

Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus arktischer und antarktischer Meereisbakterien

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

vorgelegt von
Dirk Schröder
aus Uelzen

Göttingen 2001

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Laatsch

Korreferent: Prof. Dr. H. Lackner

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von bis Dezember 2001 im Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Laatsch angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Laatsch danke ich für sein stetes Interesse und die vielen hilfreichen Diskussionen, die den Weg zu der vorliegenden Arbeit begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
UNTERSUCHUNGEN AN ARKTISCHEN UND ANTARKTISCHEN MEEREISBAKTERIEN	14
Lebensraum Meereis	15
Biochemie kälteangepaßter Mikroorganismen	16
Biochemische Anwendungen	17
Naturstoffe aus kälteangepaßten Bakterien	18
Aufgabenstellung	21
Kultivierung der untersuchten Meereisbakterien	21
Primärscreening	23
Stamm ANT V/2 369	26
Anzuchtversuche	26
<i>cyclo</i> (Pro-Trp)	27
<i>cyclo</i> (Leu-Pro)	29
<i>cyclo</i> (Phe-Pro)	30
<i>cyclo</i> (4-Hyp-Phe)	31
3-Hydroxyacetylintol	32
<i>cyclo</i> (Pro-Val)	33
Stamm ANT V/2 51	33
Stamm ANT V/2 517	36
Stamm ANT V/2 253	37
N ^β -Acetyltryptamin	38
N ^β -Acetylkynuramin	40
N-(2-Phenylethyl)acetamid	42
Stamm ANT V/2 381	42
Stamm ARK XIII/2 373	43
N-Acetyl-β-oxotryptamin	43
Stamm ARK XIII/2 437	45
4-Hydroxy-5-(indol-3yl)-5-oxo-pentan-2-on	46
4-Hydroxybenzaldehyd und 4-Hydroxybenzoesäure	48
Stamm ARK XIII/2 442	49

<i>cyclo</i> (Phe-Pro) und 4-Hydroxybenzaldehyd	50
<i>cyclo</i> (Pro-Tyr)	50
3-Indolcarbaldehyd und Daidzein	51
Farbige Meereisbakterien	51
SEKUNDÄRMETABOLITE AUS ANDEREN MIKROORGANISMEN	53
Stamm HEL 45	53
Extrakt I	53
Indol	55
(R)-(+)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol	55
Extrakt II	57
<i>cyclo</i> (Leu-Pro) und 3-Indolcarbaldehyd	58
Tryptanthrin	58
3-Indolcarbonsäure	60
Indol-3-carbonsäurethiomethylester	60
Stamm B 4481	62
Germicidin	63
Stamm B 4710	65
Stamm B 7029	67
2-Methyl-4(3 <i>H</i>)-chinazolinon	68
Phenylacetamid und 3-Indolcarbonsäure	69
Stamm B 6003	70
2-Aminobenzoesäuremethylester	71
Pyrrol-2-carbonsäuremethylester	73
Stamm GW 1/1829	74
4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on	75
Sulfomycin I	80
Perlolyrin	84
Stamm GW 22/1818	88
F1301	92
Stamm GW 5/1543	96
N-Acetyltyramin und N _β -(2-Phenylethyl)acetamid	97
Stamm GW 39/1573	98
<i>cyclo</i> (Ile-Pro), <i>cyclo</i> (Leu-Pro) und <i>cyclo</i> (Phe-Pro)	99
Nargenicin B1	100

1-(9H- β -Carbolin-1-yl)-3-hydroxy-propan-1-on	106
ZUSAMMENFASSUNG	108
MATERIALIEN UND METHODEN	114
Allgemeines	114
Materialien	115
Sprühreagenzien	115
Mikrobiologische Materialien	116
Rezepturen	117
Künstliches Seewasser:	117
Spurenelement-Lösung (Hoagland 1993):	117
Stammlösung:	118
Nährmedien:	118
Stammlösungen und Medien zur Algenkultivierung:	121
Mikrobiologische und analytische Arbeitsmethoden	122
Stammhaltung und Anzucht der Streptomyceten	122
Biologisches und chemisches Screening	123
Schüttelkulturen	123
Aktivitätstests	123
Toxizitätstest	123
Ergebnisse des Vorscreenings (Bewertungsgrundlagen)	124
Stamm ANT V/2 369	127
Stamm ANT V/2 51	130
Stamm ANT V/2 517	133
Stamm ANT V/2 253	135
Stamm ANT V/2 381	137
Stamm ARK XIII/2 373	138
Stamm ARK XIII/2 437	140
Stamm ARK XIII/2 442	143
Stamm HEL 45	145
Stamm B 4481	150
Stamm B 4710	153
Stamm B 7029	154
Stamm B 6003	156

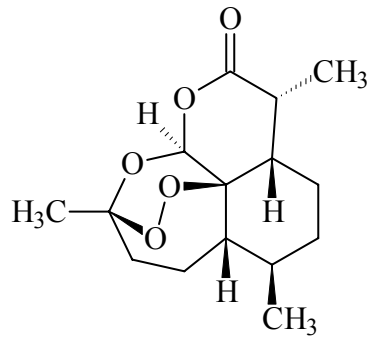
Stamm GW 1/1829	158
Stamm GW 22/1818	164
Stamm GW 5/1543	168
Stamm GW 39/1573	169
ANHANG	174
LITERATUR UND ANMERKUNGEN	177

Einleitung

Seit Jahrtausenden verwenden Menschen Naturstoffe in Form von Pflanzen- oder Tierextrakten zur Heilung von Krankheiten, für die Jagd, als Duftstoffe oder zur Färbung von Geweben. Bekannt ist das zur Jagd verwendete Pfeilgift Curare, das aus alkaloidhaltigen Extrakten der südamerikanischen Kletterpflanze *Strychnos toxifera* gewonnen wurde. In Europa und Japan wurde zum gleichen Zweck das Aconitin aus dem Blauen Eisenhut (*Aconitum napellus*) eingesetzt.^[1]

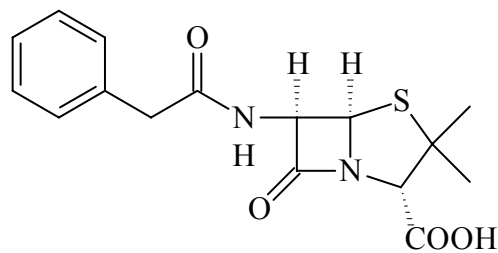
Der erste schriftliche Hinweis auf die medizinische Verwendung von Naturstoffen ist ca. 5000 Jahre alt und chinesischen Ursprungs. Dort verfügte man lange Zeit über das größte Wissen auf diesem Gebiet, und auch heute noch sind über 5000 Pflanzen als Heilmittel in Gebrauch. Von Indios aus den südamerikanischen Urwäldern ist bekannt, daß sie sich mit der chininhaltigen Rinde des Chinarindenbaumes *Cinchona officinalis* gegen Malariainfektionen schützten. Seit Jahrhunderten bedient man sich zur Bekämpfung von Herzschwäche des roten Fingerhutes (*Digitalis purpurea*), der 30 verschiedene Digitalis-Glykoside enthält. Diese erhöhen die Kontraktilität des Herzens und setzen gleichzeitig die Schlagfrequenz herab. Eines der Fingerhut-Glykoside, Digitoxin, ist in der modernen Medizin immer noch das Mittel der Wahl.^[1,2]

Vermutlich verfügen die verbliebenen Naturvölker auch heute noch über zahlreiche Kenntnisse, was die Nutzbarmachung von Pflanzen und Tieren angeht. Weil diese aber in der Regel nur mündlich an Auserwählte überliefert werden und das Interesse der modernen Medizin an der Volksmedizin lange Zeit gering war, geht immer mehr von diesem Wissen verloren. Aus diesem Grunde versuchen Botaniker in Zusammenarbeit mit Ethnologen die verwendeten Methoden und Materialien zu ergründen und zu konservieren. Im Anschluß daran ist es die Aufgabe von Chemikern, das Wirkprinzip zu entschlüsseln, indem die Inhaltsstoffe daraufhin analysiert werden. Auf diesem Weg entdeckte eine chinesische Arbeitsgruppe anhand 2000 Jahre alter Schriften das gegen Malariainfektionen wirksame Artemisinin (**1**), welches Bestandteil der damals verwendeten Pflanze *Artemisia annua* (Beifuß) ist.^[3,4]



1

Auf die Verwendung von Naturstoffen aus Mikroorganismen gibt es in der Geschichte nur wenige Hinweise. So wurde z. B. im alten Ägypten verschimmeltes Brot zur Wundbehandlung eingesetzt. Für mikrobielle Stoffwechselprodukte begann man sich erst zu interessieren, als der schottische Bakteriologe Fleming 1928 die wachstumshemmende Wirkung des Pilzes *Penicillium notatum* auf Staphylokokken entdeckte.^[5] Florey und Chain gelang 1940 erstmals die Isolierung des für die Wirkung verantwortlichen Penicillins G (**2**), und ein Jahr später behandelten sie damit die ersten Patienten mit Blutvergiftung. Alle drei Forscher bekamen für ihre Arbeiten 1945 den Nobelpreis für Medizin.^[6,7]



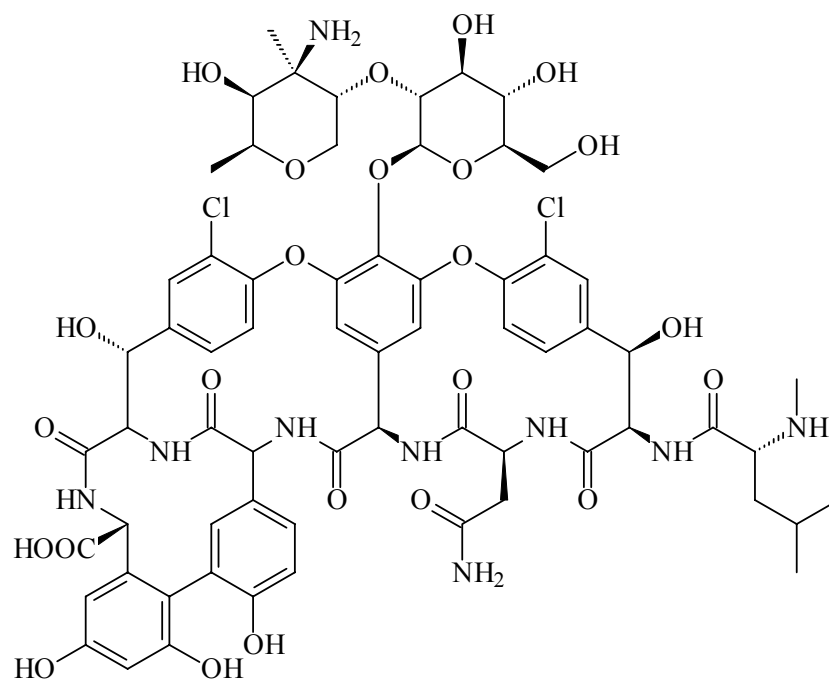
2

Penicillin bezeichnet man nach Waksman als Antibiotikum, weil es ein mikrobielles niedermolekulares (Molmasse meist $M < 2000$ Da) Stoffwechselprodukt ist, das in niedrigen Konzentrationen ($< 200 \mu\text{g/ml}$) das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmt, ohne den Produzenten selbst zu schädigen.^[8] Mittlerweile mußte diese Definition erweitert werden und umfaßt nun auch Stoffe, die zur Abtötung oder Wachstumshemmung parasitischer Zellen wie pathogener Mikroben (Bakterien, Pilze), Viren und höherer Organismen (Trypanosomen, Tumorzellen oder Parasiten) eingesetzt werden können und die aufgrund ihrer selektiven Wirkung eine sehr geringe Toxizität für den Wirtsorganismus aufweisen.^[9] Antibiotika greifen in Stoffwechsel- oder Synthesewege anderer Organismen ein. Sie können die DNA-Synthese unterbrechen oder deren Transkription stören, bestimmte Enzyme oder deren Zielmoleküle blockieren. Ein weiterer häufiger Angriffspunkt, auch für das β -Lactam Penicillin G (**2**), ist die Zellwandsynthese von Bakterien.

Durch den Einsatz von Antibiotika wurden nahezu alle Arten von Infektionen behandelbar. Doch daß damit der Kampf gegen Keime nicht gewonnen war, ahnte Fleming schon 1945. Denn er hatte neben der spezifischen Resistenz, die jede Gattung gegenüber bestimmten antibiotischen Wirkstoffklassen hat, beobachtet, daß Mikroorganismen ihre Widerstandskraft auch in kurzer Zeit *erwerben* können.^[6] Dabei findet einerseits ein Austausch von Erbinformation durch die Übertragung von Plasmiden statt, den man als horizontalen Gentransfer bezeichnet und der auch von Pflanzen ausgehen kann. Werden die „richtigen“ Informationen z. B. eines Resistenzgenes auf den bekämpften Organismus übertragen, verändert sich der Angriffsort des Antibiotikums derart, daß keine Blockierung oder Störung mehr möglich ist. Derselbe Effekt kann durch zufällige Mutationen eintreten, ohne daß der für die Zelle lebenswichtige Primärstoffwechsel beeinträchtigt wird. Bei einigen Bakterien, die normalerweise mit β -Lactamen bekämpft wurden, beobachtet man die Bildung des Enzyms β -Lactamase, welches die Antibiotika abbaut, bevor diese die Zelle schädigen. Dieser erworbenen Resistenz kann man glücklicherweise begegnen, indem man den Wirkstoff in Kombination mit Clavulansäure verabreicht, die wiederum das Enzym blockiert.

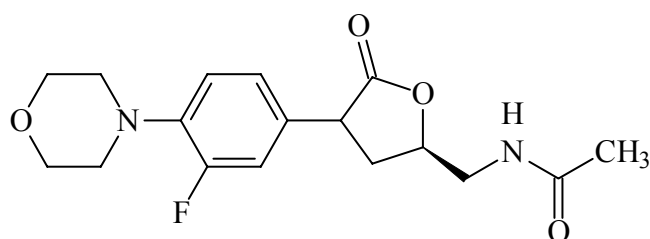
Insbesondere wurden durch die extensive Verwendung von Antibiotika in der Tierzucht und Humantherapie multiresistente Stämme herangezüchtet. Allerdings fanden CARLSON *et al.* erst kürzlich die Ausbildung von Mehrfachresistenzen auch ohne menschliches Zutun, als sie *Escherichia coli*-Bakterien, die das toxische Peptid Microcin bilden, mit Salmonellen zusammen anzüchteten. Letztere zeigten sich anschließend resistent gegen antibiotische Stoffe aus ganz unterschiedlichen Klassen.^[10]

Insbesondere in Krankenhäusern treten multiresistente Problemkeime immer gehäuft auf. Laut einer amerikanischen Studie waren 1995 11% und 1999 bereits 20% der durch *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufenen Lungenentzündungen mit den Makrolidantibiotika Erythromycin und Azithromycin nicht mehr zu kurieren.^[11] Einige *Staphylococcus aureus*- und *Enterococcus faeciae*-Arten sind sogar schon gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin (**3**) resistent. Anhand von DNA-Untersuchungen von bis zu 60 Jahre alten *Staphylococcus aureus*-Proben konnten CRISÓSTOMO *et al.* zeigen, daß diese Art geradezu spezialisiert auf den Erwerb von Resistenzen ist.^[12-14]



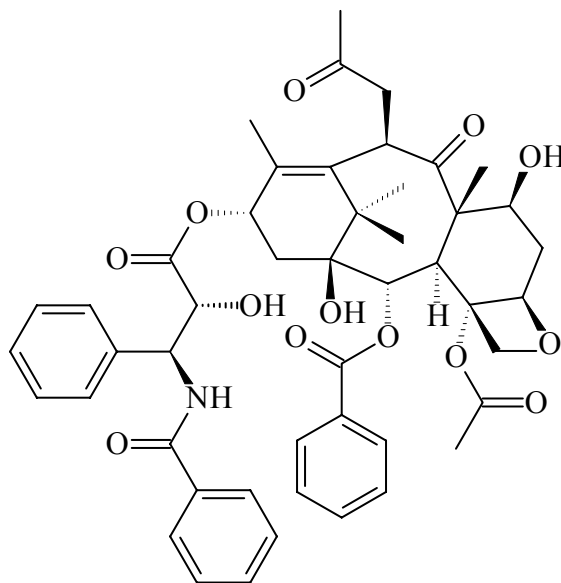
3

Für das zu einer neuen Antibiotikaklasse gehörende Syntheseprodukt Linezolid (**4**) wurde bereits ein Jahr nach der Zulassung als Medikament ein resistenter Stamm gemeldet. In einem neuen Wirkmechanismus bindet **4** an die 30S-Untereinheit bakterieller Ribosomen und verhindert die Bildung eines funktionsfähigen Initiationskomplexes, der die bakterielle Proteinsynthese einleitet.^[15]



