$ (3.89) nm.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon) = 319$ (3.77) nm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.98$ (s, 1H, 2-H), 6.52 (s, 1H, 5-H), 4.41 (s, 2H, 7- H_2).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.96$ (br s, 1H, 3-OH), 7.99 (s, 1H, 6-H), 6.33 (s, 1H, 3-H), 5.60 (br s, 1H, 7-OH) 4.41 (s, 2H, 7- H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): $\delta = 176.9$ (s, C-4) 177.6 (s, C-6), 147.4 (s, C-3), 141.1 (d, C-2), 110.7 (d, C-5), 61.2 (t, C-7).

14.6 Substanzen aus *Nodulisporium sp.* Stamm Gö223

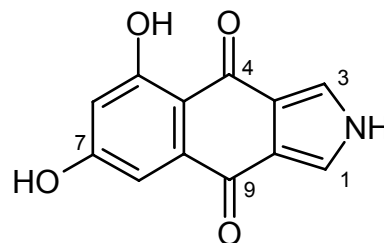
14.6.1 7-*O*-Desmethyl-azamonosporascone (72)

gelber Feststoff

$C_{12}H_7NO_4$ (229.19)

Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)

$R_f = 0.29$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)



ESI-MS: (positive Ionen): kein passendes Ion

ESI-MS: (negative Ionen): $m/z = 228 [M-H]^-$

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 228.0302313 [M-H]^-$

gefunden $m/z = 228.0302650$ (Abweichung 0.14 ppm)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425, 2974, 2867, 2366, 2244, 1607, 1541, 1368, 1284, 1213, 1024, 822, 761, 607 \text{ cm}^{-1}$

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 223 (3.89), 253 (3.72), 277 (3.86), 398(1.72) \text{ nm}$.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 223 (3.85), 252 (3.68), 276 (3.83), 400 (2.27) \text{ nm}$.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 225 (3.67), 296 (3.94), 451 (1.72) \text{ nm}$.

1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 13.60$ (br s, OH), 7.52 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 7.38 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 6.64 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 5.82 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H).

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.50$ (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 7.43 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 7.01 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 6.18 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO$): $\delta = 182.7$ (s, C-4), 180.9 (s, C-9), 174.5, (s, C-7), 166.4 (s, C-5), 137.5 (s, C-8a), 123.6 (d, C-3), 122.5 (s C-3a), 122.2 (d, C-1), 122.1 (s, C-9a), 113.5 (d, C-8), 107.5 (d, C-6), 106.7 (s, C-4a).

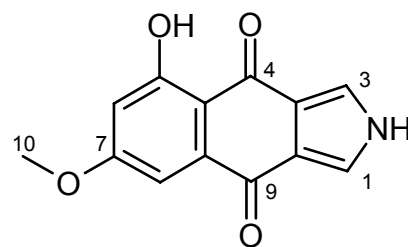
14.6.2 Azamonosporascon (73)

gelber Feststoff

$C_{13}H_9NO_4$ (243.22)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

$R_f = 0.56$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)



EI-MS: (70 eV): m/z (%) = 243 (100) $[M]^+$, 214 (20), 200 (10), 185 (18), 172 (10), 144 (10), 107 (10).

ESI-MS: (positive Ionen): nicht erhältlich

ESI-MS: (negative Ionen): m/z = 242 $[M-H]^-$

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3435, 2955, 2352, 1623, 1536, 1375, 1274, 1210, 589 cm^{-1}

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon)$ = 223 (3.46), 250 (3.29), 270 (3.34), 394(1.68) nm.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon)$ = 223 (3.48), 250 (3.25), 272 (3.30) nm.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\text{max}}(\lg \epsilon)$ = 263 (3.43) nm.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.30 (br s, 1H, OH), 12.58 (br s, 1H, N-H), 7.71 (s, 2H, 1-H, 3-H), 7.11 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 8-H), 6.70 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 9-H), 3.88 (s, 3H, OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO): δ = 184.9 (s, C-4), 178.2 (s, C-9), 165.0, (s, C-7), 164.8 (s, C-5), 137.4 (s, C-8a), 124.1 (d, C-3), 123.7 (s C-3a), 121.4 (d, C-1), 120.9 (s, C-9a), 111.2 (d, C-8), 106.5 (d, C-6), 105.3 (s, C-4a), 55.9 (q, C-10).

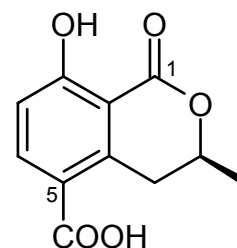
14.6.3 5-Carboxymellein (60)

farbloser Feststoff

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ (222.20)

Anfärbeverhalten: kein Farbreaktion (Anisaldehyd), braun (Orcin)

R_f = 0.54 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)



DCI-MS: (200 eV): m/z (%) = 418, 374, 257 $[M+\text{NH}_3+\text{NH}_4]^+$, 240 $[M+\text{NH}_4]^+$, 213, 196, 179

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3192, 1684, 1578, 1231, 824 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): δ = 8.20 (d, J = 9.5 Hz, 1H, 6-H), 6.97 (d, J = 9.5 Hz, 1H, 7-H), 4.78 (ddd, J = 12.0, 6.0, 3.2 Hz 1H, 3-H), 3.96 (dd, J = 17.5, 3.2 Hz, 1H, 4-H_b), 3.02 (dd, J = 17.5, 12.0 Hz, 1H, 4-H_a), 1.46 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 9-H₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Aceton- d_6): δ = 171.0 (s, C-1), 167.3 (s, C-10), 165.9 (s, C-8), 145.8 (s, C-4a), 139.9 (d, C-6), 116.3 (d, C-7), 109.9 (s, C-8a), 76.4 (d, C-3), 33.2 (t, C-4), 20.8 (q, C-9).

14.7 Häufig isolierte Verbindungen

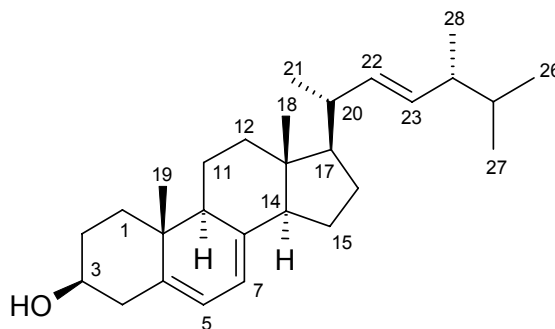
14.7.1 Ergosterol (73)

farbloser Feststoff

$C_{28}H_{44}O$ (396.66)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd/ H_2SO_4)

$R_f = 0.70$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)



EI-MS: (200 eV): m/z (%) = 396 $[M]^+$ (20), 363 $[M-CH_3-H_2O]^+$ (15), 337 (8), 271 (6), 253 (8), 211 (10), 157 (12), 143 (15), 91 (20), 81 (28), 69 (78), 55 (100), 43 (92)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3420, 2954, 2871, 1711, 1653, 1458, 1372, 1333, 1242, 1160, 1056, 972, 834, 606 \text{ cm}^{-1}$

UV-VIS: (MeOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 263$ (3.71), 271 (3.84), 282 (3.86), 293 (3.65) nm.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 263$ (3.74), 271 (3.85), 281 (3.86), 239 (3.67) nm.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 262$ (3.51), 271 (3.70), 281 (3.73), 293 (3.41) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max}([\Theta]) = 223$ (16300), 261 (-25700), 270 (-34500), 281 (-33200), 292, (-16900) nm.

$[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ ($c = 1$ in Methanol)

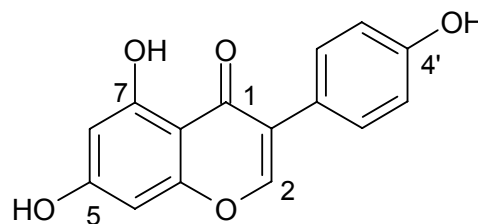
1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$)^B: $\delta = 5.54$ (dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz, 1H, 6-H), 5.36 (ddd, $J = 8.0, 5.5, 2.5$ Hz, 1H, 7-H), 5.20 (dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz, 1H, 23-H), 5.15 (dd, $J = 15.0, 8.0$ Hz, 1H, 22-H), 3.61 (tt, $J = 11.0, 4.0$ Hz, 1H, 3-H), 2.44 (ddd, $J = 14.0, 3.4, 2.0$ Hz, 1H, 4-H_b), 2.26 (dd, $J = 14.0, 13.0$ Hz, 1H, 4-H_a), 1.16-2.07 (m, 18H, 1-H₂, 2-H₂, 9-H, 11-H₂, 12-H₂, 14-H₂, 15-H₂, 16-H₂, 17-H, 20-H, 24-H, 25-H), 1.01 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 21-H₃), 0.92 (s, 3H, 19-H₃), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 28-H₃), 0.81 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 27-H₃), 0.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 26-H₃), 0.66 (s, 3H, 18-H₃).

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 141.4$ (s, C-8), 139.8 (s, C-5), 135.6 (s, C-23), 132.0 (s, C-22), 119.6 (d, C-6), 116.3 (d, C-7), 70.5 (d, C-3), 55.7 (d, C-17), 54.6 (d, C-14), 46.3 (d, C-9), 42.8 (d, C-24), 42.8 (s, C-13), 40.8 (t, C-4), 40.5 (d, C-20), 39.1 (t, C-12), 38.4 (t, C-1), 37.0 (s, C-10), 33.1 (d, C-25), 32.0 (t, C-2), 28.3 (t, C-16), 23.0 (t, C-15), 21.1 (t, C-11), 21.1 (q, C-27), 20.0 (q, C-21), 19.7 (q, C-26), 17.3 (q, C-28), 16.3 (q, C-19), 12.1 (q, C-18).

^B Die Zuordnung der Daten erfolgte nach dem *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*¹⁹⁷

14.7.2 Genistein (74)

farbloser Feststoff

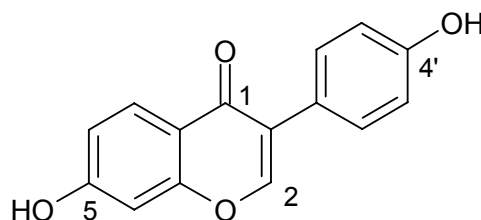
C₁₅H₁₀O₅ (270.04)**Anfärbeverhalten:** braun (Anisaldehyd/H₂SO₄)**R_f** = 0.66 (CHCl₃/MeOH 9:1)**ESI-MS:** (neg. Ionen) $m/z = 269 [M-H]^-$, $539 [2M-H]^-$.**UV-VIS** (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 262 (4.57) \text{ nm}$;(MeOH, HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 262 (4.57) \text{ nm}$;(MeOH, NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 275 (4.57) \text{ nm}$.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.03$ (s, 1 H, 2-H), 7.37 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H), 6.82 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 6.31 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 4-H), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 182.2$ (s, C-1), 166.2 (s, C-5), 163.8 (s, C-7), 159.7 (s, C-3a), 158.8 (s, C-4'), 154.8 (d, C-2), 131.4 (d, C-2',6'), 124.7 (s, C-1a), 123.3 (s, C-1'), 116.3 (d, C-3',5'), 106.2 (s, C-7a), 100.2 (d, C-6), 94.8 (d, C-4).

14.7.3 Daidzein (75)

farbloser Feststoff

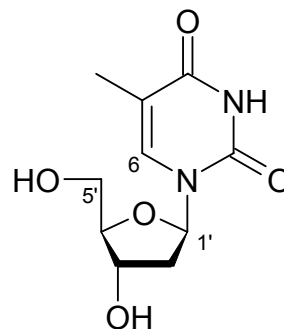
C₁₅H₁₀O₄ (254.24)**Anfärbeverhalten:** braun (Anisaldehyd/H₂SO₄)**R_f** = 0.53 (CHCl₃/MeOH 9:1)**ESI-MS:** (neg. Ionen) $m/z = 253 [M-H]^-$, $507 [2M-H]^-$.

¹H-NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄): $\delta = 8.16$ (s, 1 H, 2-H), 8.03 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, 7-H), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, 2'-H, 6-H'), 6.93 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1 H, 6-H), 6.83 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 4-H), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.25$ (s, 1 H, 2-H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, 7-H), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, 2'-H, 6-H'), 6.92 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1 H, 6-H), 6.84 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 4-H), 6.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H).

14.7.4 Thymidin (76)

farbloser Feststoff

 $C_{10}H_{14}N_2O_5$ (242.23)**Anfärbeverhalten:** grün (Anisaldehyd/ H_2SO_4) $R_f = 0.16$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1)**EI-MS:** (200 eV): m/z (%) = 242 $[M]^+$ (12), 126 (27), 117 (92), 99 (25), 80 (20), 73 (56), 55 (65), 45 (93), 43 (100) **1H -NMR** (300 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 7.81$ (s, 1H, 6-H), 6.28 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, 1'-H), 4.39 (dt, 1H, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 3'-H), 3.90 (dd, 1H, $J = 7.0, 3.5$ Hz, 4'-H), 3.79 (dd, 1H, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 5'-H_b), 3.73 (dd, 1H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 5'-H_b), 2.10 (m, 2H, 2'-H₂), 1.86 (s, 3H, CH₃).

15 Abbaureaktionen an Simocyclinon D8

15.1 Vorversuche

Spaltung mit Natriumhydroxid

Zu einer Lösung von 5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) in 2.0 mL MeOH wurden tropfenweise wässrige 5 M Natriumhydroxid-Lösung gegeben, so dass sich ein pH-Wert von 10 ergab. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend mit wässriger 1 M HCl-Lösung angesäuert (pH = 6) und zweimal mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 4.9 mg eines Rohprodukts unbekannter Zusammensetzung.

Spaltung mit Natriumhydrogencarbonat

In 2.0 mL MeOH löste man 5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) und fügte unter Rühren 5.0 mg (0.060 mmol) NaHCO₃ in Pulverform hinzu. Es wurde für 30 min unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen mit 0.5 M HCl-Lösung vorsichtig neutralisiert. Durch tropfenweise Zugabe weiterer 0.5 M HCl-Lösung wurde ein pH-Wert von 6.0 eingestellt und zweifach mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 6.4 mg Rohprodukt.

Spaltung mit Natriummethanolat

5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) wurden in 2.0 mL MeOH gelöst und auf -20°C gekühlt. Es wurden binnen einer halben Stunde insgesamt 2.2 mL (0.021 mmol, 4 Äquivalente) einer 0.1 M Natriummethanolat-Lösung unter Rühren langsam hinzuge tropft. Die Kühlung wurde entfernt und für weitere 4 h bei RT weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde in 5 mL eiskalte 1 M HCl gegeben. Nach zweifacher Extraktion mit 25 mL Ethylacetat wurden die organischen Phasen mit dem gleichen Volumen Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 4.6 mg Rohprodukt

Spaltung mit Ammoniak

Es wurden 5.0 mg (0.005 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) in 2.0 mL MeOH unter Rühren gelöst und auf 0°C gekühlt. Durch Verdünnung von 0.95 mL konzentrierter Ammoniaklösung (25%) Lösung mit 1.05 mL Methanol wurde eine 7 M Lösung dargestellt, ebenfalls gekühlt und mit der Lösung des Simocyclinons vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 h gerührt und anschließend die Base und das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum entfernt. Man erhält 5.6 mg Rohprodukt.