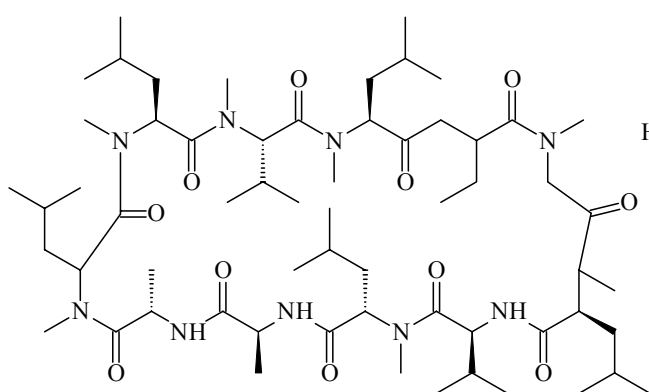
4

Die Bedeutung von antibiotischen Medikamenten hat sich in den letzten Jahren auch dadurch noch vergrößert, daß inzwischen Bakterieninfektionen als ursächlich für beispielsweise Magengeschwüre, Arteriosklerose und z. T. wahrscheinlich auch für Asthma^[16] erkannt wurden. Der große Bedarf an neuen Naturstoffen ist aber nicht nur in der Bekämpfung infektiöser Keime begründet, denn es hat sich gezeigt, daß Naturstoffe auch in anderen Bereichen Wirkung zeigen. So wird seit 1993 das aus der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxis brevifolia* isolierte Paclitaxel (**5**) erfolgreich als Antitumormittel eingesetzt, das die Vermehrung der Tumorzellen verhindert, indem es die beim Teilungszyklus entstehenden Mikrotubuli stabilisiert.^[17]

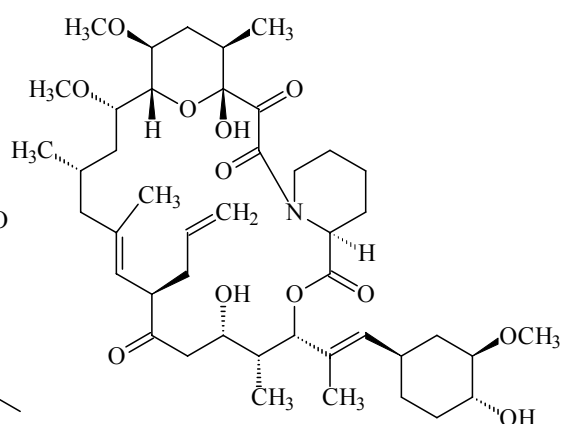


5

Die Transplantationsmedizin erst ermöglicht haben natürliche Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung, die eine Abstoßung verpflanzter Organe unterdrücken. Das erste verfügbare Medikament dieser Art war das aus dem Pilz *Tolytlocadium inflatum* isolierte Undecapeptid Cyclosporin (6).^[2] Zu den Wirkstoffen der zweiten Generation zählt das Makrolid FK-506 (7), das von dem terrestrischen Stamm *Streptomyces tsukubaensis* 9996 produziert wird und einhundertmal wirksamer als 6 ist.^[18] Beide Substanzen binden an verschiedene Immunophiline, wodurch eine Blockierung des Enzyms Calcineurin bewirkt wird. Dieses Enzym initiiert eine Kettenreaktion, an deren Ende die Bildung der für die Immunabwehr wichtigen T-Lymphozyten steht.^[19]



6



7

Selbst der von Clostridien gebildete giftigste Naturstoff Botulinustoxin wurde in leicht abgewandelter Form erfolgreich zur Blockierung von Nerven bei chronischen Schmerzen, etwa der Trigeminus-Neuralgie, eingesetzt. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Schmerzmitteln ist die nach einer Injektion mehrere Wochen andauernde Wirkung.^[20]

Aufgrund des in den letzten Jahren stark gestiegenen Wissens um biochemische Mechanismen und somit von Krankheitsursachen werden immer mehr Strategien bzw. Angriffsziele zu deren Bekämpfung entdeckt. Zusätzlich sind die Testkapazitäten im Bereich des vertikalen Screenings, d. h. der Prüfung chemischer Substanzen auf ganz spezifische Wirkungen wie beispielsweise die hochselektive Inhibition gewisser Enzyme, erheblich erweitert worden. Möglich wird dies durch eine automatisierte Probenvorbereitung mit Robotern und speziell für diesen Zweck gestaltete Testsysteme, die bei positiven und negativen Ergebnissen unterschiedliche Farben liefern und dadurch mit automatischen Erfassungssystemen ausgewertet werden können. Mit diesem High-Throughput-Screening genannten Verfahren werden innerhalb eines Jahres mehrere Millionen Einzeltests durchgeführt, so daß die Nachfrage nach neuen Testsubstanzen und insbesondere nach solchen mit neuer Leitstruktur erheblich gestiegen ist.

Unter den Ansatzpunkten, an interessierende Substanzen zu gelangen ist „Molecular modelling“ die ideale Strategie. Hierbei wird die Beschaffenheit der identifizierten Angriffspunkte im Zielmolekül mit Computern berechnet und daraus die Struktur eines optimalen Wirkstoffes abgeleitet. Die Technik befindet sich aber noch in den Anfängen. Als besonders schwierig erweist sich dabei trotz bekannter Konstitution z. B. eines Proteins die Ermittlung der tatsächlichen Konformation in der natürlichen Umgebung wie der Körperflüssigkeit.

Eine weitere Methode zur Auffindung neuer Wirkstoffe ist die kombinatorische Synthese. Bei dieser Methode werden systematisch geeignete Edukte zur Reaktion gebracht und anschließend im Produktgemisch dem Screening zugeführt. Aufgrund der eingeschränkten Variationsmöglichkeiten bleibt die strukturelle Diversität und Komplexität der Produkte hinter der von Naturstoffen deutlich zurück, woraus letztendlich ein verringertes Wirkspektrum gegenüber Zielmolekülen resultiert. In einem statistischen Vergleich der strukturellen Eigenschaften von synthetischen und natürlichen Substanzen kommen Henkel *et al.* zu dem Ergebnis, daß Naturstoffe häufiger komplexe Strukturelemente aufweisen, von denen 40 % in Syntheseprodukten gar nicht vorkommen.^[21] Daher überrascht es nicht, daß 60 % der kommerziell vertriebenen oder in letzten Prüfungen befindlichen Antitumormittel und Antibiotika natürlichen Ursprungs sind.^[3] Meist wird aber erst durch das Zusammenspiel von Synthese- und Naturstoffchemie ein optimierter Wirkstoff hervorgebracht: So konnte z. B. mittels Derivatisierung die Wasserlöslichkeit und damit auch die Effektivität der synergistisch wirkenden Antibiotika Pristinamycin und Virginiamycin erhöht werden.^[19,22] Beide wurden aus terrestrischen Streptomyceten isoliert. Diese sporenbildenden Bakterien gehören zu den Actinomyceten, die sich neben Pilzen als besonders geeignete Quelle für komplexe Naturstoffe erwiesen haben.

Warum Mikroorganismen überhaupt diese für den Primärstoffwechsel nicht benötigten Sekundärmetabolite bilden, ist noch nicht geklärt. ZÄHNER bezeichnet diesen Bereich des Stoffwechsels als „Spielwiese der Evolution“, d. h. das Biosynthesepotential eines Organismus verändert sich durch Mutationen, bis ein für den Produzenten positiver Effekt erreicht wird, zufällig.^[23] Es gibt einige Erklärungsversuche, welchen Nutzen manche dieser Stoffe für den Produzenten haben könnten:

- Der Sekundärmetabolismus dient der Entsorgung von toxischen Intermediaten oder Produkten des Primärstoffwechsels.^[24]
- Sekundärmetabolite wirken als endogene oder exogene Signalstoffe, ermöglichen also eine Art von Kommunikation.
- Sekundärmetabolite verschaffen den Produzenten durch ihre Toxizität (z. B. Antibiotika) oder auf andere Weise einen Wachstumsvorteil.

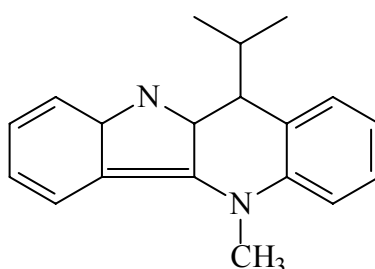
Außer der Strukturdiversität ergeben sich bei der Verwendung von Mikroorganismen noch weitere Vorteile: Hat man einen interessanten Naturstoff gefunden, so ist die Nachproduktion größerer Mengen in der Regel unproblematisch. Bei Pflanzen kann dies wie im Falle von Paclitaxel (**5**) dagegen ein großes Hindernis sein, denn die Pazifische Eibe enthält nur sehr wenig davon. Aus diesem Grund mußte man einen aufwendigen Umweg wählen, indem aus der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) das Derivat 10-Deacetylbaaccatin III isoliert und anschließend synthetisch in **5** umgewandelt wird.^[17] Im Vergleich dazu hat man die Ausbeute des Penicillin G gegenüber der von Fleming erreichten um den Faktor 40000 steigern können, indem man den Produzenten *Penicillium chrysogenum* optimierte.^[25] Es ist außerdem möglich, die relevanten Biosynthesegene gentechnisch in einen *Escherichia coli*-Stamm zu übertragen, falls der Originalstamm keine zufriedenstellenden Ausbeuten liefert.

Ein großes Problem bei der Suche nach neuen Naturstoffen ist die wiederholte Isolierung bekannter Verbindungen, dem man nur durch technische Verbesserungen bei der Wiedererkennung oder durch die Erschließung andersartiger Mikroorganismen begegnen kann.

Um bereits bekannte Naturstoffe möglichst früh zu erkennen, ist eine weitgehende Charakterisierung bereits im Produktgemisch nötig. Dazu nutzt man die hohe chromatographische Trennleistung von HPLC-Geräten in Verbindung mit UV/VIS-, NMR- oder Elektrosprayionisations-Massenspektrometern. Die dadurch gesammelten Informationen werden dann mit Hilfe von Datenbanken mit bekannten Substanzen verglichen. Diese schnellen Analysetechniken bewirken letztlich, daß mehr Zeit für die Untersuchung neuer Naturstoffe verbleibt.

Ebenfalls eine Erhöhung der Effizienz bewirkt die gesteigerte Empfindlichkeit der genannten Geräte, weil somit auch Naturstoffe untersuchbar werden, die nur in sehr geringer Menge ge-

bildet werden. So ist die Empfindlichkeit von NMR-Spektrometern durch stärkere Kryomagnete und neue Sonden deutlich erhöht worden. Z. B. wurde die Struktur von 11-Isopropylcryptolepine (**8**) bei einer Substanzmenge von 75 μg mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren aufgeklärt.^[26,27] Mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer in Verbindung mit der Analyse von Tochterionen gelang ERHARD *et al.* die Charakterisierung polarer Substanzen direkt aus Bakterienzellen.^[28] Eine weitere wichtige Innovation ist die Synchrotron-Massenspektrometrie, mit der die Meßgenauigkeit bei der Massenbestimmung dramatisch erhöht wird.

**8**

Die Zahl der Metabolite in der Natur ist begrenzt, die Auswahl von Neuentdeckungen pro Jahr nimmt dadurch kontinuierlich ab. Demonstrieren läßt sich dies an den Erstbeschreibungen von Sekundärstoffen aus terrestrischen Mikroorganismen, die nach einer Phase exponentiellen Wachstums nun einem Grenzwert zustreben (s. Abbildung 1).

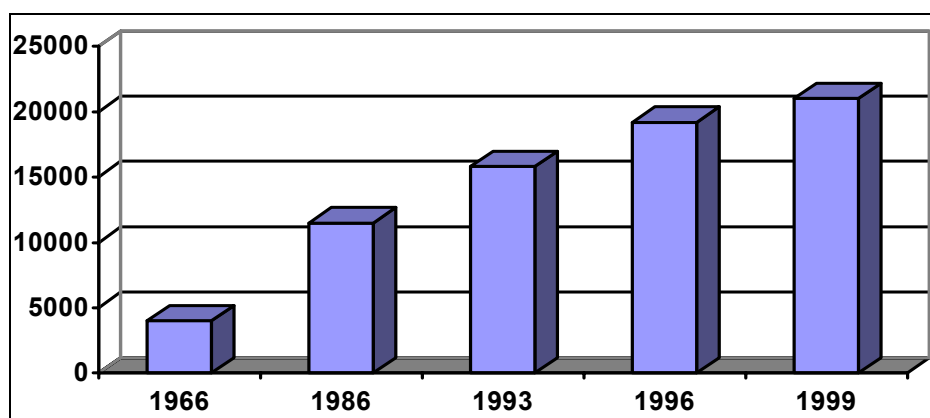
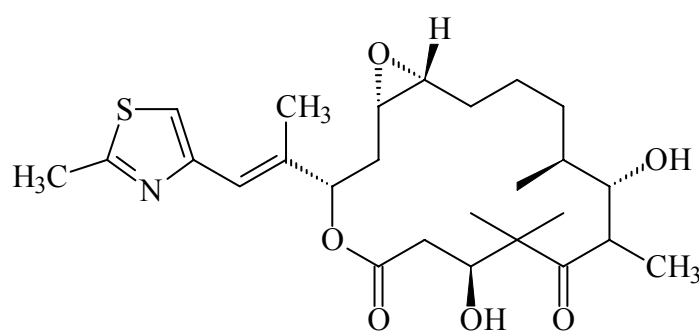


Abbildung 1: Zeitliche Entwicklung der Entdeckung neuer Naturstoffe aus terrestrischen Mikroorganismen

Aus diesem Grunde müssen entweder die Kulturbedingungen oder der Organismus selbst verändert oder neuartige Naturstoffquellen erschlossen werden. Im günstigsten Falle kann es ausreichen, die Kultivierungsbedingungen bei der Anzucht zu verändern, um andere Sekundärmetabolite zu erhalten. Diese Strategie wurde von Zeeck als OSMAC-Methode (One

Strain / Many Compounds) bezeichnet.^[29] Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Organismen gentechnisch zu verändern.

Schließlich bleibt noch die Erforschung neuartiger Produzenten. Das können Mikroorganismen einer neuen Gattung oder Art sein, die sich an einen neuen ungewöhnlichen Lebensraum angepasst haben und sich von bekannten Stämmen mehr oder weniger stark unterscheiden. Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel für das Potential neuer Gattungen sind die Myxobakterien, aus denen eine Vielzahl neuer Naturstoffe isoliert wurden. Darunter befindet sich auch Epothilon A (**9**), das in einer dem Paclitaxel (**5**) ähnlichen Weise die Proliferation von Tumorzellen verhindert, dabei aber einhundertmal wirksamer ist und außerdem auch Zellen angreift, die gegen **5** unempfindlich sind.^[30-32]



9

Die Schwierigkeiten bestehen nicht nur in dem Auffinden derartiger Organismen, sondern auch darin, diese kultivieren zu können. Dies zeigt sich besonders deutlich bei dem Versuch, die nur zu einem Anteil von ca. 0.1 – 1 % in Kultur zu bringenden marinen Mikroorganismen zu erforschen. Doch der Aufwand lohnt sich, denn wie aus Abbildung 2 deutlich wird, steigt die Zahl der neuen Naturstoffe aus marinen Quellen derzeit fast exponentiell an.