15.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Bestimmung des Reaktionsverlaufs

1.0 mg (1.1 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) wurden in 10 mL MeOH gelöst und mit 10 mL einer analog zum Vorversuchen hergestellten 7 M methanolischen Ammoniaklösung bei RT unter Rühren versetzt. Direkt nach dem Vereinen der Lösungen wurden 250 µL der Lösung entnommen. Während der ersten 3 Stunden wurden alle 30 min, bis zur 6. Stunde alle 60 min weitere Proben á 250 µL entnommen. Anschließend erfolgte eine Probenentnahme alle 90 min bis zu einer Reaktionsdauer von 12 Stunden. Eine letzte Probe wurde nach der 20. Stunde entnommen. Die Proben der Reaktionslösung wurden unmittelbar nach der Entnahme im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Durch Aufnahme des Rückstandes in 250 µL Methanol und Zentrifugation erhielt man den für die HPLC (HPLC B, Programm E, Säule B) verwendeten Überstand.

Die HPLC-Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 360$ nm ausgewertet, da in diesem Bereich sowohl Simocyclinon D8 (**85**) als auch das gewünschte Spaltprodukt **95** ein Adsorptionsmaximum für UV-Licht aufweisen. Anhand der Peakflächen konnten die in den Lösungen enthaltenen Mengen bestimmt werden. Die Identifikation der Peaks erfolgte anhand des Vergleichs mit den aus der LC-MS-Analytik erhaltenen UV-Spektren und Retentionszeiten. Für **85** wurde die Fläche des Peaks der Messung zu Beginn der Reaktion, für **95** die Fläche des Peaks nach 20 Stunden als 100% festgesetzt. Anhand dieser Referenzwerte konnte für die anderen Messungen der relative Anteil der beiden Substanzen bestimmt werden.

Tabelle 13: Peakflächen von **85** und **95** in den HPLC-Chromogrammen der Reaktionskontrolle ($\lambda = 360$ nm).

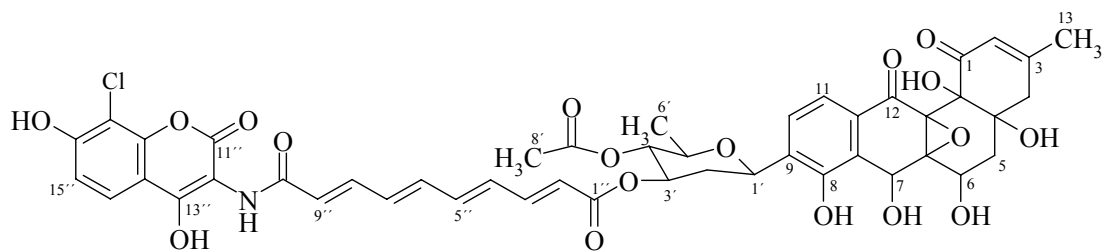
Reaktionszeit [h]	Fläche ₈₅	rel. Menge [%]	Fläche ₉₅	rel. Menge [%]
0.0	250.1	100.0	0.0	0.0
1.0	239.3	95.6	12.1	7.9
2.0	240.9	96.4	21.1	13.9
3.0	236.3	94.5	38.9	25.6
4.0	235.0	94.0	54.0	35.5
5.0	211.8	84.7	68.9	45.4
6.0	209.3	83.6	79.0	52.0
7.5	204.1	81.6	101.1	66.5
9.0	212.0	84.8	119.3	78.3
10.5	198.1	79.2	126.2	82.9
12.0	189.9	76.0	137.0	90.1
20.0	159.3	63.7	151.7	100.0

Optimierung der Reaktionsbedingungen

10.0 mg (10.8 mmol) Simocyclinon D8 (**85**) wurden unter Rühren in in 50.0 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von 50 mL einer 7 M Lösung von Ammoniak in Methanol wurde für 48 h bei RT gerührt. Erneut erfolgte in länger werdenden Abständen (1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48 h) die Proben-Entnahme und HPLC-Analytik (HPLC B, Programm E, Säule B) von 250 μ L der Reaktionslösung. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und man erhielt 11.16 mg Rohprodukt.

15.3 Charakterisierung der Spaltprodukte

15.3.1 Simocyclinon D8 (85)



C₄₆H₄₂NO₁₈Cl (932.29)

R_f-Wert: 0.17 (CHCl₃/MeOH 9:1)

Anfärbeverhalten: dunkelbraun (Anisaldehyd)

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 954 [M+Na]⁺

ESI-MS (negative Ionen): m/z (%) = 930 [M-H]⁻

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3420, 2929, 1696, 1619, 1572, 1531, 1437, 1372, 1239, 1125, 1047, 1012, 822, 765 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, d₆-DMSO): δ = 1.16 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 6'-H₃), 1.55 (ddd, J = 11.5, 11.5, 11.5 Hz, 1H, 2'-H_{ax}), 1.82 (s, 3H, 13-H₃), 1.91 (ddd, J = 13.5, 7.5, 1.0 Hz, 1H, 5-H_a), 1.99 (m, 1H, 5-H_b), 2.01 (s, 3H, 8'-H₃), 2.24 (d, J = 19.0 Hz, 1H, 4-H_a), 2.43 (ddd, J = 11.5, 4.5, 1.0 Hz, 1H, 2'-H_{eq}), 2.70 (d, J = 19.0 Hz, 1H, 4-H_b), 3.78 (dq, J = 9.0, 6.0 Hz, 1H, 5'-H_{ax}), 4.42 (dd, J = 7.5, 7.5 Hz, 1H, 6-H), 4.75 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, 1H, 4'-H_{ax}), 4.82 (br s, 1H, OH), 4.96 (dd, J = 11.5, 1.0 Hz, 1H, 1'-H_{ax}), 5.18 (ddd, J = 11.5, 9.0, 5.0 Hz, 1H, 3'-H_{ax}), 5.27 (br s, 1H, OH), 5.58 (br s, 1H, OH), 5.75 (s, 1H, 7-H), 5.90 (s, 1H, 2-H), 6.00 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 2''-H), 6.57 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 9''-H), 6.61-6.72 (m, 2H, 4''-H, 7''-H), 6.79-6.88 (m, 2H, 5''-H, 6''-H), 7.23 (br s, 2H, 14''-H, 15''-H), 7.26 (dd, J = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 3''-H), 8.28 (dd, J = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 8''-H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 11-H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 9.57 (s, 1H, OH), 9.79 (s, 1H, OH), 10.31 (br s, 1H, OH), 12.6 (br s, 1H, OH).

¹³C-NMR (125.7 MHz, d₆-DMSO): δ = 17.7 (q, C-6'), 20.5 (q, C-8'), 23.2 (q, C-13), 36.5 (t, C-2'), 38.9 (t, C-5), 42.7 (t, C-4), 62.8 (d, C-6), 63.6 (d, C-7), 65.4 (s, C-6a), 65.7 (s, C-12a), 70.7 (d, C-1'), 71.7 (d, C-3'), 72.1 (s, C-4a), 73.2 (d, C-5'), 74.2 (d, C-4'), 75.1 (s, C-12b), 105.5 (s, C-12''), 114.8 (s, C-17''), 115.5 (s, C-13a''), 115.9 (d, C-15''), 118.2 (d, C-11), 119.5 (d, C-14''), 121.5 (d, C-2''), 121.8 (d, C-2), 124.7 (d, C-9''), 125.1 (s, C-7a), 125.9 (d,

C-10), 127.7 (s, C-11a), 133.1 (d, C-4''), 134.3 (s, C-9), 134.5 (d, C-7''), 139.0 (d, C-6''), 140.3 (d, C-5''), 141.0 (d, C-8''), 144.2 (d, C-3''), 145.6 (s, C-17a''), 150.9 (s, C-16''), 152.7 (s, C-8), 157.9 (s, C-3), 158.7 (s, C-13''), 159.0 (s, C-11''), 165.3 (s, C-1''), 166.1 (s, C-10''), 169.8 (s, C-7'), 190.0 (s, C-12), 196.1 (s, C-1).

15.3.2 Fragment A+B Methylester (95)

gelber Feststoff

$C_{20}H_{16}ClNO_7$ (417.81)

R_f -Wert: 0.19

(CHCl₃/MeOH 9:1)

Anfärbeverhalten: dunkelbraun (Anisaldehyd)

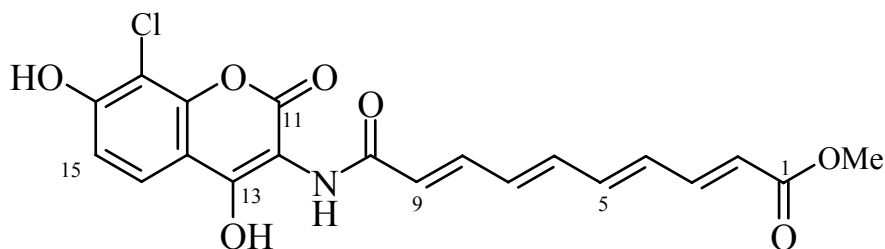
ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = nicht erhältlich

ESI-MS (negative Ionen): m/z (%) = 416 [M-H]⁻, 854 [2M-2H+Na]⁺

UV-VIS: (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 349 (4.33), 335 (4.32), 221 (3.95) nm.

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ϵ) = 357 (4.28), 213 (3.98) nm.

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ϵ) = 348 (4.42), 337 (4.42), 231 (4.23) nm.



¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ = 11.9 (br s, 1H, NH), 9.92 (s, 1H, OH), 9.24 (s, 1H, OH), 7.32 (dd, J = 15.0 Hz, 11.0 Hz, 1H, 8-H), 7.22 (dd, J = 15.0 Hz, 11.5 Hz, 1H, 3-H), 7.15 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 14-H), 7.12 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 15-H), 6.88 (dd, J = 14.5, 11.0 Hz, 1H, 6-H), 6.79 (dd, J = 14.5, 11.0 Hz, 1H, 5-H), 6.67 (dd, J = 14.0, 11.5 Hz, 1H, 7-H), 6.63 (dd, J = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 4-H), 6.51 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 9-H), 6.08 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 2-H).

¹³C-NMR (125.7 MHz, d₆-DMSO): δ = 167.0 (s, C-10), 165.4 (s, C-1), 160.2 (s, C-11), 160.1 (s, C-13), 150.4 (s, C-16), 144.8 (s, C-17a), 144.7 (d, C-3), 140.9 (d, C-8), 140.8 (d, C-5), 139.6 (d, C-6), 135.3 (d, C-7), 133.0 (d, C-4), 130.2 (d, C-9), 127.6 (d, C-2), 121.9 (d, C-14), 118.9 (d, C-15), 116.5 (s, C-13a), 115.9 (s, C-17), 105.8 (s, C-12), 51.9 (q, 1-OCH₃).

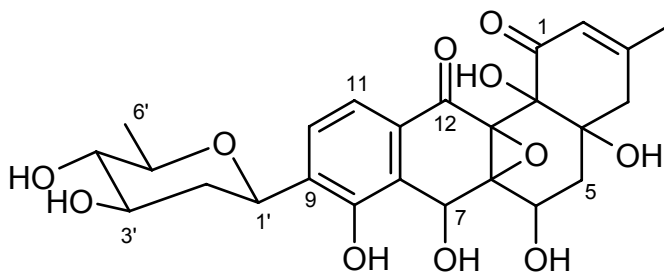
15.3.3 Fragment C (96)

oranger Feststoff

 $C_{25}H_{28}O_{11}$ (504.50) R_f -Wert: 0.25 (CHCl₃/MeOH 9:1)

Anfärbeverhalten: dunkelbraun

(Anisaldehyd)

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 505 [M+H]⁺ESI-MS (negative Ionen): m/z (%) = 503 [M-H]⁻

¹H-NMR (500 MHz, d₆-DMSO): δ = 9.50 (s, 1H, OH), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 11-H), 6.84 (br d, 1H, OH), 5.92 (s, 1H, 2-H), 5.76 (s, 1H, 7-H), 5.58 (br d, 1H, OH), 5.27 (br s, 1H, OH), 4.92 (br s, 1H, OH), 4.82 (br s, 2H, OH), 4.72 (dd, J = 11.5, 1.0 Hz, 1H, 1'-H_{ax}), 4.43 (t, J = 8.5, 7.5 Hz, 1H, 6-H), 3.50 (m, 1H, 3'-H_{ax}), 3.38 (m, 5'-H_{ax}), 2.86 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, 1H, 4'-H_{ax}), 2.72 (d, J = 19.0 Hz, 1H, 4-H_b), 2.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H, 4-H_a), 2.17 (ddd, J = 11.5, 4.5, 1.0 Hz, 1H, 2'-H_{eq}), 2.01 (s, 3H, 8'-H₃), 1.95 (m, 2H, 5-H₂), 1.84 (s, 3H, 13-H₃), 1.28 (m, 1H, 2'-H_{ax}), 1.23 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6'-H₃).

¹³C-NMR (125.7 MHz, d₆-DMSO): δ = 206.7 (s, C-1), 196.1 (s, C-12), 157.8 (s, C-3), 152.5 (s, C-8), 135.7 (s, C-9), 127.3 (s, C-11a), 125.7 (d, C-10), 124.6 (s, C-7a), 121.8 (d, C-2), 118.1 (d, C-11), 77.1 (d, C-5'), 76.0 (d, C-4'), 75.1 (s, C-12b), 72.1 (s, C-4a), 71.8 (d, C-1'), 71.1 (d, C-3'), 65.7 (s, C-12a), 65.4 (s, C-6a), 63.6 (d, C-7), 62.8 (d, C-6), 42.7 (t, C-4), 40.1 (t, C-2'), 39.9 (t, C-5), 23.1 (q, C-13), 18.3 (q, C-6').