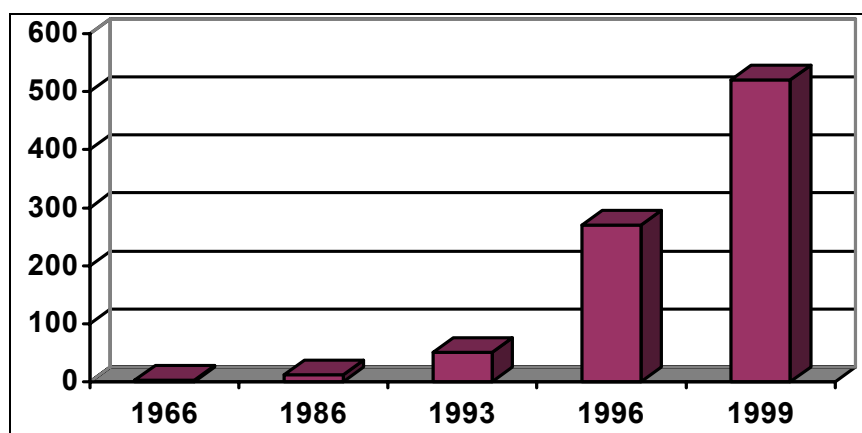
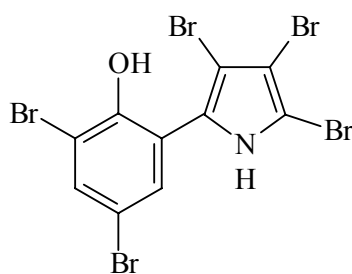
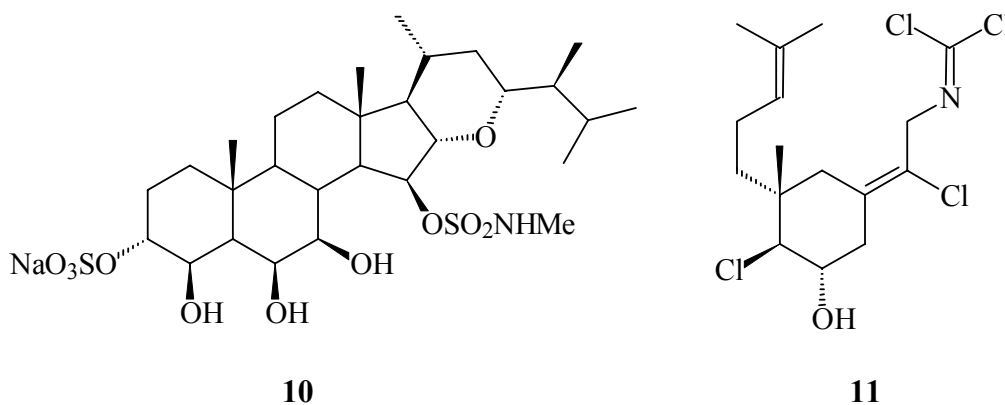
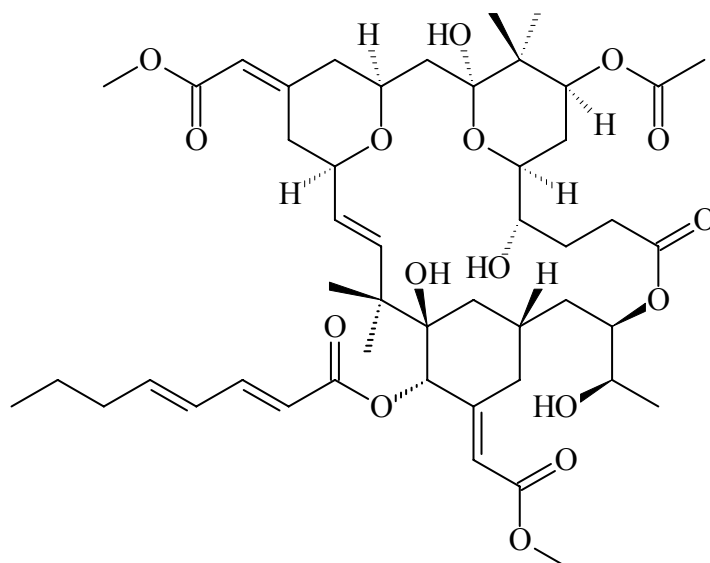


Abbildung 2: Zeitliche Entwicklung der publizierten Naturstoffe aus marinen Mikroorganismen

Hinzu kommt, daß die Metabolite mariner Organismen ungewöhnliche Strukturelemente aufweisen, die bei terrestrischen Produzenten noch nicht gefunden wurden: dies ist der Fall bei dem von QURESHI *et al.* isolierten Haplosamate A (**10**), das eine Sulfonamid-Gruppe enthält, und dem von WRATTEN *et al.* entdeckten polyhalogenierten Carbimid **11**.^[33,34] Beide Metabolite sind aus marinen Pilzen isoliert worden. Weitere charakteristische Gruppen sind Isonitrile und Isothiocyanate. Für den mehrfachen Einbau von Halogenen gibt es bei Naturstoffen marinen Ursprungs zahlreiche Beispiele. Eins davon ist das in unserer Gruppe biosynthetisch näher untersuchte Pentabrompseudilin (**12**) aus *Alteromonas luteoviolaceus*.^[35,36]

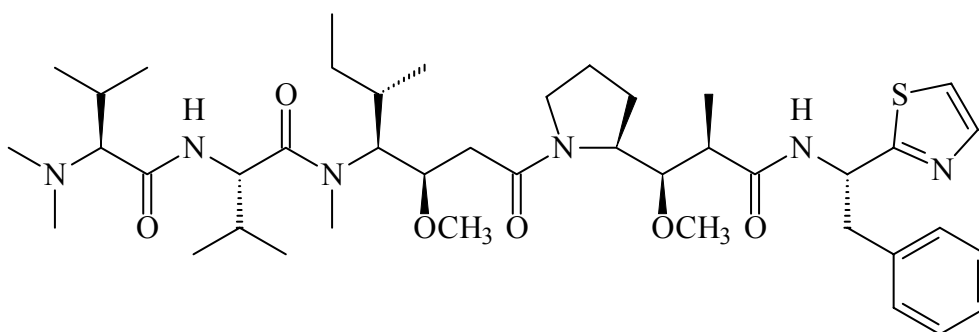


Bisher ist zwar bis auf Cephalosporin C aus *Acremonium chrysogenum* noch kein niedermolekularer Naturstoff marinen Ursprungs medizinisch verwertet worden, aber es befinden sich einige potente Kandidaten in der klinischen Prüfung. Das potentielle Antitumormittel Bryostatin I ist aus dem Bryozoon *Bugula neritina* isoliert und durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt worden.^[37]



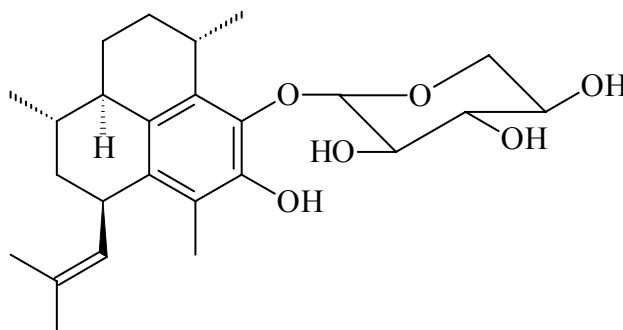
13

Das Peptid Dolastatin 10 (**14**) wurde von PETTIT et al. aus dem Seehasen *Dolabella auricularia* isoliert und wird ebenfalls wegen seiner Wirkung gegen Tumorzellen geprüft.^[38]



14

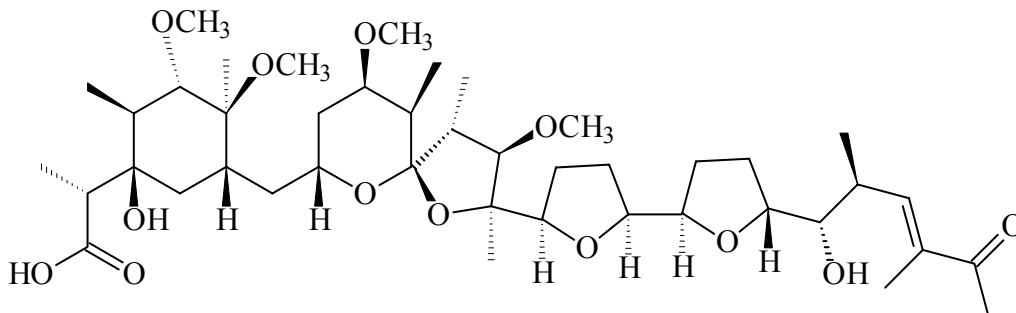
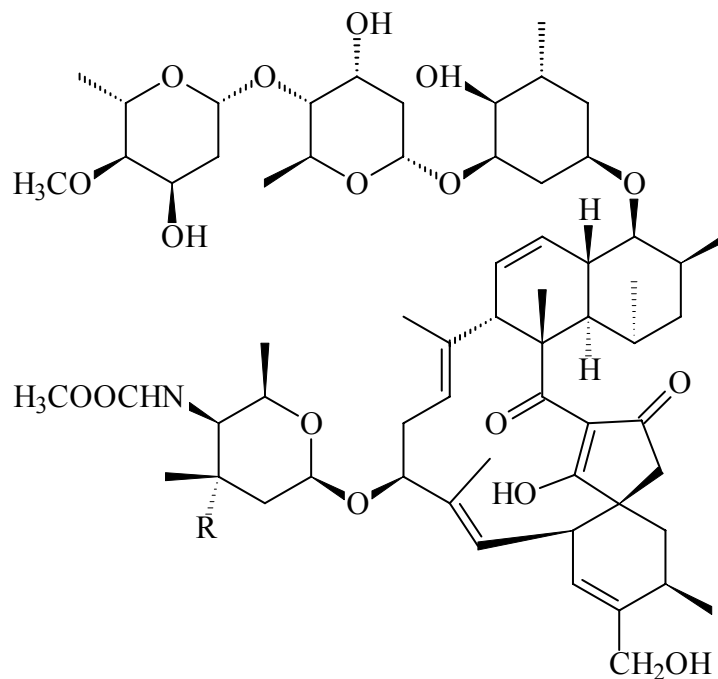
Aus der Koralle *Pseudopterogorgia elisabethae* wurde das entzündungshemmende Pseudopterosin A (**15**) isoliert.^[39]



15

Gegenstand aktueller Forschung ist die Klärung der Frage, ob diese Substanzen von dem höheren Organismus oder von symbiontischen Bakterien gebildet werden. Von Schwämmen ist bekannt, daß bis zu 40 % ihrer Zellmasse aus Bakterien bestehen können.

Von den in letzter Zeit isolierten strukturell interessanten Naturstoffen aus marinen Actinomyceten sind beispielsweise der pentacyclische Polyether Arenaric Acid (**16**) und die antiinflammatorisch wirkenden Makrolide Lobophorin A (**17a**) und B (**17b**) zu nennen.^[40,41]

**16****17a** : R = NH₂**17b** : R = NO₂

Wie die genannten Beispiele belegen, enthält der marine Lebensraum eine Vielzahl an interessanten Produzenten, deren Erforschung dringend benötigte Naturstoffe mit neuartigen komplexen Strukturen hervorbringt. Die Beispiele haben gezeigt, daß Mikroorganismen aus marinen Habitaten besonders leistungsfähig sind. Die Suche nach neuen Naturstoffen kann

sich nun auf die bereits als ergiebig erkannten Produzenten konzentrieren, oder mit neuen, noch nicht erforschten Habitaten befassen. Hier bieten sich besonders Extrembereiche an: z. B. Mikroorganismen, die in heißen Quellen siedeln, an hohen Druck adaptiert (Barophile), halophil oder kälteangepaßt sind. Besonders über den Sekundärstoffwechsel der letzteren gibt es in der zugänglichen chemischen Literatur bisher kaum Informationen. Daher war von besonderem Interesse, ob diese Organismen als Quelle für neue komplexe Naturstoffe dienen können. Außerdem sind Mikrobiologen aber auch an bekannten niedermolekularen Metaboliten aus Psychrophilen interessiert, weil diese Aufschluß über die biochemische Adaption der Organismen an ihr Habitat geben könnten. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes sollten in dieser Arbeit deshalb die Stoffwechselprodukte von bisher kaum untersuchten psychrophilen Meereisbakterien aus arktischen und antarktischen Gebieten erforscht werden.

Untersuchungen an arktischen und antarktischen Meereisbakterien

Die Erforschung extremophiler Mikroorganismen begann im Jahre 1882, als CERTES in Meeresstiefen bis 5100 m nach Mikroorganismen suchte, die unter den dort herrschenden Drücken existieren konnten. Er vermutete sie dort, weil bis dahin nie organisches Material wie z. B. Tierkadaver am Meeresgrund gefunden worden war. CERTES folgerte daraus, daß im tiefen Meer eine Zersetzung durch barophile Mikroorganismen stattfindet, was er durch entsprechende Isolate auch belegen konnte. Inzwischen weiß man, daß sogar im 10500 m tiefen Marianengraben eine Lebensgemeinschaft aus mikrobiellen und höheren Organismen etabliert ist.

Die Entdeckung thermophiler Bakterien wurde erst durch einen Paradigmenwechsel möglich, den der Amerikaner THOMAS D. BROCK 1966 einleitete. Bei der Untersuchung von heißen Quellen im Yellowstone-Nationalpark bemerkte der Biologe Bakterienkolonien, die er nur oberhalb von 60 °C in Laborkulturen halten konnte. Bis zu diesem Zeitpunkt waren Mikroorganismen nur in einem Temperaturbereich von 20 – 55 °C kultiviert worden, weil man es nicht für möglich hielt, daß sich Mikroorganismen oberhalb davon noch entwickeln können. Für diese neue als Hyperthermophile bezeichnete Gruppe findet man in der Regel die besten Wachstumsbedingungen zwischen 80 und 100 °C. Das von BROCK isolierte hyperthermophile Bakterium *Thermus aquaticus* kann außerdem wie viele andere unter 60 °C nicht mehr existieren und wäre somit ohne veränderte Kultivierungsbedingungen nicht entdeckt worden. BROCK eröffnete damit nicht nur einen stark expandierenden Zweig der Mikrobiologie, sondern isolierte zudem noch aus *Thermus aquaticus* das Enzym taq-Polymerase, das heute zur Klonierung von DNA in der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt wird und zu den derzeit meistverkauften Biochemikalien gehört.

Den Hitzerekord unter den Hyperthermophilen hält zur Zeit mit 113 °C *Pyrolobus fumarii*. Die biochemische Grundlage für das Überleben bei solchen Temperaturen bilden Hitzeschockproteine, sogenannte Chaperone, und Streßproteine. Beide schirmen die von der Zelle neu produzierten Proteine so von der Umgebung ab, daß sie sich in der vorgesehenen Weise falten und nicht durch intermolekulare Wechselwirkungen mit benachbarten Proteinen Aggregate entstehen, die keine biochemische Funktion mehr ausüben können.

Die Extremophilie beschränkt sich aber nicht nur auf Temperaturresistenz und hohe Drücke: man fand obligat halophile Bakterien im Toten Meer, wo das Wasser durch einen Salzgehalt

von 28 % auf die Bakterienzellen einen enormen osmotischen Druck ausübt, den sie durch eine erhöhte Produktion organischer Moleküle ausgleichen.

Es wurden *Bacillus*-, *Chlostridium*- und *Deinococcus*-arten isoliert, die besonders austrocknungsresistente Sporen bilden. Damit können die Mikroorganismen an extrem heißen und trockenen Orten wie Wüsten überleben. Aus der Beschaffenheit der Sporen ergibt sich für *Deinococcus radiodurans* noch als Nebeneffekt eine im Vergleich zum Menschen 1000fach höhere Resistenz gegen radioaktive und ultraviolette Strahlung. Man isolierte den Stamm u. a. aus dem Abschirmwasser einer ^{60}Co -Strahlungsquelle.