C. Literaturverzeichnis

- ¹ R. D. Firn, C.G. Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 382-391.
- ² T. O. Larsen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, M. E. Hansen, J. C. Frisvad, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 672-695.
- ³ U. Fuchs, G. Steinberg, *Protoplasma*, **2005**, *226*, 75-80.
- ⁴ B. Schulz, C. Boyle, S. Draeger, A.-K. Rommert, K. Krohn, *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 996-1004.
- ⁵ R. Bru, S. Sellés, J. Casado-Vela, S. Belchí-Navarro, M. Angeles Pedreño, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 65-71.
- ⁶ J. D. Walton, *Plant Cell*, **1996**, *8*, 1723-1733.
- ⁷ T. Arie, H. Takahashi, M. Kodama, T. Teraoka, *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)* **2007**, *24*, 135-147.
- ⁸ R. S. Iyer, B. F. Coles, K. D. Raney, R. Thier, F. P. Guengerich, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1603-1609.
- ⁹ U. Holzgrabe, *Pharm. Unserer Zeit*, **2006**, *35*, 410-414.
- ¹⁰ E. S. Istvan, J. Deisenhofer, *Science* **2001**, *292*, 1160-1164.
- ¹¹ C. D. Furberg, B. Pitt, *Curr. Contr. Trials Card. Med.* **2001**, *2*, 205-207.
- ¹² H. P. Molitoris, *Feddes Repertorium* **2002**, *113*, 165-182.
- ¹³ C. Schlagmann, J. Remien, *J. Mol. Med.* **1986**, *64*, 939-942.
- ¹⁴ D. Hofmeister, N. P. Keller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 393-416.
- ¹⁵ George A. Ellestad, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6627-6634.
- ¹⁶ L. A. Wessjohann, E. Ruijter, D. Garcia-Rivera, W. Brandt, *Molecular Diversity* **2005**, *9*, 171-186.
- ¹⁷ H. G. Floss, P. J. Keller, J. M. Beale, *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*(6), 957-970.
- ¹⁸ J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 245-249.
- ¹⁹ N. P. Keller, T. Hohn, *Fungal Genet. Biol.* **1997**, *21*, 17-29
- ²⁰ M. Fernandes, N. Keller, T. Adams, *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 1355-1365.
- ²¹ N. P. Keller, G. Turner, J. W. Bennet, *Nat. Rev. Microbiol* **2005**, *3*, 937-947.
- ²² J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- ²³ R. Thomas, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 612-627.
- ²⁴ R. Finking, M. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453-488.
- ²⁵ W. Kallow, J. Kennedy, B. Arezi, G. Turner, H. van Doehren, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 395-408.
- ²⁶ B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, New York, **2000**.
- ²⁷ M. Rohmer, *Pure and Applied Chemistry* **2003**, *75*, 375-387.
- ²⁸ P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181-222
- ²⁹ T. Haarmann, C. Machado, Y. Lübbe, T. Correia, C. L. Schardl, D. G. Panaccione, P. Tudzynski, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1312-1320.
- ³⁰ G. Watve, R. Tickoo, M. M. Jog, B. D. Bhole, *Arch. Microbiol.* **2001**, *176*, 391-392.
- ³¹ M. S. Lee, E. H. Kerns, *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, *18*, 187-279.
- ³² A. Fredenhagen, C. Derrien, E. Gassmann, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 385-391.
- ³³ G. A. Cordell, Y.G. Shin, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1089-1094.
- ³⁴ K. F. Nielsen, J. Smedsgaard, *J. Chrom. A* **2003**, *1002*, 111-136.
- ³⁵ J.-L. Wolfender, C. Terreaux; K. Hostettmann, *Pharmaceut. Biol.* **2000**, *38*, 41-54.
- ³⁶ J.-L. Wolfender, E. F. Queiroz, K. Hostettmann, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 697-709.
- ³⁷ Y. Konishi, T. Kiyota, C. Draghici, J.-M. Gao, F. Yeboah, S. Acoca, S. Jarussophon, E. Purisima, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1187-1197.
- ³⁸ D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 1-6.
- ³⁹ J. McLauchlin, *Potato Research*, **1983**, *26*, 261-275.
- ⁴⁰ R. A. Wyand, J. K. M. Brown, *Molecular Plant Pathology* **2003**, *4*, 187-198.
- ⁴¹ U. Höller, A. D. Wright, G. F. Matthée, G. M. König, S. Draeger, H.-J. Aust, B. Schulz, *Mycol. Res.* **2000**, *104*, 1354-1365.
- ⁴² J. Bitzer, *Dissertation: Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus Bakterien und endophytischen Pilzen durch chemisches Screening*, Universität Göttingen, **2005**.
- ⁴³ H. Laatsch, *AntiBase – a database for identification of natural products*, Chemical Concepts, Weinheim, **2006**.
- ⁴⁴ *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 15:2, Chapman & Hall / CRC Press, Boca Ranton (FL), **2006**.
- ⁴⁵ C. J. Rizzo, J. L. Wood, G. T. Furst, A. B. Smith, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 735-739.
- ⁴⁶ W. Dalziel, B. Hesp, K. M. Stevenson, J. A. J. Jarvis, *J. Chem. Soc. (Perkin Trans. I)* **1973**, 2841-2851.

- 47 (a) A. N. Starratt, S. R. Loschiavo, *Can. J. Microbiol.* **1974**, *20*, 416-417; (b) K. Kawada, Y. Kimura, K.
Katagiri, A. Suzuki, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1611-1612; (c) A. Ichihara, H. Oikawa, K.
Hayashi, M. Hashimoto, S. Sakamura, R. Sakai, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1687-1689.
- 48 M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.
- 49 M. R. Adams, J. D. Bu'Lock, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, *10*, 389-391.
- 50 F. Knauser, E. Brandl, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 125-131.
- 51 M. J. Ackland, J. R. Hanson, A. H. Ratcliffe, I. H. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, *17*, 165-
166.
- 52 H. Oikawa, S. Ohashi, A. Ichihara, S. Sakamura, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7541-7554.
- 53 S. Ikegami, T. Taguchi, M. Ohashi, M. Oguro, H. Nagano, Y. Mano, *Nature* **1978**, *275*, 458-460.
- 54 J. Lösch, *Magazin des Deutschen Krebsforschungszentrums: Einblick* **2005**, *4*, 26-28.
- 55 V. S. Dhillon, S. A. Husain, G.N. Ray, *Teratog. Carcinog. and Mutagen* **2003**, *1*, 35-45.
- 56 E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, M. Badertscher, *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung
organischer Verbindungen*, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.
- 57 S. Marumo, H. Hattori, M. Katayama, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1521-1522.
- 58 U. Sankawa, H. Shimada, K. Yamasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 3601-3605.
- 59 B. Nowak-Thompson, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. Stafford, N. Torkewitz, T. D. Gaffney, S. T. Lam, I.
Molnár, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 860-869.
- 60 H. Stodola, D. Weisleder and R. F. Vesonder, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1797-1798.
- 61 M. Solfrizzo, R. N. Strange, C. Sabia, A. Visconti, *Natural Toxins* **2006**, *2*, 14-18.
- 62 A. Farooq, J. Gordon, J. R. Hanson, J. A. Takahashi, *Phytochemistry* **1995**, *38*, 557-558.
- 63 M. J. Ackland, J. R. Hanson, P. B. Hitchcock, A. H. Ratcliffe, *J. Chem. Soc. (Perkin Trans. I)* **1985**,
843-847.
- 64 H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim,
1999.
- 65 J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-518.
- 66 K. Latypov, J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8569-8577.
- 67 R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, *78*, 413-447.
- 68 S. Grabley, E. Granzer, K. Huetter, D. Ludwig, M. Mayer, R. Thiericke, G. Till, J. Wink, S. Philipps, A.
Zeeck, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 56-65.
- 69 A. Goehrt, A. Zeeck, K. Huetter, R. Kirsch, H. Kluge, R. Thiericke, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 66-73.
- 70 M. Arai, N. Morita, S. Aoyagi, C. Kibayashi, *Tetrahedron* **2000**, *41*, 1199-1203.
- 71 V. Rukachaisirikul, S. Pramjit, C. Pakawatchai, M. Isaka, S. Supothina, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1953-
1955.
- 72 D.E. Nettleton, T.W. Doyle, B. Krishnan, *Tet. Lett.* **1985**, *26*, 4011-4014.
- 73 G. Kawai, Y. Ikeda, K. Tubaki, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2137-2146.
- 74 S. G. Batrakov, I. V. Konova, V. I. Sheichenko, E. Esipov, L. A. Galanina, L. N. Istratova, Y. E.
Sergeeva, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1239-1246.
- 75 J.-W. Tan, Z.-J. Dong, J.-K. Liu, *Lipids* **2003**, *31*, 81-84.
- 76 Y. Funaki, G. Kawai, K. Mori, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 615-623.
- 77 J. Koga, T. Yamayuchi, M. Shimura, N. Ogaga, K. Oshima, K. Umemura, M. Kikuchi, N. Ogasawara, *J.
Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31985-31991.
- 78 J. L. Oller-López, M. Iranzo, S. Mormeneo, E. Oliver, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Org. Biomol. Chem.*
2005, *3*, 1172-1173.
- 79 M. Mayer, R. Thiericke, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, *4*, 495-500.
- 80 S. Grabley, P. Hammann, K. Huetter, R. Kirsch, H. Kluge, R. Thiericke, M. Mayer, A. Zeeck, *J. Antibiot.*
1992, *4*, 1176-81.
- 81 M. Mayer, R. Thiericke, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1372-80.
- 82 I. Sattler, R. Thiericke, A. Zeeck, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 221-240.
- 83 G. G. Zhanel, M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, J. A. Karlowsky, *Drugs*
2001, *61*, 443-498.
- 84 G. Dräger, A. Kirschning, R. Thiericke, M. Zerlin, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 365-375.
- 85 H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619-627.
- 86 L. J. Haynes, J. R. Plimmer, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1960**, *14*, 292-315.
- 87 *Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 14:2*, Chapman & Hall / CRC, Boca Raton (FL),
2006.
- 88 C. Boros, A. Dix, B. Katz, Y. Vasina, C. Pearce, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 862-865.
- 89 Y. Sugie, S. Inagaki, Y. Kato, H. Nishida, C.-H. Pang, T. Saito, S. Sakemi, F. Dibb-Hajj, J. P. Mueller, J.
Sutcliffe, Y. Kojima, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 25-29.