Außerdem sind noch acidophile Bakterien zu nennen, die in stark saurem Medium überleben können. ZILLIG *et al.* entdeckten in Japan die Archaeobakterien *Picrophilus oshimae* und *P. torridus*, die bei 60 °C und einem pH von 0.5 am besten wachsen und selbst bei einem pH von 0 noch aktiv sind. Oberhalb von pH 3.5 werden die Organismen inaktiv und über pH 5 tritt die Zersetzung ein.^[42]

Die Adaption an solche ungewöhnlichen Lebensräume wird Mikroorganismen durch spontane Mutation und einer bei genügendem Nahrungsangebot hohen Zellteilungsrate ermöglicht, die eine schnelle Vermehrung der besser angepaßten Mutante sicherstellt. Jede dieser Veränderungen des Erbguts kann die Voraussetzung für ein Überleben unter den gegebenen Bedingungen schaffen. Induziert werden Mutationen beispielsweise durch Strahlung, Chemikalien oder horizontalen Gentransfer.^[43]

Lebensraum Meereis

In einem Anteil von 80 % der Biosphäre herrschen Temperaturen unter 5 °C.^[44] Extremophile Mikroorganismen sind auch in diesen Habitaten gefunden worden: Im arktischen und antarktischen Eis wurden Bakterien und Algen, aber auch höhere Organismen wie Krebse oder Würmer entdeckt. Anscheinend bietet Meereis gute Voraussetzungen als Lebensraum für Mikroorganismen, denn im Vergleich entsprechender Volumina ist es sogar dichter besiedelt als Nordseewasser bei einer Algenblüte.

Die Gesamtmasse des Meereises ist je nach Jahreszeit beträchtlichen Schwankungen unterworfen. In der Antarktis erreicht das Eis Dicken von etwa einem Meter und in der Arktis von mehreren Metern. Es bildet sich zunächst ein Eisbrei aus Süßwassereiskristallen, der durch Wind und Wellen anschließend zu kompakterem Eis zusammengepreßt werden. Dabei wird Salzwasser eingeschlossen, aus dem weiter Süßwasser auskristallisiert. In den abgeschlossenen Eiszwischenräumen entstehen dadurch hochgesättigte Salzlaugen, während in den haarfeinen Kanäle, wo das Wasser austauschen kann, je nach Eishöhe dem Meerwasser ähnliche

oder etwas höhere Salzkonzentrationen zu finden sind. In dem Netzwerk aus Kanälen formieren sich Lebensgemeinschaften aus Kieselalgen, Dinoflagellaten, Mikroalgen, Pilzen und Bakterien, die bei Temperaturen unter 0 °C und hohen Salzkonzentrationen existieren können. Für Algen gibt es noch eine weitere Einschränkung: Die Oberfläche des Meereises ist meistens mit einer Schneesicht bedeckt, so daß nur noch sehr wenig Licht in das Eis gelangt. Messungen haben ergeben, daß die adaptierten Algen nur 1/20 des Tageslichts zur Photosynthese benötigen. Kieselalgen besiedeln überwiegend den unteren Teil des Eises, so daß dieser stellenweise dunkelbraun gefärbt ist. In etwas geringerer Anzahl werden in der mittleren Eisschicht hauptsächlich Mikroalgen und Bakterien gefunden, während es an der Eisoberfläche nur sehr wenig Leben gibt. Die Verbreitung der Arten in arktischem und antarktischem Meereis weist deutliche Unterschiede auf. So kommen z. B. nur 50 von 500 bekannten im Eis lebenden Diatomeen in beiden Polargebieten vor.^[45]

Biochemie kälteangepaßter Mikroorganismen

Bei kälteangepaßten Mikroorganismen unterscheidet man psychrophile, die nur in einem Temperaturbereich von ca. -2 bis 20 °C existieren können, und psychrotrophe, die auch noch Temperaturen bis 40 °C überstehen. Ihr Wachstumsoptimum erreichen psychrophile Mikroorganismen zwischen 4 und 10 °C. Stämme, die am besten unter normalen (mesophilen) Bedingungen wachsen und kurzzeitige Kälteperioden schadlos überstehen, bezeichnet man als psychrotolerant.^[42,46]

Wie sehen nun die biochemischen Modifikationen in kälteangepaßten Mikroorganismen aus? Man fand in zwei daraufhin untersuchten Stämmen, *Bacillus cereus* und *Arthrobacter globiformis*, Kälteanpassungs- und Kälteschockproteine (Cold shock protein, CSP), welche die Zelle bei mildem als auch starkem Temperaturabfall vor einer Zerstörung durch innere langsame Eiskristallbildung bewahren. Dabei gibt es zwei Funktionsalternativen: Die eine Sorte der CSP verhindert das Gefrieren der Zellflüssigkeit, indem sie durch Wechselwirkung mit Kristallisationskeimen deren induktive Wirkung unterdrückt. Das bindende Motiv im Protein scheint eine Abfolge der Aminosäuren Asparaginsäure, Threonin und Leucin zu sein, die zusammen eine flache und feste Oberfläche bilden. Die anderen CSP wirken als sehr effektive Kristallisationskeime und gewährleisten dadurch ein schnelles und damit weitgehend schadloses Einfrieren des Zellinneren. Nach dem Auftauen ist die betroffene Zelle dann wieder funktionstüchtig. Ein derartiges Kälteschockprotein wurde auch aus *Pseudomonas syringae* isoliert und wird bereits dem Wasser von Schneekanonen zur künstlichen Schneeerzeugung beigemischt.^[42,46]

Eine weitere Gruppe von Proteinen verhindert die Zerstörung der Zelle durch in der Umgebung gebildete Eiskristalle. Um den externen Kristallisationsprozeß zu stoppen, werden diese sogenannten Frostschutzproteine (Antifrost protein, AFP) von der Zelle nach außen abgegeben.^[46]

Außer den genannten Proteinen, welche die direkten Temperatureinflüsse auf die Zelle abwehren, müssen sich auch viele andere von denen der mesophilen Variante unterscheiden, damit die biochemischen Prozesse bei tiefen Temperaturen und somit unter geringerem Energieaufwand überhaupt ablaufen können. Denkbar ist ebenfalls, daß zu einigen Biosynthesewegen Alternativen entstanden sind, die weniger Energie benötigen oder andere Metabolite mit gleicher Wirkung bilden. Zur Klärung dieser Fragen sind bereits Untersuchungen an β -Lactamasen, α -Amylasen und Lipasen durchgeführt worden. Dabei hat man festgestellt, daß diese Enzyme eine vergleichsweise höhere Plastizität und Flexibilität besitzen, welche durch eine geringere Anzahl von intramolekularen Wechselwirkungen erreicht wird. Mit dieser Variabilität wird der erforderliche geringere Energieverbrauch erreicht, aber damit geht auch eine erhöhte Instabilität gegenüber denaturierenden Agenzien einher^[47-50]. Bei einer Protease, die aus antarktischem Krill isoliert wurde, ist aber noch eine weitere Möglichkeit gefunden worden. Das Enzym erreicht ohne Zusatz seine höchste Aktivität bei 37 °C. In Gegenwart von 2-Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken im Protein aufbricht, sinkt diese optimale Temperatur auf 20 °C und mit Propanol auf 5 °C. Ohne diese Cosubstanz arbeitet das Enzym bei dieser Temperatur 50mal langsamer.^[51]

Ein weiteres Merkmal der Kälteanpassung ist die erhöhte Membranfluidität der Zellwände. Die Acylketten der Membranlipide sind im Vergleich zu denen mesophiler Artgenossen kürzer, verzweigter und besitzen einen höheren Sättigungsgrad. Außerdem bestehen Unterschiede in der Isomerenverteilung. Diese strukturellen Veränderungen bewirken, daß die Membran bei tieferen Temperaturen in einem sogenannten fluiden Zustand verbleibt, der für die Transportfunktionen Voraussetzung ist. Die Membran eines Mesophilen würde in der Kälte bereits in einen gelartigen Zustand übergegangen sein, in dem kein Austausch von Substraten mehr stattfindet.^[52]

Biochemische Anwendungen

Die Erforschung kälteadaptierter Enzyme ist von großem kommerziellen Interesse, besonders in den Bereichen Gesundheit, Nahrungsmittelverarbeitung, Landwirtschaft, Umwelt und Biomining, womit der Abbau von Mineralien mit Hilfe von Mikroorganismen gemeint ist. Es geht dabei um einen Markt, in dem 1996 weltweit 1.5 Milliarden US\$ umgesetzt wurden. In

Japan schätzt man, die Hälfte der dort in Produktionsverfahren eingesetzten Enzyme durch kälteangepaßte ersetzen zu können.^[51]

Bei der Verwendung dieser Enzyme gibt es nicht nur den Vorteil der Energieeinsparung. Es wird außerdem möglich, die Enzyme schon durch relativ milde Temperaturen zu inaktivieren oder großtechnische Fermentationen bei so niedrigen Temperaturen durchzuführen, daß Fremdkeime keine Chance haben, sich zu entwickeln. Hinzu kommen weitere Vorteile bei ganz spezifischen Problemen, wie z. B. bei der Proteinproduktion durch *E. coli*-Hochleistungsstämme: Derzeit muß dieser Prozeß bei 37 °C durchgeführt werden, wobei allerdings ein Teil der Produkte in der Zelle Einschlußkörper bildet und damit den Ertrag mindert. Bei niedrigeren Temperaturen würden diese Einschlußkörper nicht auftreten.

Es gibt aber auch schon einige praktische Umsetzungen aus der Psychrophilen-Forschung: Eine Nitrilhydratase aus dem psychrophilen Stamm *Rhodococcus* N-774 dient zur industriellen Herstellung von Acrylamid (20.000 t/a) und R-Mandelsäure. In Waschmitteln sind bereits eine Cellulase aus einem *Bacillus*-Stamm und eine Lipase aus *Humicola lanuginosa* im Einsatz, die bei 5 °C noch 60 % ihrer maximalen Aktivität erreicht. In der Lebensmittelverarbeitung erhofft man sich, die Qualität der Produkte durch niedrigere Verarbeitungstemperaturen erhöhen zu können, denn dabei würden sicherlich mehr Geschmacksstoffe und Vitamine erhalten bleiben. Eine aus der psychrotrophen Hefe *Cryptococcus laurentii* isolierte β -Glycosidase wird zur Herstellung Lactose-armer Milch hergestellt, die für Menschen mit einem Mangel an diesem Enzym produziert wird.^[51]

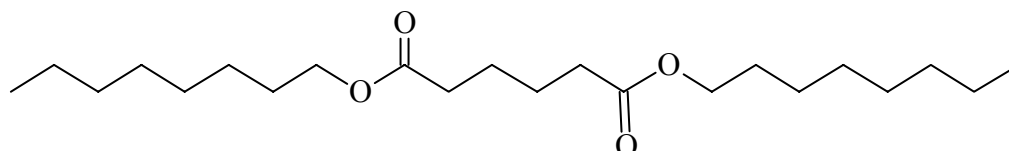
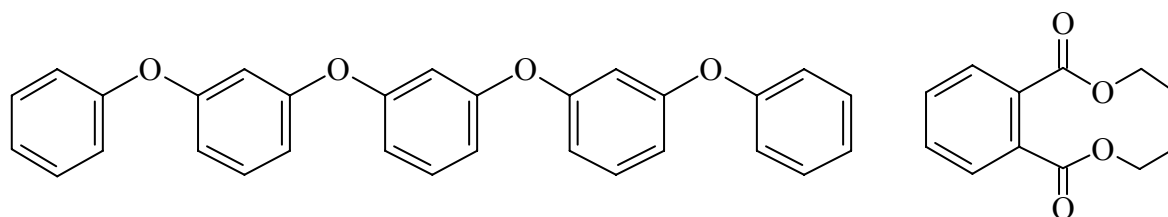
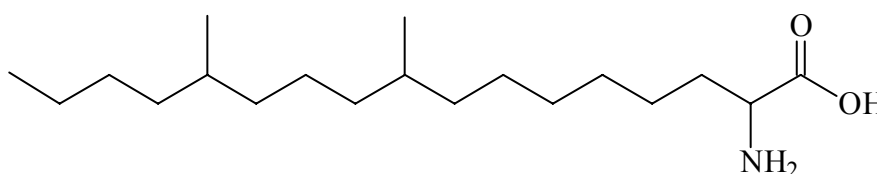
Bei der Klonierung von DNA wird eine hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase aus einem marinen psychrophilen Bakterium eingesetzt. Mit Hilfe des Enzyms werden PCR-Amplifizierungsprodukte von der natürlichen DNA unterscheidbar.^[53]

Weiterhin gibt es Bestrebungen, organisch-chemische Reaktionen biokatalytisch bei möglichst niedrigen Temperaturen durchzuführen, Zellmaterial und mikrobielle Proben mit Hilfe von Kälteschockproteinen einzufrieren und die Schmutzwasser-Reinigung in kalten Regionen zu verbessern.^[44]

Naturstoffe aus kälteangepaßten Bakterien

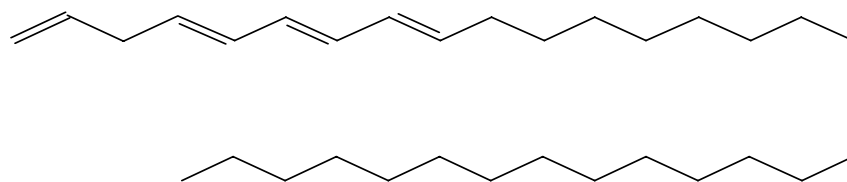
Während über die biochemischen Besonderheiten kälteadaptierter Bakterien schon einiges bekannt ist, gibt es noch nicht viele Erkenntnisse über die niedermolekularen Stoffwechselprodukte, die solche Organismen produzieren. Bisher ist insgesamt erst über neun größtenteils bekannte Naturstoffe berichtet worden, die aus drei antarktischen Bakterien und einem Streptomycceten isoliert wurden.

Von IVANOVA *et al.* wurde *Streptomyces* sp. 1010 aus einem Meeresbodensediment in der Region Livingston Island isoliert. Es handelt sich hierbei aber um einen psychrotoleranten Streptomyceten, der bei 20 – 22 °C in 96 h fermentiert wurde. Aus der Kulturbrühe konnten die drei bekannten Verbindungen Adipinsäuredioctylester (**18**), 1,3-Bis(3-phenoxyphenoxy)benzol (**19**) und Phthalsäurediethylester (**20**) und als neuer Naturstoff die α -Aminosäure 2-Amino-9,13-dimethylheptadecansäure (**21**) isoliert werden. Letztere zeigte antibiotische Aktivität gegen *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis*.^[54]

**18****19****20****21**

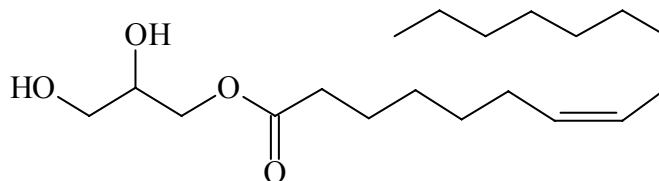
20 wird als Weichmacher in Plastikprodukten eingesetzt und ist daher möglicherweise ein Artefakt und nicht mikrobiellen Ursprungs.

Aus einem psychrotoleranten gramnegativen Bakterium, das auch aus einem antarktischen Habitat stammt, wurde ein Hentriacontanon mit dem Kohlenstoffgerüst **22** isoliert. Dieses mehrfach ungesättigte Zelllipid, mit dem zusammen noch mehrere nicht näher beschriebene ungesättigte Fettsäuren auftraten, ist für Bakterien durchaus ungewöhnlich, denn bisher fand man dort nur Lipide mit verzweigten und nahezu gesättigten C₂₂-C₃₁-Alkylketten.^[55]



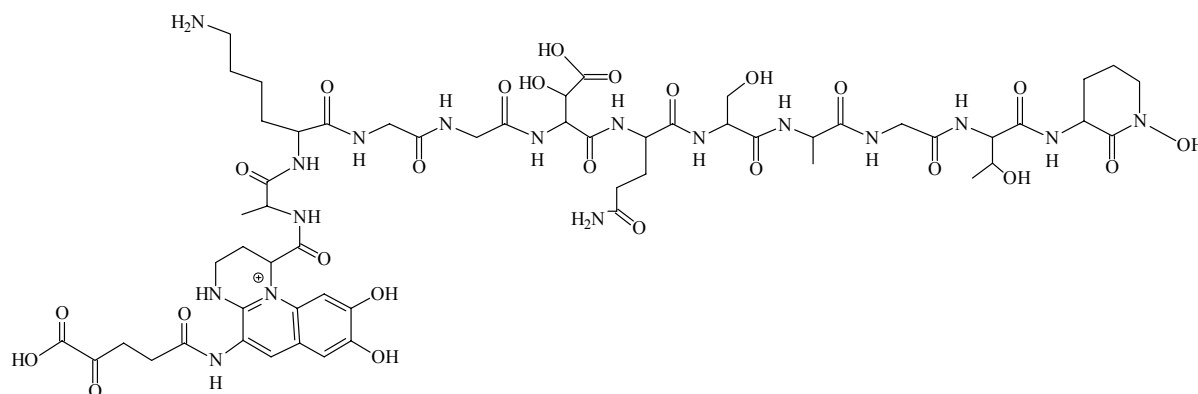
22

Der bisher unbekannte Fettsäureester Paclipid A (**23**) ist aus einem noch nicht näher bestimmten antarktischen Bakterium isoliert worden.^[56]



23

Drei neue Siderophore konnten aus *Pseudomonas fluorescens* 51W isoliert werden. Es handelt sich dabei um Pyoverdin 51W (**24**) und die sich davon ableitenden Derivate suc-Pyoverdin 51W und suca-Pyoverdin 51W.^[57,58] Als Siderophore werden niedermolekulare Sekundärmetabolite bezeichnet, die durch Chelat-Komplexbildung selektiv Eisen(III)-Ionen aufnehmen können und diese somit dem Stoffwechsel der Zelle zugänglich machen. Die Produktion kann durch Eisenmangel induziert werden. Die Pyoverdine geben den fluoreszierenden Pseudomonaden ihre gelb-grüne Farbe, wohingegen andere Siderophore häufig rotbraune Färbungen aufweisen.^[59]



24

Aufgabenstellung

Ob das seltene Auftreten von Sekundärmetaboliten typisch für kälteadaptierte Mikroorganismen ist, oder ob vielmehr ihre geringe Zahl durch die Schwierigkeiten bei Zugang und Handhabung und also durch die geringen Kenntnisse bedingt ist, war zu Beginn dieser Arbeit gänzlich unbekannt. Durch die hohe Besiedlungsdichte kann man jedoch einen entsprechenden Konkurrenzdruck erwarten, der in wärmeren Regionen gewöhnlich zu einem ausgeprägten Sekundärstoffwechsel führt.

Durch die langjährigen Kontakte zum Alfred-Wegener-Institut durch Arbeiten über marine Streptomyzeten lag es nahe, den Zugang zu Polareisbakterien durch die Fahrten der Polarstern zu nutzen und ein neues Forschungsprojekt über Meereisbakterien zu beginnen. Dies war durchaus ein Projekt mit hohem Risiko, da nichts über die Handhabung im Fermentermaßstab bekannt war und auch Voraussagen über die Erfolge der Untersuchungen unmöglich waren. Andererseits bot sich hier eine einmalige Gelegenheit, für andere Forschergruppen kaum zugängliche Organismen zu untersuchen und wissenschaftliches Neuland zu betreten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine möglichst große Zahl von Meereisbakterien in Kultur zu nehmen und ihren Sekundärstoffwechsel so weit wie möglich zu erforschen. Parallel dazu sollten die Stämme durch den Kooperationspartner mikrobiologisch charakterisiert werden.

Kultivierung der untersuchten Meereisbakterien

Auf Fahrten mit dem zum Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven gehörenden Forschungsschiff „Polarstern“ in die Arktis und Antarktis konnten von E. Helmke mikrobiologische Proben aus Schmelztümpeln und Meereis unterschiedlichen Alters gesammelt werden. Um die Mikroorganismen in allen Schichten des Eises zu untersuchen, wurden bis zu 5 m lange Bohrkerne entnommen. Die ersten Kultivierungsschritte wurden bereits auf dem Schiff durchgeführt. Kritisch für das Überleben der Mikroorganismen ist dabei das Auftauen des Eises, weil die höhere Salinität in den Kanälchen durch das auftauende Süßwassereis stark herabgesetzt wird. Dadurch wiederum baut sich ein osmotischer Druck auf, der die Zellen zum Platzen bringen kann. Erstaunlicherweise ließen sich mehr als $\frac{1}{10}$ der Meereisbakterien in Kultur nehmen. Bei anderen marinen Proben beträgt die Kultivierungsrate durchschnittlich 1 %. Probleme bereiteten jedoch die folgenden Isolierungsschritte zur Gewinnung von Reinkulturen, bei denen viele Bakterien abstarben. Insgesamt konnten ca.

400 Stämme isoliert werden, und 440 weitere antarktische Stämme befanden sich bereits in der Sammlung des Alfred-Wegener-Institutes.

Zur Bestimmung der Diversität wurden Genclusteranalysen durchgeführt. Dazu bediente man sich der DNA-Sequenzierung, mit der die Identifizierung einzelner Species durch Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen möglich ist. Die taxonomische Einordnung erfolgte durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), wobei mit Fluoreszenzmarkern verbundene Gensonden eingesetzt werden. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie auch am Ort der Probennahme einsetzbar ist. Dadurch fand man deutliche Populationsunterschiede in den verschiedenen Bereichen des Meereises: In den Schmelztümpeln auf dem Eis lebten überwiegend β -Proteobakterien, im kältesten oberen Bereich des Eises siedelten Cytophaga- und Flavobakterien und in der wieder etwas wärmeren unteren Eisschicht dominierten γ -Proteobakterien. Archaeobakterien und Streptomyceten wurden nicht gefunden, wohl aber Actinomyceten.

Eine Übersicht über die taxonomische und die 16S-rRNA-Einteilung einer Auswahl der antarktischen Bakterien aus der Sammlung ist in Abbildung 3 dargestellt.^[60]

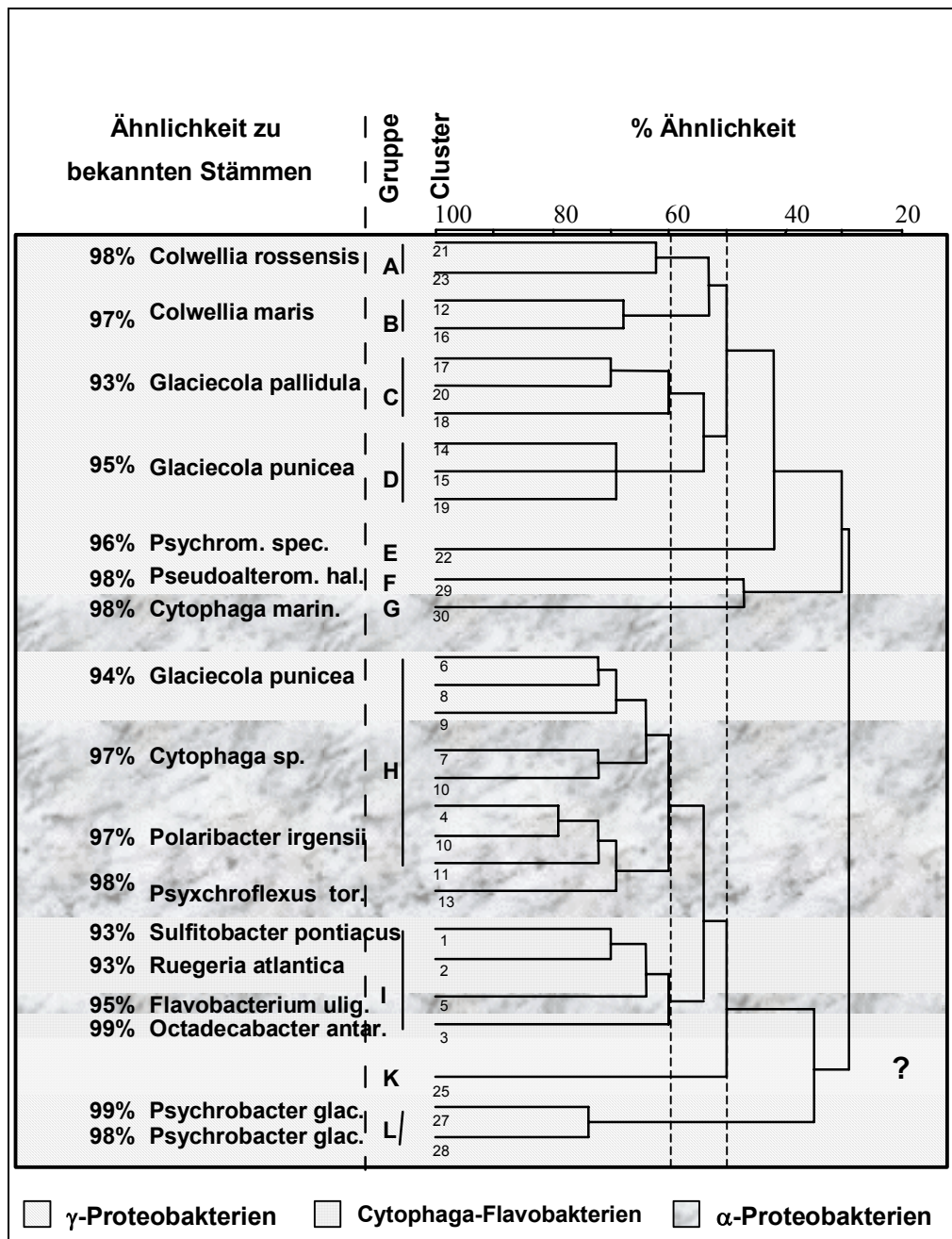


Abbildung 3: Gegenüberstellung genotypischer und numerisch taxonomischer (physiologisch/ morphologische Daten) Ergebnisse von antarktischen Meereisbakterien

Primärscreening

Zur eingehenderen chemischen Untersuchung wurden von Frau Dr. Helmke 51 Stämme zur Verfügung gestellt. Bei der Auswahl wurden insbesondere taxonomisch interessante und solche Stämme berücksichtigt, deren Extrakte eine auffällige Aktivität im Primärscreening zeigten. Für die Tests wurden in Bremerhaven angezüchtete 1-l-Kulturbrühen lyophilisiert, der

Rückstand dreimal mit Ethylacetat extrahiert und bei 40 °C i. Vak. eingeengt. Man verwendete im biologischen Screening Agarplattendiffusionstests mit *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mucor miehei*, *Candida albicans*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57), *Staphylococcus aureus* als Testkeimen und zur Prüfung auf Phycotoxizität die Algen *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus subspicatus*. Zusätzlich wurde mit dem Salinenkrebs *Artemia salina* und die Nematoden *Caenorhabditis elegans* auf cytotoxische Wirkung der Extrakte geprüft.

Ein weiteres Kriterium war das chemische Verhalten der Extraktbestandteile in Dünnschichtchromatogrammen, die man mit verschiedenen Reagenzien anfärbte. Außerdem wurden die Extrakte einer HPLC-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse des Primärscreenings sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Bei den meisten untersuchten Meereisbakterien waren die Aktivitäten der Extrakte gering bis gar nicht vorhanden, so daß die Auswahl aktiver Stämme begrenzt war. Ca. 10 % fielen durch besondere cytotoxische Aktivität auf und wurden aufgrund dessen in Verbindung mit den dünnschichtchromatographischen Ergebnissen zur weiteren Analyse ausgewählt. Mehrere der isolierten Stämme bildeten auf Agar gelbe, orangefarbene oder rote Beläge. Die Bildung von Farbstoffen bei Bakterien ist immer ein Hinweis auf einen aktiven Sekundärmetabolismus, der wahrscheinlich auch noch andere Naturstoffe hervorbringt. Deshalb wurde ein Stamm mit diesem auffälligen Phänotyp ebenfalls näher untersucht.

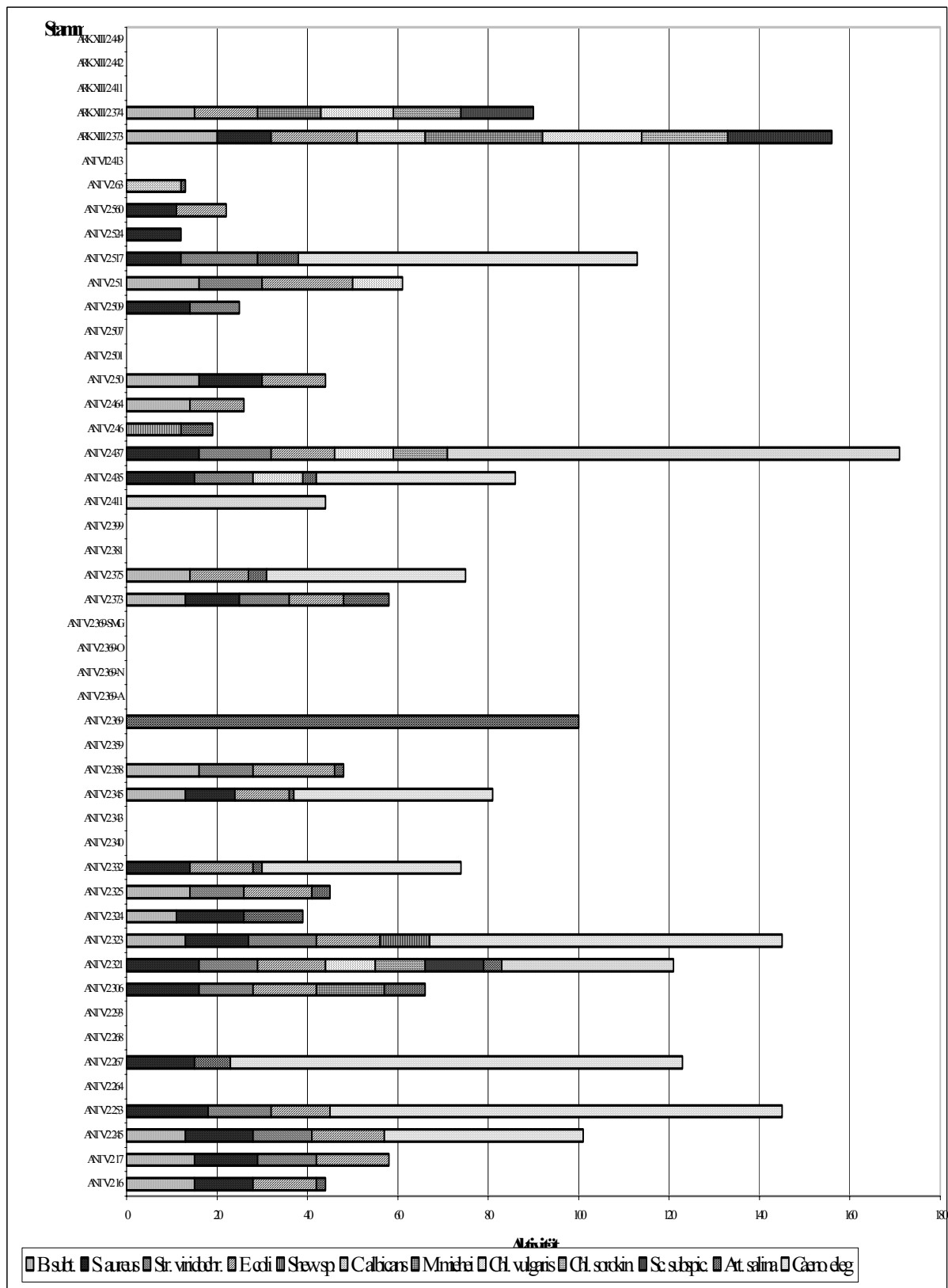


Abbildung 4: Ergebnisse des biologischen Screenings der Extrakte arktischer und antarktischer Meereisbakterien

Stamm ANT V/2 369

Zu den ersten 13 Stämmen, die von Frau Dr. Helmke vom Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven aus antarktischen Meereisproben in Reinkultur isoliert wurden, gehörte der Stamm ANT V/2 369. Dessen Extrakt zeigte keine Aktivität in den eingesetzten biologischen Testsystemen, fiel aber im chemischen Screening durch vier Zonen auf, von denen sich zwei mit Anisaldehyd/ Schwefelsäure-Sprühreagenz hellbraun anfärbten. Eine weitere Zone färbte sich in Gegenwart von Ehrlichs Reagenz violett, und eine wies UV-löschende Eigenschaften auf.