- 90 N. J. Phillips, J. T. Goodwin, A. Fraiman, R. J. Cole, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8223-8231.
- 91 S. B. Singh, D. L. Zink, M. A. Goetz, A. W. Dombrowski, J. D. Polishook, D. J. Hazuda, *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 2243-2246.
- 92 E. Turos, J. E. Audia, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8231-8236.
- 93 P. Mc Phedran, C. W. Heath, *J. Am. Med. Assoc.* **1969**, *209*, 2021-2025.
- 94 H. R. Burmeister, G. A. Bennett, R. F. Vesonder, C. W. Hesseltine, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 634-639.
- 95 B. J. L. Royles, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1981-2001.
- 96 R. F. Vesonder, L. W. Tjarks, W. K. Rohwedder, H. R. Burmeister, J. A. Laugal, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 759-761.
- 97 M. Lundin, S. W. Deopujari, L. Lichko, L. P. da Silva, H. Baltscheffsky, *Biochimica et biophysica Acta* **1992**, *1098*, 217-223.
- 98 T. König, A. Kapus, B. Sarkadi, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **1993**, *25*, 537-545.
- 99 P. Nyren, A. Strid, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1989**, *268*, 659-666.
- 100 M. H. Wheeler, R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, *Mycol. Res.* **1999**, *103*, 967-973.
- 101 R. Xiao, Z. Zhi-hui, L. Xin-hua, D. Yue-sheng, L. Jie, M. Ying, L. Mei, Z. Hua, H. Jian-gong, *Chin. J. Antibiot.* **2006**, *31*, 458-461.
- 102 W. Bode, E. Meyer Jr., J. C. Powers, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1951-1963.
- 103 D. Meißner, *Dissertation: Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen*, Universität Düsseldorf, **2005**.
- 104 E. C. Marfori, S. Kajiyama, E. Fukusaki, A. Kobayashi, *Z. Naturf.* **2002**, *57c*, 456-470.
- 105 M. Segeth, a. Bonnefoy, M. Bronstrup, M. Knauf, D. Schummer, L. Toti, L. Vertesy, M. C. Wetzel-Raynal, J. Wink, G. Seibert, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 114-122.
- 106 H. He, J. E. Janso, H. Y. Yang, M. P. Singh, V. S. Bernan, M. Greenstein, G. T. Carter, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 821-825.
- 107 J. Y. Li, G. Strobel, J. Harper, E. Lobkovsky, J. Clardy, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 767-770.
- 108 J. W. Sims, J. P. Fillmore, D. D. Warner, E. W. Schmidt, *ChemComm* **2005**, *2*, 186-188.
- 109 E. S. Istvan, J. Deisenhofer, *Science* **2001**, *292*, 1160-1164.
- 110 A. Endo, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 852-854.
- 111 C. R. Hutchinson, J. Kennedy, C. Park, S. Kendrew, K. Auclair, J. Vederas, *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, *73*, 287-295.
- 112 H. Oikawa, T. Tokiwano, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 321-352.
- 113 K. Auclair, A. Sutherland, J. Kennedy, D. J. Witter, J. P. Van den Heever, C. R. Hutchinson, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11519-11520.
- 114 R. Schobert, *Naturwissenschaften* **2007**, *94*, 1-11.
- 115 O. Schlörke, *Dissertation: Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese von Sekundärmetaboliten endophytischer Pilze aus Algen und Pflanzen mariner Habitats*, Universität Göttingen, **2005**.
- 116 F. Peláez, J. Collado, F. Arenal, A. Basilio, A. Cabello, M.T. Díez Matas, J. B. Garzía, A. González del Val, V. González, J. Gorrochategui, P. Hernandez, I. Martin, G. Platas, F. Vicente, *Mycol. Res.* **1998**, *102*, 755-761.
- 117 T. O. Larsen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, M. E. Hansen, J. C. Frisvad, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 672-695.
- 118 M. Umeda, K. Ohtsubo, M. Saito, S. Sekita, K. Yoshihira, S. Natori, S. Udagawa, F. Sakabe, H. Kurata, *CMLS* **1975**, *31*, 435-438.
- 119 S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, N. Phonkerd, K. Soyong, P. Kongsaree, A. Suksamrarn, *Planta Medica* **2002**, *68*, 834-836.
- 120 H. Fujimoto, M. Nozawa, E. Okuyama, M. Ishibashi, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 330-336.
- 121 C. Pouchert, J. Behnke, *Aldrich® Library of ¹³C and ¹H FT-NMR Spectra*, Aldrich Chemical Co., **1993**, *1*, 724.
- 122 K. Saito, *Bot. Mag. Tokyo* **1907**, *21*, 7-11.
- 123 H. R. V Arnstein, R. Bentley, *Biochem.* **1954**, 493-508.
- 124 R. Bentley, *Natural Product Reports* **2006**, *23*, 1046-1062.
- 125 P. Bajpai, P. K. Agrawala, L. Vishwanathan, *Journal of General Microbiology* **1981**, *127*, 131-136.
- 126 A. Ciegler, S. Kadis, S. J. Ajl, *Microbial Toxins*, Academic Press, New York, **1971**, Vol. IV, 235-250.
- 127 A. Beëlik, *Adv. Carbohy. Chem.* **1956**, *11*, 145-183.
- 128 C. M. Maragos, *J. Toxicol., Toxin Rev.* **2004**, *23*, 317-344.
- 129 J. S. Chen, C. Wei, M. R. Marshall, *J. Agric. Food. Chem.* **1991**, *39*, 1897-1901.
- 130 L.F. Bjeldanes, H. Chew, *Mutation Research* **1979**, *67*, 367-371.

- 131 V. Kahn, *Pigm. Cell Res.* **1995**, *8*, 234-240.
- 132 R. W. Pero, R. G. Owens, *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 546-547.
- 133 P. Boutibonnes, Y. Auffray, C. Malherbe, W. Kogbo, C. Marais, *Mycopathologia* **1984**, *87*, 43-49.
- 134 R. L. Raimon L.; G. S. Walton, *Journal of Invertebrate Pathology* **1969**, *14*, 53-59.
- 135 H. Kayahara, N. Shibata, K. Tadasa, H. Maeda, T. Kotani, I. Ichimoto, *Agric. Biol Chem.* **1990**, *54*, 2441-2442.
- 136 R. Stipanovic, J. Zhang, B. D. Bruton, M. H. Wheeler, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4109-4112.
- 137 S. Fotso, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 931-41.
- 138 W. B. Turner, D. C. Aldrich, *Fungal metabolites II*, 1st Edition, Academic Press, New York, **1982**, 83-93.
- 139 G. A. Kraus, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 201-202.
- 140 M. H. Wheeler, B. D. Bruton, L. S. Puckhaber, J. Zhang, R. D. Stipanovic, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4113-4120.
- 141 H. Fujimoto, H. Okuyama, Y. Motahashi, E. Yoshida, M. Yamazaki, *Mycotoxins* **1995**, *41*, 61-66.
- 142 A. C. Whyte, K. B. Gloer, J. B. Gloer, B. Koster, D. Malloch, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 768-772.
- 143 J.-Y. Chung, I. Fujii, S. Harada, U. Sankawa, Y. Ebizuka, *J. Bacteriol.*, **2002** *184*, 6615-6122.
- 144 J. Qian-Cutrone, Q. Gao, S. Huang, S. E. Khlor, J. A. Veitch, Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1656-1660.
- 145 L. A. Mitscher, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1633-1649.
- 146 T. Okuno, S. Oikawa, T. Goto, K. Sawai, H. Shirahama, T. Matsumoto, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 997-1001.
- 147 J.R. Anderson, R. L. Edwards, A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc. (Perkin Trans. 1)* **1983**, 2185-2192.
- 148 M. Chinworrungsee, P. Kittakoop, M. Isaka, A. Rungrod, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1965-1969.
- 149 N. Claydon, J.F. Grove, M. Pople, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 937-943.
- 150 M. A. de Alvarenga, R. Braz Fo, O. R. Gottlieb, J. P. de P. Dias, A. F. Magalhaes, E. G. Magalhaes, G. C. de Magalhaes, M. T. Magalhaes, J. G. S. Maia, R. Maques, A. J. Marsaioli, A. A. L. Mesquita, A. A. de Moraes, A. B. de Oliveira, G. G. de Oliveira, G. Pedreira, S. A. Pereira, S. L. V. Pinho, A. E. G. Sant'ana, C. C. Santos, *Phytochemistry* **1978**, *17*, 511-516.
- 151 C. N. Lewis, J. Staunton, D. C. Sunter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, *4*, 747-757.
- 152 H. Berndt, *Dissertation: Untersuchung zu einem Verfahren zur Bestimmung von Ergosterol als unspezifischen, quantitativen Parameter für den Pilzbefall von Getreide*, Universität Göttingen, **1990**.
- 153 R. S. Burden, D. T. Cooke, G. A. Carter, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1791-1804.
- 154 R. T. Lorenz, W. M. Casey, L. W. Parks, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 6169-6173.
- 155 H. J. Roth, H. Fenner, *Arzneistoffe*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, **1997**.
- 156 M. Hosny, J. P. N. Rosazza, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 805-813.
- 157 R. Y.-Y. Chiou, S.-L. Cheng, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3656-3660.
- 158 U. Willeke, W. Barz, *Arch. Microbiol.* **1982**, *132*, 266-269.
- 159 a) H. Chimura, T. Sawa, Y. Kumada, H. Nagawa, M. Matsuzaki, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 619; b) K. Komiyama, S. Funayama, Y. Anraku, A. Mita, Y. Takahashi, S. Omura, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1344.
- 160 M. Weidenheimer, J. C. Hem, *Mycol. Res.* **1994**, *98*, 1376-1378.
- 161 K. K. Han, J. M. Soares, M. A. Haidar, G. Rodrigues de Lima, E. C. Baracat, *Obstetrics & Gynecology* **2002**, *99*, 389-394.
- 162 S. Barnes, T. G. Peterson, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, *208*, 103-108.
- 163 A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, Heidelberg: Spektrum, **1994**.
- 164 *NIST/EPA/MSDC standard spectral database*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, **1990**.
- 165 G. Strobel, B. Daisy, U. Castillo, J. Harper, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257-268.
- 166 D. J. Newman, G. M. Cragg, *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 461-477.
- 167 D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompliano, *Nat. Rev. Drug. Dis.* **2007**, *6*, 29-40.
- 168 R. H. Baltz, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 507-513.
- 169 J. E. Galagan, S. E. Calvo, C. Cuomo, L.-J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S.-I. Lee, M. Bastürkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, et al., *Nature* **2005**, *438(7071)*, 1151-1156.
- 170 I. Gaffoor, D. W. Brown, R. Plattner, R. H. Proctor, W. Qi, F. Trails, *Eukaryotic Cell* **2005**, *4*, 1926-1933.
- 171 H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619-627
- 172 P. K. Chang, K. C. Ehrlich, J. Yu, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2372-2377.
- 173 J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 31-86.

- 174 J. Schimana, H.-P. Fiedler, I. Groth, R. Sussmuth, W. Beil, M. Walker, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 779-787.
- 175 J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103-137.
- 176 J. Halász, B. Podányi, L. Vasvári-Debreczy, A. Szabó, F. Hajdú, Z. Böcskei, J. Hegedus-Vajda, A. Györbíró, I. Hermecz, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10081-10085.
- 177 J. Schimana, M. Walker, A. Zeeck, H.-P. Fiedler, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2001**, *27*, 144-148.
- 178 M. Holzenkämpfer, M. Walker, A. Zeeck, J. Schimana, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 301-307.
- 179 A. J. Birch, S. F. Hussain, *J. Chem. Soc. C*, **1969**, *11*, 1473-1474.
- 180 C. A. Bunton, G. W. Kenner, M. J. T. Robinson, B. R. Webster, *Tetrahedron* **1963**, *19*, 1001-1010.
- 181 J. Rohr, M. Schönewolf, G. Udvarnoki, K. Eckardt, G. Schumann, C. Wagner, J. M. Beale, S. D. Sorey, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2547-2551.
- 182 A. Trefzer, S. Pelzer, J. Schimana, S. Stockert, C. Bihlmaier, H.-P. Fiedler, K. Welzel, A. Vente, A. Bechthold, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002**, *46*, 1174-1182.
- 183 U. Galm, J. Schimana, H.-P. Fiedler, J. Schmidt, S.-M. Li, L. Heide, *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 102-114.
- 184 M. Gellert, M. H. O'Dea, T. Itoh, J.-I. Tomizawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 4474-4478.
- 185 R. H. Flatman, A. J. Howells, L. Heide, H.-P. Fiedler, A. Maxwell, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 1093-1100.
- 186 M. Pacholec, C. L. Freel Meyers, M. Oberthür, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4949-4956.
- 187 H. Xu, L. Heide, S. M. Li, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 655-662.
- 188 D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem, J. Folkman, *Nature* **1990**, *348*, 555-557.
- 189 S. Liu, J. Widom, C. W. Kemp, C. M. Crews, J. Clardy, *Science* **1998**, *282*, 1324-1327.
- 190 M. Deeg, H. Hagenmaier, A. Kretschmer, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 320-328.
- 191 M. Tanaka, T. Moriguchi, M. Kizuka, Y. Ono, S.-I. Miyakoshi, T. Ogita, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 437-441.
- 192 P. J. Kociński, *Protecting Groups*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2005**, 323-338.
- 193 F. Kong, *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 841-865.
- 194 I. Nobutaka, K. Katsumi, I. Nobuo, T. Haruo, O. Satoshi, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1788-1790.
- 195 *Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie*, Merck, Darmstadt, **1980**.
- 196 W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1974**, *43*, 2923.
- 197 R. J. Cole, M. A. Schweikert, *Handbook of Secondary Fungal Metabolites, Vol I-III*, Academic Press, San Diego, London, **2003**.