Ein weiterer ausschlaggebender Grund, diesen Stamm auszuwählen, war die für kryophile Mikroorganismen vergleichsweise gute Rohextrakt-Ausbeute von 50 mg aus einem Liter Kulturbrühe. Dies ließ erwarten, daß durch größere Fermentationen ausreichende Mengen Extrakt für die weitere Analyse bereitgestellt werden könnten.

Anzuchtversuche

Für Anzuchten des kryophilen Organismus im größeren Maßstab stand ein Kühlraum mit einer Temperatur von 4 °C zur Verfügung. Die Animpfkulturen wurden ausschließlich in Bremerhaven als Schüttelkulturen erstellt und unter ausreichender Kühlung versandt.

Die erste Fermentation erfolgte über 14 Tage in einem 20-l-Batch-Fermenter ohne pH-Regulierung bei 200 Upm in einem stärkehaltigen Komplexmedium (Medium B). Nach Extraktion der Kulturbrühe mit Ethylacetat erhielt man 203 mg eines hellgelben Rohextraktes.

Parrallel dazu wurden in Bremerhaven zwei Schüttelkulturen in natürlichem Seewasser mit jeweils 20 l Volumen (4 × 5-l-Erlenmeyerkolben) angezchtet, aus denen 240 und 283 mg Extrakt auf gleiche Weise gewonnen wurden. Obwohl alle Fermentationen nahezu die gleiche Rohextrakt-Ausbeute lieferten, zeigte der chemische Vergleich der Extrakte im Dünnschichtchromatogramm, daß die Zusammensetzung der Bremerhavener Extrakte gut übereinstimmte, während der in Göttingen hergestellte Extrakt zwar auch vergleichbare Zonen, jedoch in deutlich geringerer Intensität enthielt. Deshalb wurden nur die Bremerhavener Extrakte vereinigt, die nach dem Entfetten die für eine Analyse sehr geringe Menge von 284 mg methanolischem Extrakt lieferten. Um hieraus für die Strukturaufklärung noch ausreichende

Mengen an Substanzen – benötigt wird mind. 1 mg – gewinnen zu können, wurde das Gemisch durch ressourcenschonende Säulenchromatographie an Sephadex und durch präparative HPLC aufgetrennt (s. Abb. 5). Aus der zweiten Fraktion wurden vier weiße Feststoffe und aus der vierten Fraktion eine gelbe Substanz isoliert.

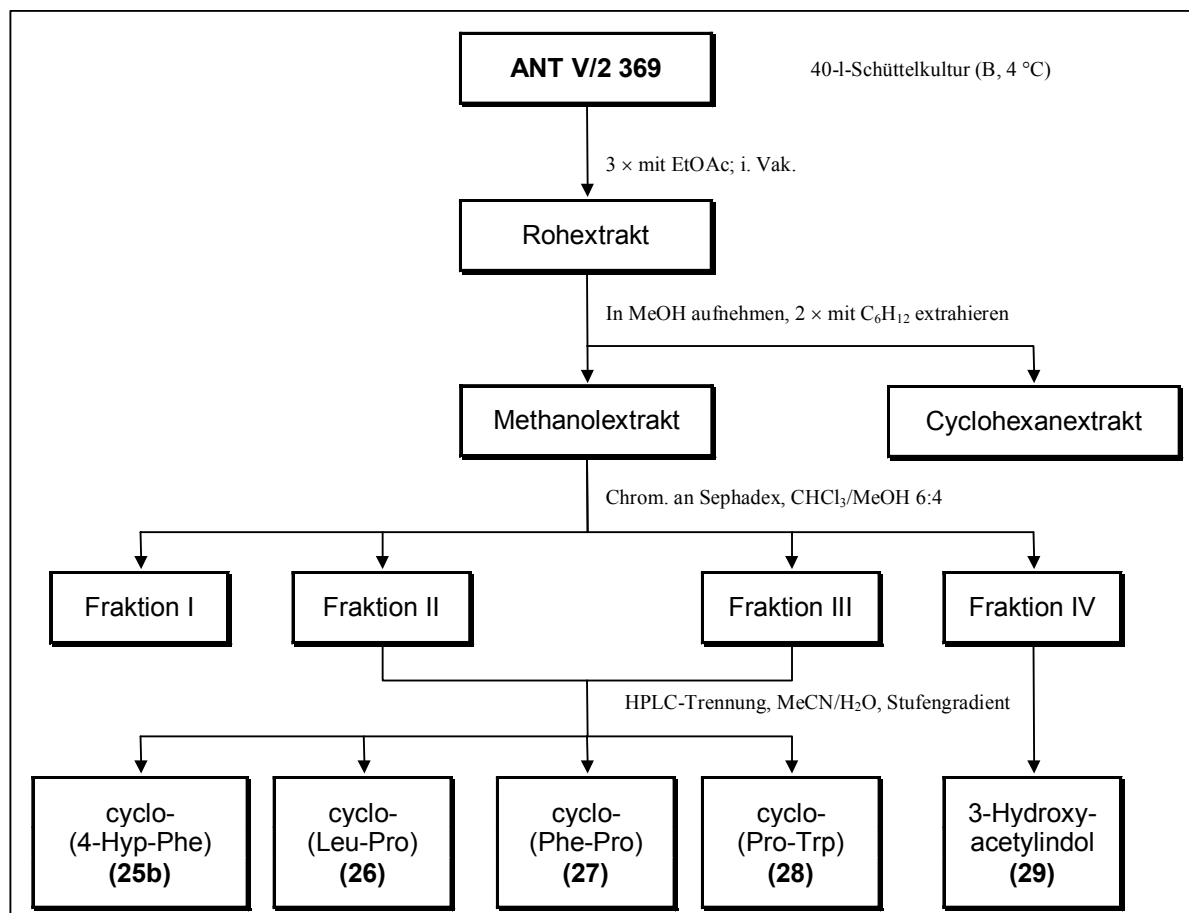


Abbildung 5 : Aufarbeitungsschema des Extraktes von ANT V/2 369

cyclo(Pro-Trp)

Die Protonenspektren der aus Fraktion IV isolierten Substanzen beinhalteten alle sehr ähnliche Signalmuster im für Peptide typischen Bereich von $\delta = 4.4 - 3.5$. Oberhalb von $\delta = 4.0$ zeigten die Spektren ein zum Dublett vom Dublett aufgespaltenes Signal und ein Triplett. Unterhalb von $\delta = 4.0$ erschien ein Multiplettsignal. Weitere teilweise identische Multipletts erschienen bei $\delta = 2.4 - 1.6$. Ein weiteres Indiz für strukturelle Ähnlichkeiten der vier Verbindungen lieferten die am HPLC-Diodenarraydetektor aufgenommenen UV-Spektren.

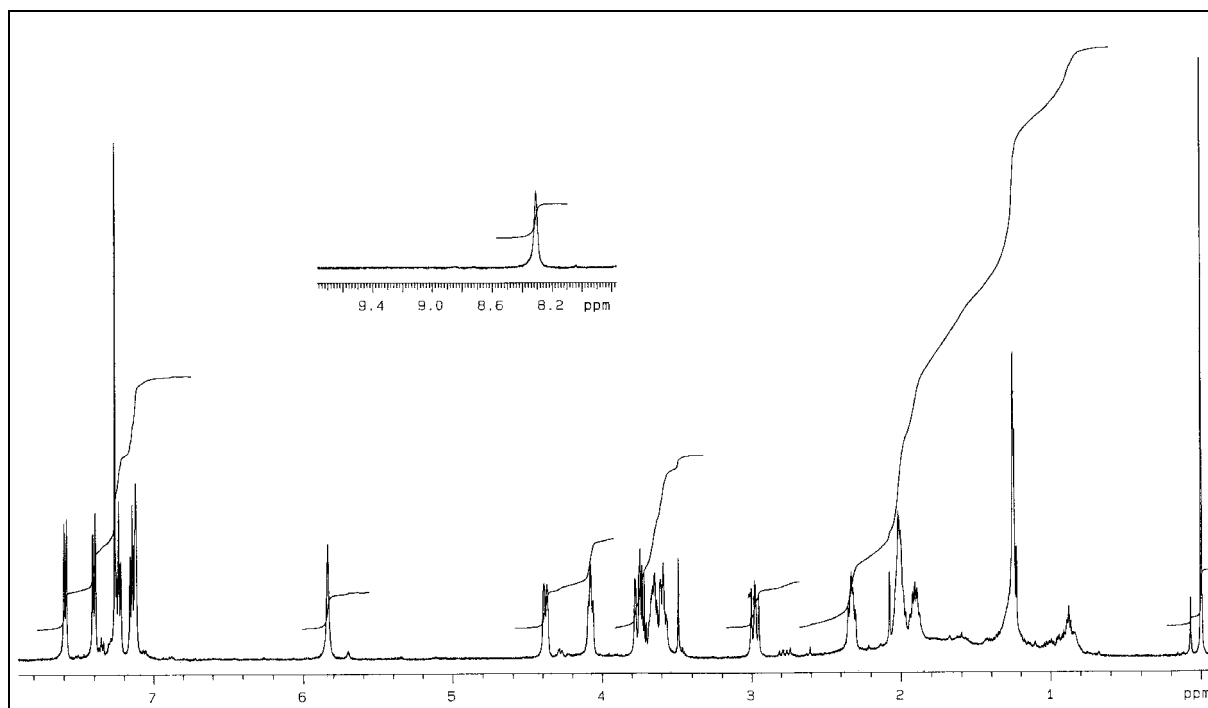
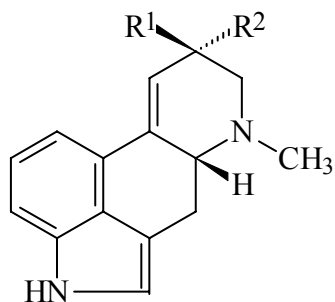


Abbildung 6 : ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von *cyclo*(Pro-Trp) (**28**) in CDCl_3

Das letzte der vier Isolate zeigte im ^1H -NMR-Spektrum zusätzliche Signale im aromatischen Bereich, deren Aufspaltung auf einen 1,2-disubstituierten Aromaten hinwies. Ein durch EI-MS erzeugtes Fragment von 130 Da deutete auf ein Indolderivat hin. Die Molmasse der gesuchten Verbindung betrug 283 Da. Eine Suche in der Naturstoff-Datenbank AntiBase^[61] lieferte mit diesen Informationen fünf Strukturen. Davon konnten zwei ausgeschlossen werden, weil sie ein bzw. zwei olefinische Protonen enthielten. Im ^1H -NMR-Spektrum hätten deren scharfe Signale im Bereich von $\delta = 5.0 - 6.5$ erscheinen müssen.

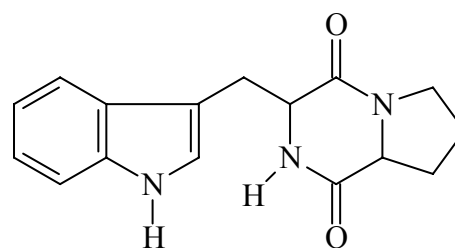
Die Stereoisomeren 8-Hydroxyergin (**30a**) und 8-Hydroxyerginin (**30b**) konnten ebenfalls nicht der vorliegenden Verbindung entsprechen, weil die fünf aromatischen Protonen zwei Singulett-, zwei Dublett- und ein Triplett-Signal lieferten, ein Singulett der am Stickstoff gebundenen Methylgruppe fehlte und die Anzahl der anderen aliphatischen Protonen zu gering war.

Die einzige Struktur, die alle Kriterien des ^1H -NMR-Spektrums erfüllte, war *cyclo*(Pro-Trp) (**28**). Außerdem ließ sich die Substanz mit Ehrlichs Reagenz violett anfärben, wie es für Indol enthaltende Stoffe typisch ist. Da aber keine Vergleichsspektren zur Verfügung standen und mehrere Multiplettsignale im ^1H -NMR-Spektrum auch andere Lösungen denkbar erscheinen ließen, wurde das Ergebnis mittels HMQC- und HMBC-NMR-Spektren bestätigt.



30a : $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{OH}$

30b : $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{CONH}_2$



28

cyclo(Leu-Pro)

Mit der Aufklärung von **28** konnten zwei weitere Substanzen zügig identifiziert werden, da sie sich nur im Rest der ersten Aminosäure davon unterscheiden. Die zweite aus Fraktion IV isolierte Substanz zeigte im Aromatenbereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums keine Signale. Dafür waren zwei jeweils zum Dublett aufgespaltene Signale bei $\delta = 1.0$ zu sehen, was auf eine Isopropylgruppe hindeutete. Außerdem enthielten die Multipletts bei $\delta = 2.4 - 1.4$ drei zusätzliche Protonen.

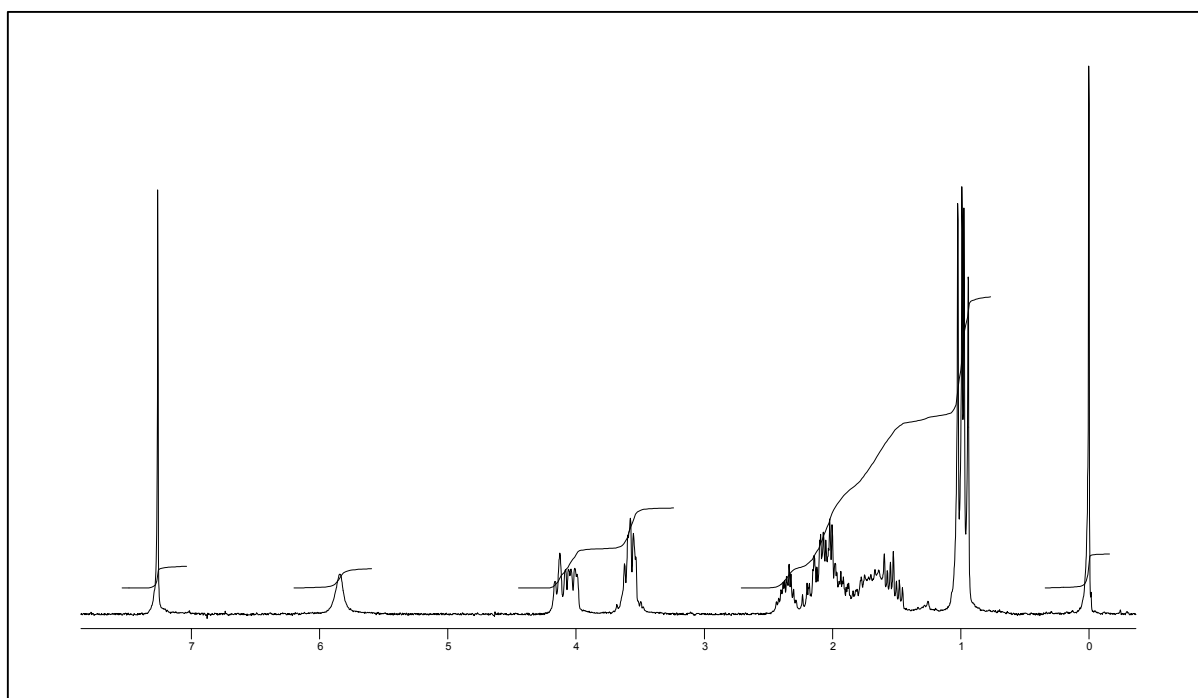
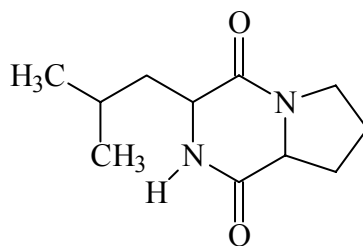


Abbildung 7: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (200 MHz) von *cyclo(Leu-Pro)* (**26**) in CDCl_3

Zusammen mit einer durch DCI-MS bestimmten Masse von 262 Da ergab sich bei der Recherche in AntiBase als wahrscheinlichste Lösung *cyclo(Leu-Pro)* (**26**), was durch den Vergleich mit einem vorhandenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt wurde.



26

Diketopiperazine weisen zwei Chiralitätszentren auf und können demzufolge in vier stereoisomeren Formen vorliegen. Bei den während dieser Arbeit isolierten Diketopiperazinen wurde auf eine Aufklärung der Stereochemie verzichtet, weil diese Verbindungen als Naturstoffe schon lange bekannt und hinreichend untersucht worden sind. Daher waren keine neuen Erkenntnisse zu erwarten.

cyclo(Phe-Pro)

Die dritte Verbindung zeigte zusätzlich zum charakteristischen ^1H -Signalmuster der Diketopiperazine noch eine Methylengruppe bei $\delta = 2.78$ und 3.62 , die aufgrund der Signalaufspaltung zu einem ABX-System gehören mußte, und ein Multiplett bei $\delta = 7.31$, das von den fünf Protonen eines Phenylringes gebildet wurde.

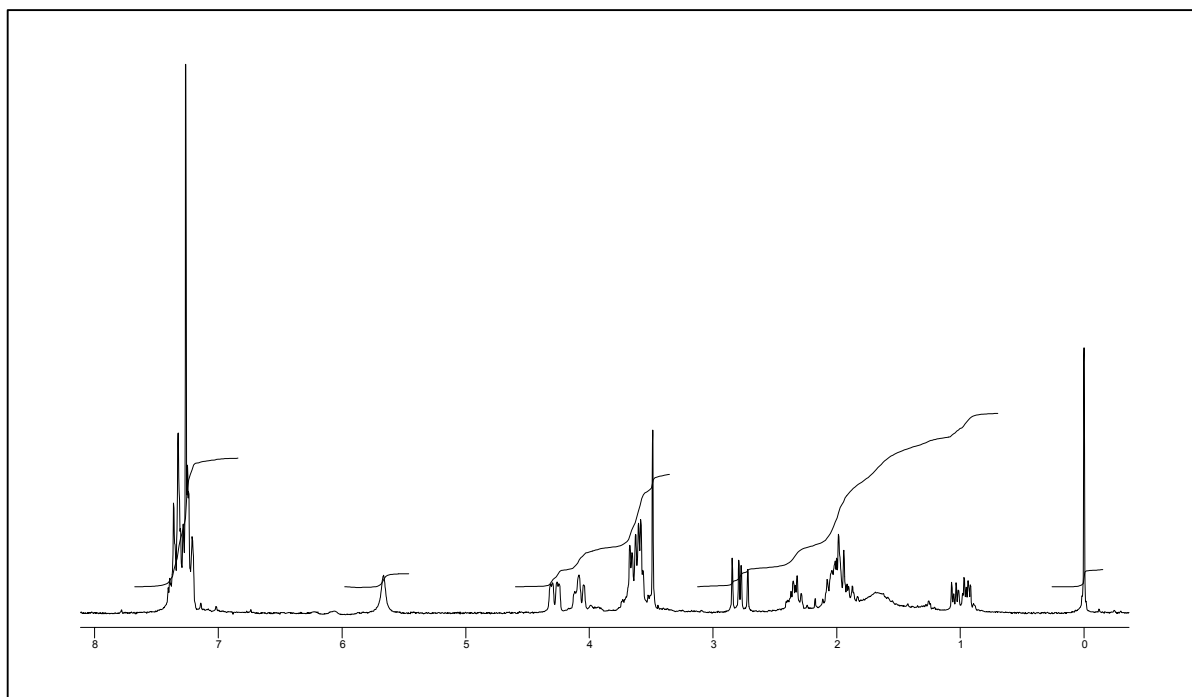
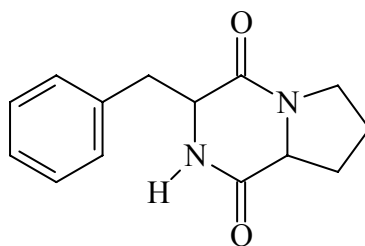


Abbildung 8: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von *cyclo(Phe-Pro)* (**27**) in CDCl_3

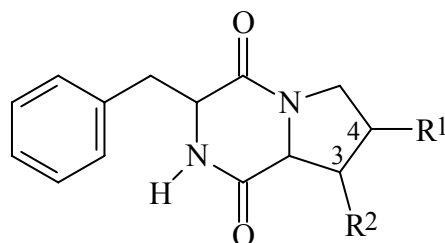
Daß es sich hierbei um *cyclo(Phe-Pro)* (**27**) handeln mußte, wurde durch die Molmasse (EI-MS) und den Vergleich mit einem Referenzspektrum aus der Sammlung verifiziert.



27

cyclo(4-Hyp-Phe)

Im Unterschied zu **27** fehlten der verbliebenen Substanz im Multiplett des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bei $\delta = 2.00$ zwei Protonen. Stattdessen kam ein weiteres Signal der Intensität 1 bei $\delta = 4.47$ hinzu. Folglich war eine der Methylengruppen im Prolin so verändert, daß eines der Protonen durch einen elektronenziehenden Substituenten ersetzt worden war. Aufgrund der Verschiebung des Protonensignals und einer Massendifferenz von 16 Da zu **27** konnte auf eine Hydroxygruppe geschlossen werden. Schließlich mußte noch die Frage geklärt werden, ob es sich bei der Verbindung um *cyclo(3-Hyp-Phe)* (**25a**) oder *cyclo(4-Hyp-Phe)* (**25b**) handelte.



25a: $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{H}$

25b: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{OH}$

Aus den Signalen der relevanten Protonen ließ sich die Antwort nicht ermitteln, weil die Auflösung des Spektrums nicht alle Kopplungen widerspiegelte. Jedoch würde im Falle einer Substitution in Position 3 das 2-H-Signal nur zu einem Dublett aufspalten. Tatsächlich zu sehen ist ein Dublett vom Dublett, d. h. das 2-Proton steht in Nachbarschaft zu zwei Protonen, die nur an C-3 gebunden sein können. Daraus folgt letztendlich, daß **25a** die korrekte Struktur ist.

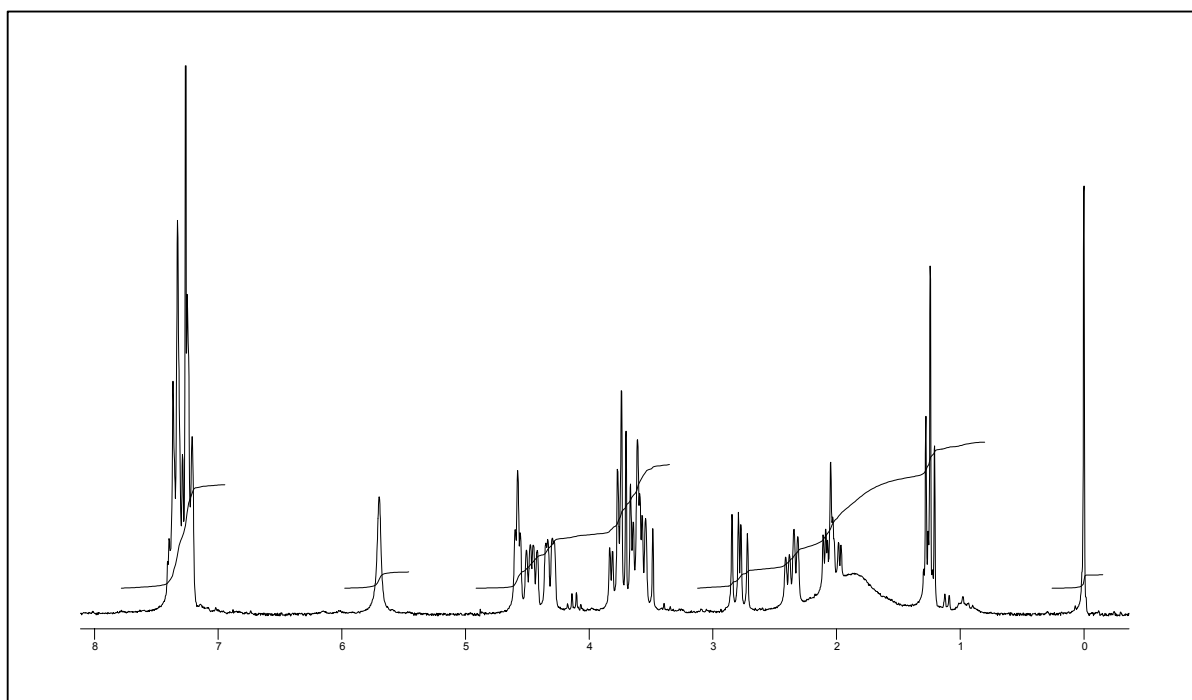
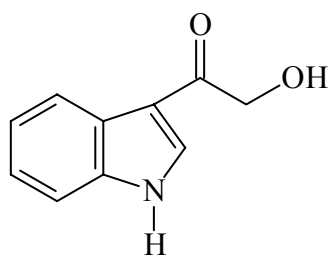


Abbildung 9: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von *cyclo*(4-Hyp-Phe) (**25b**) in CDCl_3

Das DL-Stereoisomer dieser Verbindung wurde 1998 erstmalig aus der Hefe *Aureobasidium pullulans* isoliert, die man auf einem marinen Pilz vor der japanischen Insel Okinawa fand.^[62] Entsprechende Diketopiperazine mit L-Konfiguration des Prolins sind aus den Hautzellen von Kaninchen gewonnen worden.^[63]

3-Hydroxyacetylindol

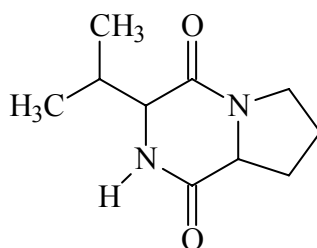
Der aus Fraktion IV isolierte gelbe Feststoff zeigte im aromatischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums das typische Kopplungsmuster für Indolderivate, die eine Carbonylgruppe an C-3 gebunden enthalten: Zusätzlich beinhaltete das Spektrum ein von zwei Protonen hervorgerufenen Dublett bei $\delta = 4.69$, das nach einem H/D-Austausch zum Singulett wurde, und ein austauschbares Triplett der Intensität 1 bei $\delta = 3.84$. Offensichtlich lag hier eine Methylengruppe vor, deren Signal durch den Einfluß zweier elektronenziehender Substituenten tieffeldverschoben wurde. Die Signalaufspaltung verriet, daß nur ein acides Proton als Kopplungspartner interagierte. Dadurch gelangte man zu der Annahme, daß es sich bei der Verbindung wahrscheinlich um 3-Hydroxyacetylindol (**29**) handelte. Durch den Vergleich mit Literaturdaten und durch die Molmasse (DCI-MS) wurde das Ergebnis bestätigt.^[64]



29

cyclo(Pro-Val)

Nach Entfettung des Fermenter-Rohextraktes mit Cyclohexan und präparativer HPLC-Trennung der Methanol-Fraktion konnte ein weißer Feststoff isoliert werden, dessen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sehr große Ähnlichkeit zu dem von *cyclo(Leu-Pro)* (**26**) aufwies. In Verbindung mit der durch DCI-MS bestimmten Masse von 196 Da führte eine Recherche in AntiBase zu *cyclo(Pro-Val)* (**31**).



31

Erst kürzlich wurde *cyclo(D-Pro-L-Val)* bei einem Screening nach Glycosidase-Hemmern von KWON *et al.* aus einem *Aspergillus*-Stamm isoliert. Glycosidasen katalysieren die Hydrolyse von Poly- und Oligosacchariden in ihre Monomere und spalten Zucker von aromatischen Aglyca ab. Solche Umwandlungen sollen mit geeigneten Inhibitoren unterbunden werden, um den zugrundeliegenden enzymkatalysierten Mechanismus untersuchen zu können. *Cyclo(D-Pro-L-Val)* erwies sich im Gegensatz zu den nachträglich synthetisierten Stereoisomeren in den weiteren Untersuchungen als spezifischer β -Glucosidase-Inhibitor.^[65]

Stamm ANT V/2 51

Ebenfalls aus einem antarktischen Habitat wurde der Stamm ANT V/2 51 isoliert. Eine Analyse der 16-S-rRNA ergab eine große Ähnlichkeit zu *Colwellia rossensis*, einer 1998 von einer australischen Arbeitsgruppe erstmals aus antarktischem Meereis isolierten und charakterisierten Species.^[66]

Im mikrobiologischen Screening fiel der Extrakt auf durch mittlere Aktivitäten gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57).

Der Stamm wurde zunächst in einem stärkehaltigen Komplexmedium (Medium B) fermentiert, wobei man 20 Liter 12 Tage und weitere 20 Liter 28 Tage lang inkubierte. Aus dieser Anzucht konnten jedoch keine befriedigenden Mengen an Metaboliten isoliert werden: die Rohextraktausbeute aus dem gesamten Fermentationsvolumen betrug lediglich 454 mg.

Aus diesem Grunde und weil bislang wenig über die Anzucht von kryophilen Bakterien in größerem Maßstab bekannt war, führte man in Zusammenarbeit mit dem Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven 2-l-Fermentationen mit drei weiteren Nährmedien durch und verglich die Extrakte chemisch und in ihrer mikrobiologischen Aktivität mit den ersten Ergebnissen. Dabei war festzustellen, daß der Methanolextrakt des Mediums A die größte Metabolitenvielfalt im Dünnschichtchromatogramm (s. Abb. 10) und die breiteste antibiotische Wirkung aufwies (s. Tab. 1).

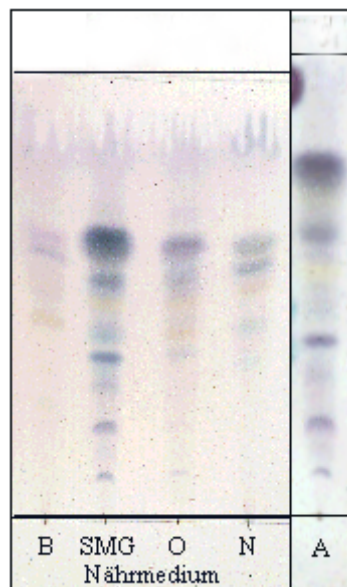


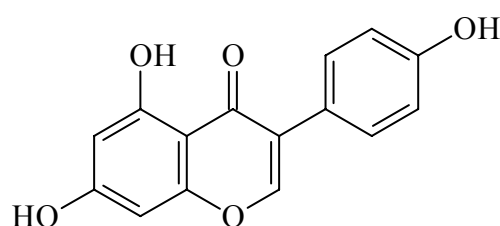
Abbildung 10: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Extrakte A, N, O und der Nährmedienextrakte

Tabelle 1: Antibiotische Aktivität der Methanol- und Cyclohexanextrakte von Stamm ANT V/2 51

Extrakt/ Teststamm	Methanol-Extrakt			Cyclohexan-Extrakt		
	ANT V/2 51			ANT V/2 51		
Nährmedium	A	N	O	A	N	O
<i>Escherichia coli</i>	19	15	16	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	14	13	14	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	0	0	0	0	0
<i>Mucor miehei</i>	0	0	0	13	0	11
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Str. viridochromogenes</i>	0	0	0	14	0	25

Daraufhin fermentierte man den Stamm in diesem sojahaltigen Medium A im 6×10 -l-Maßstab, wobei der Sojaanteil variiert wurde. Der anschließende Vergleich der Extrakte im Dünnschichtchromatogramm zeigte jedoch kaum Übereinstimmung mit der Referenz und wenig interessante Zonen.

Schließlich wurde eine in Bremerhaven angezogene 20 l-Schüttelkultur in demselben Medium mit einem Volumen von 20 l zur Analyse verwendet. Hieraus konnten 850 mg entfetteter Extrakt gewonnen werden, woraus durch Chromatographie an Kieselgel und präparative HPLC-Trennung 3.1 mg eines weißen Feststoffes gewonnen wurden, der anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums als das in der Arbeitsgruppe schon oft isolierte Genistein (**32**) identifiziert wurde.