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe zahlreicher Menschen nicht möglich gewesen. Obwohl es mir unmöglich erscheint alle zu nennen, möchte ich es versuchen...

Ein besonderer Dank gilt Jens Bitzer für das chemische Screening eines Großteils der in dieser Arbeit beschriebenen Stämme sowie die Überlassung zahlreicher Extrakte. Erst durch ihn wurde mein aufkeimendes Interesse an der Naturstoffchemie in die richtigen Bahnen gelenkt. Die zahlreichen anregenden Diskussionen und lehrreichen Ratschläge machen ihn heute nicht nur zu einem hervorragenden Mentor sondern ebenfalls zu einem guten Freund.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich den aufopferungsvollen NMR-Operatoren der Abteilung Zeeck/Grond, namentlich Stephanie Grond, Sandra Lösger, Inken Plitzko, Frank Surup, Melanie Quitschau sowie die Ehemaligen Oliver Schlörke, Sven Meyer, Diana Wolff und Tim Schumann. Ihr habt an fast jedem Wochenende für uns an den Geräten gegessen und standet jederzeit für das Referenzieren, Spreizen und Drucken der Spektren zur Verfügung! Natürlich gilt mein Dank ebenfalls den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Carola Zolke, Christiane Siebert und Martin Weitemeyer. Auch ihr habt zahlreiche Proben vermessen, hattet immer ein offenes Ohr für mich und habt so manche Ausnahme gemacht. Dem Leiter der NMR-Abteilung Herrn Machinek danke ich für seinen kritischen Rat bei zahlreichen Problemen in der Strukturaufklärung. Die Massenspektren wurden von György Udvarnoki, Gabriele Krökel und Dr. Holm Frauendorf gemessen, wofür ich ebenfalls sehr dankbar bin. Bei Nadine Czempinski, Luise Hoffmann, Daniel Vollmar und Markus Radzom bedanke ich mich für die HPLC-MS Messungen. Für zahlreiche und vor allem kompetente Hilfe in technischen Fragen sowie die Messung eines Großteils der in dieser Arbeit veröffentlichten UV-, CD- und IR-Spektren gilt mein Dank den CTAs unserer Abteilung: Jutta Gerber-Nolte, Michaela Klingebiel, Verena Brandenburg, Hans-Peter Kroll und Hans-Jörg Langer. Vor allem Hans-Peter gilt ein besonderer Dank für sein persönliches Engagement bei den immer wieder kehrenden Problemen mit der HPLC. Jutta sei zusätzlich für die ausgezeichnete Hilfe bei der Chromatographie und Kultivierung gedankt.

Durch ihre Korrekturen haben Jens Bitzer, Sandra Lösger, Adriana Textor und Philip Kössler maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit deutlich besser zu lesen ist als sie es ursprünglich einmal war. Danke! Stephanie Grond möchte ich für die interessanten Ideen zur Strukturaufklärung und Biosynthese der hier vorgestellten Sekundärstoffe danken.

Meinen wechselnden Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre musikalische Toleranz, ihre großzügige Hilfsbereitschaft und die Zerstreuung während der Laborarbeit. Zu meiner Anfangszeit in Z4 waren dies Michaela, Hans-Peter, Jens und Yee Yee Thu, später in Z6 Tobias Bender, Ole Revermann, Adrijana Kubicek-Pejic, Melanie Quitschau, Philip Kössler, Mieke Westermann und Adriana Textor.

Der gesamten Abteilung danke ich für das außerordentlich angenehme Arbeitsklima, die gemeinsamen Ausfahrten und die Kurzweil in den Pausen und Abendstunden. Viele von euch haben sich in den Jahren zu Freunden entwickelt und es wird schwer sein noch einmal eine Umgebung zu finden, in der es einem so leicht fällt zur Arbeit zu gehen. Es war mir immer eine große Freude, euch bei Computerfragen und anderen Dingen zu beraten und zu unterstützen!

Nicht zuletzt gilt es auch einigen Menschen in meinem privaten Umfeld zu danken. Zu aller erst Leif, Dirk und Malte, die mich nun seit gut zwei Jahrzehnten durchs Leben begleiten und mich immer so akzeptiert haben wie ich bin. Ihr bildet eine wichtige Konstante in meinem Leben und ich werde unsere WG und unsere gemeinsamen Aktivitäten nach meinem Weggang aus Göttingen wirklich sehr vermissen.. Auch meinen anderen Freunden und Bekannten aus Göttingen bin ich zu ewigem Dank verpflichtet. Ich möchte hier nur jene nennen die mich besonders geprägt haben: Adriana, Adrijana, und Lui...ihr seid großartige Menschen! Unvergessen sind die vielen gemeinsamen Stunden in der Mensa, in einer der zahlreichen Kneipen und Discotheken, im Kino oder einfach nur auf dem Sofa!
DANKE!

Es bedeutet mir sehr viel meiner Freundin Jana zu danken. Deine Zuneigung und Dein Vertrauen in meine Person haben mir besonders in der Endphase dieser Arbeit gezeigt, wie wunderbar die Welt außerhalb der Universität ist! Du hast mir neue Hoffnung, Inspiration und Kraft geschenkt und lässt mich immer mehr zu einem glücklichen Menschen werden. Du hast auf ewig einen ganz besonderen Platz in meinem Herzen gefunden!

Am wichtigsten ist es mir jedoch meinen Eltern und meiner Familie Danke zu sagen. Ohne euch hätte ich es mir nie in den Kopf gesetzt, mich am Studium der Chemie zu versuchen. Vielen Dank für euer Vertrauen, die stetige Motivation und nicht zuletzt für die bedingungslose emotionale und finanzielle Unterstützung.

In Liebe,

Marko

Lebenslauf

Am 04. Juli 1978 wurde ich, Marko Gentzsch, als erstes von zwei Kindern des Chemiefacharbeiters Walter Gentzsch und seiner Ehefrau Margitta, geb. Zeback, in Hamburg geboren. Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft.

In der Zeit von Juli 1985 bis Juli 1987 besuchte ich die Grundschule Steinbeck und von August 1987 bis Juli 1989 die Waldschule Buchholz i.d.N. Von August 1989 bis Juli 1991 schloss sich die Orientierungsstufe Am Kattenberge in Buchholz i.d.N. an. Ab August 1991 war ich Schüler des Gymnasiums am Kattenberge in Buchholz i.d.N., dessen Besuch ich im Mai 1998 mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Zum Wintersemester 1998/1999 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Fach Chemie. Die Diplomvorprüfung bestand ich am 27. April 2001. Im Wintersemester 2003 begann ich unter Leitung von Herrn Prof. A. Zeeck mit meiner Diplomarbeit zum Thema „Sekundärstoffe aus *Streptomyces* sp. K23/10 unter veränderten Kultivierungsbedingungen“. Die Diplomhauptprüfung bestand ich am 07. Mai 2004.

Von Mai 2004 bis Juli 2007 fertigte ich die vorliegende Arbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Zeeck an.

Göttingen, 31. Mai 2007

(Marko Gentzsch)