**32**

Dieses Isoflavon wird häufig zusammen mit Daidzein (**44**) – wie bei dem Stamm ARK XIII/2 442 geschehen – isoliert. Beide sind in dieser Form als Aglycon oder glycosidiert als Genistin und Daidzin in Sojamehl, das Bestandteil des hier verwendeten Nährmediums war, enthalten. Pro Gramm Sojamehl ermittelten FUKUTAKE *et al.* einen Anteil von Genistein mit 5 – 18 μg und von Genistin mit 200 – 968 μg .^[67] Nach Fermentation bestimmten sie für Genistein erhöhte und für Genistin niedrigere Werte, d. h. es muß während des Prozesses eine partielle

Deglycosylierung stattgefunden haben. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und von denen aus anderen Sojaprodukten, die in Lebensmitteln Verwendung finden, errechneten die Forscher, daß Japaner im Durchschnitt deutlich mehr Genistein und Genistin täglich zu sich nehmen als Amerikaner und Westeuropäer. In diesem Resultat vermuten sie die Ursache für eine vergleichsweise deutlich niedrigere Sterblichkeitsrate von Japanern an Brust-, Darm- und Prostatakrebs. Eine chemopräventive Wirkung von Genistein in Bezug auf die genannten Krebserkrankungen wurde durch andere statistische Untersuchungen ebenfalls gestützt.^[68] Eine weitere Studie von Steele *et al.* an Ratten untermauert diesen Zusammenhang für Darmkrebs: dazu verfütterte man an die Tiere Genistein eine Woche vor und vier Wochen nach der Behandlung mit dem starken Carcinogen Azoxymethan und stellte im Anschluß eine deutlich verringerte Zahl von Krankheitsherden im Darm gegenüber der Kontrollgruppe fest.^[69] Ein tatsächlicher präventiver Effekt der Verbindung könnte u. a. in der (anti-)östrogenen und antioxidativen Wirkung begründet sein.^[70-72] Weitere Indikationen könnten kardiovaskuläre Krankheiten und Osteoporosis darstellen. Ein deutlicher Anstieg der Forschungsaktivitäten auf diesen Gebieten ist zu verzeichnen. Genistein wird sogar in den USA bereits als Nahrungsergänzung in Pillenform angeboten.^[73]

Stamm ANT V/2 517

Der aus antarktischem Meereis isolierte Stamm ANT V/2 517 gehört taxonomisch zur Gruppe der γ -Proteobakterien. Die Ergebnisse der 16-S-rRNA-Analyse deuten auf eine enge Verwandtschaft mit *Pseudoalteromonas haloplanktis* hin.^[66] Auf Agar bildete das Bakterium einen orangefarbenen Schleim.

Im Dünnschichtchromatogramm erschien bei $R_f = 0.23$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) eine gelbe Zone, deren Farbe sich durch Anisaldehyd/Schwefelsäure oder Ehrlichs Reagenz vertiefte. Der Extrakt verursachte bei Nematoden eine 75prozentige Mortalität bei einer Konzentration von 7.5 $\mu\text{g/ml}$. Mäßige Aktivität wurde außerdem gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57), *Staphylococcus aureus* und gegen Mikroalgen festgestellt. Im HPLC/ESI-MS-Screening wurden drei Substanzen mit Molmassen über 600 Da detektiert.

Aus dem Extrakt einer 40-l-Fermentation konnten durch Chromatographie an Sephadex LH-20, Chromatographie an LiChroPrepDIOL[®]-Kieselgel und anschließender präparativer HPLC-Trennung lediglich *cyclo*(Leu-Pro) (**26**) und *cyclo*(Phe-Pro) (**27**) in genügender Menge isoliert werden. Diese waren bereits aus dem Stamm ANT V/2 369 gewonnen worden. Die Strukturen weiterer Isolate konnten wegen zu geringer Mengen nicht aufgeklärt werden.

Die damit zugänglichen Informationen aus $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Messungen und Massenspektrometrie reichten nicht zur Aufklärung.

In einem weiteren Anzuchtversuch wurde der Nährlösung einer 2-l-Fermentation 10g XAD-16-Harz zugegeben, das nach Beendigung der Inkubationszeit mit einem Sieb abgetrennt und mit Methanol extrahiert wurde. Der auf diese Weise gewonnene Extrakt zeigte im Dünnschichtchromatogramm jedoch keine interessanten Zonen, weshalb diese Variante nicht weiter verfolgt wurde.

Stamm ANT V/2 253

Der zu den α -Proteobakterien gehörende Stamm ANT V/2 253 wurde ebenfalls aus antarktischem Meereis isoliert. Im mikrobiologischen Screening zeigte er mittlere Aktivitäten gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57). In Gegenwart von Anisaldehyd/Schwefelsäure ließen sich eine Zone bei $R_f = 0.24$ gelb und eine zweite bei $R_f = 0.47$ orange anfärben.

Von diesem Stamm wurden sechs 10-l-Schüttelkulturen angefertigt, die man mit XAD-7- und XAD-16-Harz extrahierte. Das vom Harz mit Methanol desorbierte Gemisch extrahierte man nach dem Eindampfen mit Ethylacetat, um sehr polare Anteile zu entfernen, die bei der folgenden Chromatographie an Sephadex gestört hätten. Den Extrakt mit einem Gewicht von 610 mg trennte man in sieben Fraktionen. Durch präparative Dickschichtchromatographie und erneute Chromatographie an Sephadex LH-20 konnten drei Substanzen isoliert werden (s. Abb. 11).

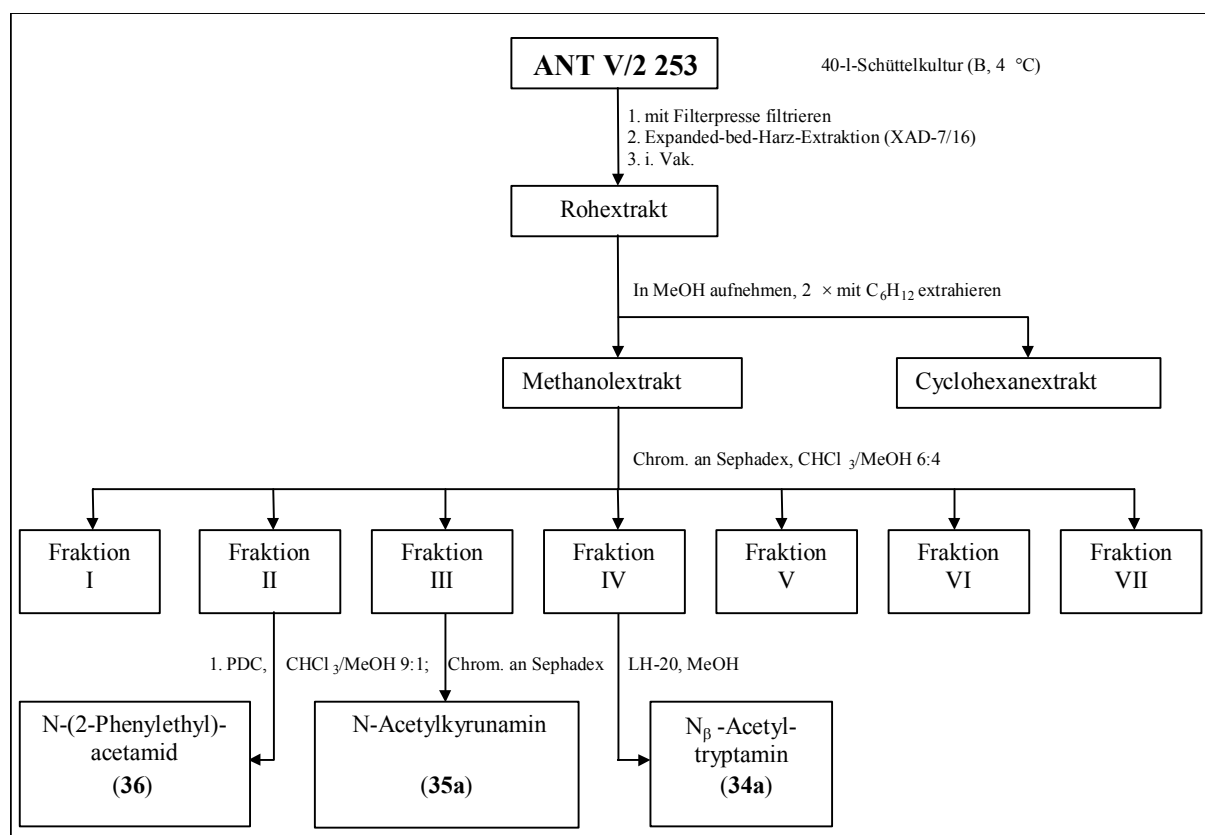


Abbildung 11: Aufarbeitungsschema des Extraktes von ANT V/2 253

N^{β} -Acetyltryptamin

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte im aromatischen Bereich das typische Kopplungsmuster eines 3-Indolderivates mit zwei Dubletts und zwei Triplets des 1,2-disubstituierten Sechsrings und einem Dublett mit kleinerer Kopplungskonstante des Protons in Position 2. Außerdem war das austauschbare Proton am Stickstoff bei $\delta = 10.18$ zu sehen. Weitere Signale bei $\delta = 3.51$ und 2.94 deuteten auf zwei benachbarte Methylengruppen, die beide an tieffeldverschiebende Substituenten gebunden waren. Das Triplet bei $\delta = 3.51$ wurde weiter durch ein Dublett aufgespalten, jedoch fehlte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum das Signal des zugehörigen Kopplungspartners. Diese Konstellation wird oft durch die Kopplung mit austauschbaren Protonen von Imino- oder Hydroxygruppen verursacht. Auf das Vorhandensein eines solchen Protons deutete ein breites Singulett bei $\delta = 3.19$. Das letzte Signal bei $\delta = 1.90$ mußte durch eine Methylgruppe ohne Kopplungspartner verursacht worden sein. Bei dieser Verschiebung des Signals konnte es sich um eine Acetylgruppe, eine an Stickstoff oder einen Aromaten gebundene Methylgruppe handeln.

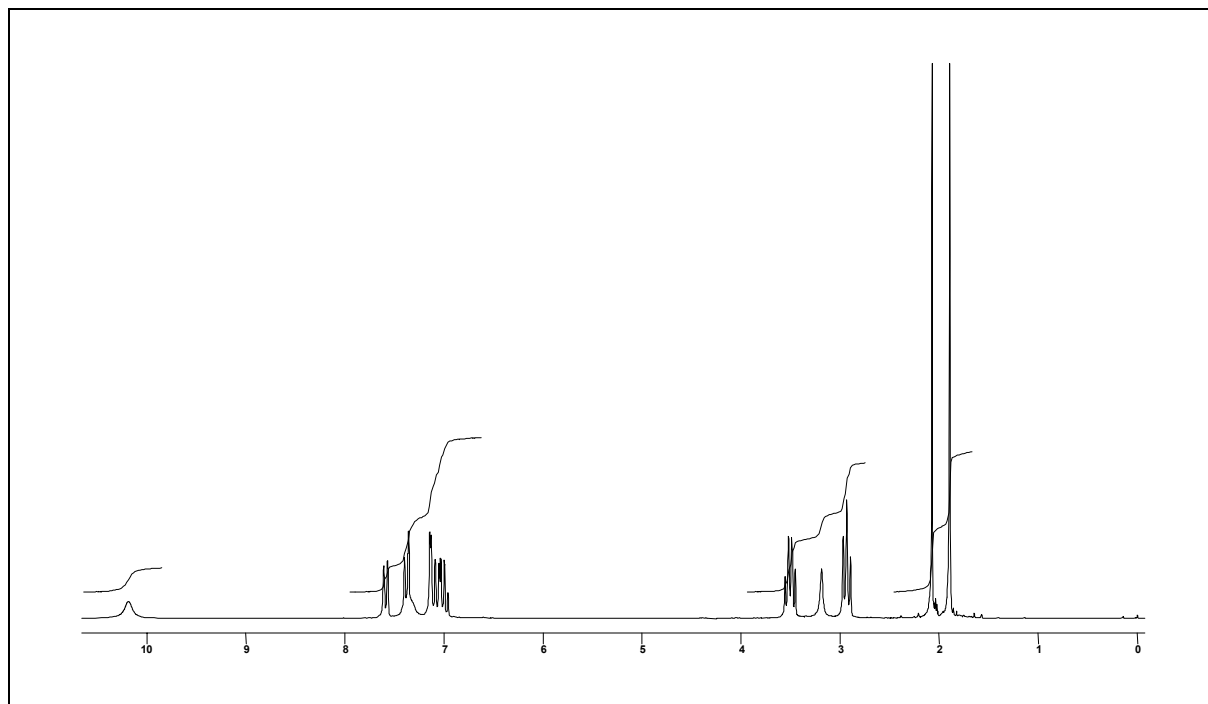


Abbildung 12: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von N^β -Acetyltryptamin (**34a**) in Aceton

Durch eine Suche in AntiBase mit diesen Merkmalen (s. Abb. 13) resultierten die zwei ähnlichen Verbindungen N^β -Acetyltryptamin (**34a**) und 5-Hydroxy- N^β -acetyltryptamin (**34b**). Für letzteres fehlten im ^1H -NMR-Spektrum die entsprechenden Aromatensignale und ein weiteres austauschbares Signal. Die Richtigkeit der Struktur **34a** wurde durch die Molmasse (EI-MS) und ^1H -NMR-Vergleichsspektren aus der Sammlung bestätigt.

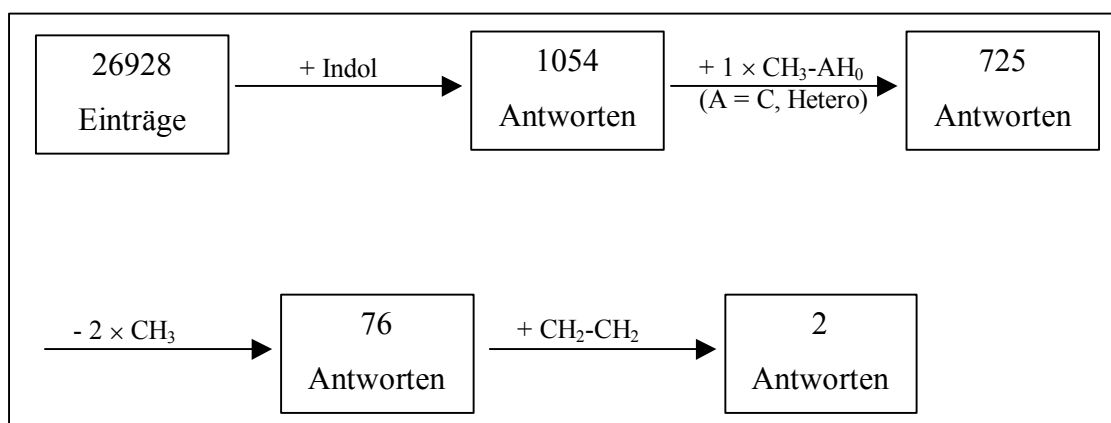
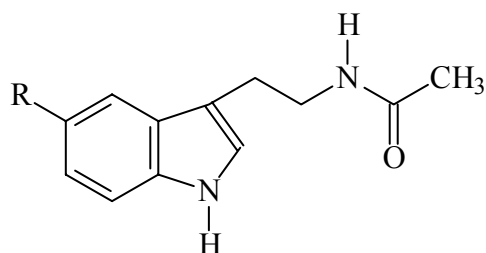


Abbildung 13: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von N_β -Acetyltryptamin (**34a**)



34a : R = H

34b : R = OH

N^β-Acetylkynuramin

Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Substanz wurde in [D₆]Benzol gemessen, weil man hier die beste Signaltrennung erreichte. Es zeigt die zwei Dubletts und zwei Triplets eines 1,2-substituierten Aromaten, wobei ein Triplet bei $\delta = 6.41$ und ein Dublett bei $\delta = 6.14$ auffällig hochfeldverschoben sind. Das deutet darauf hin, daß einer der beiden Substituenten ein Elektronendonator sein muß. Außerdem zu sehen sind zwei austauschbare Signale bei $\delta = 5.94$ und 5.35 , wovon das erste die Intensität 2 aufweist und daher wahrscheinlich von einer Aminogruppe stammt. Im weiteren sind noch drei Signale bei $\delta = 3.45$, 2.83 und 1.42 zu sehen, die denen der Seitenkette des vorher besprochenen N^β-Acetyltryptamins (**34a**) sehr ähneln. Die ungewöhnliche Verschiebung des Acetyl-Singulets bei $\delta = 1.42$ ist, wie eine Vergleichsmessung mit N-Acetyltyramin (**65**) ergeben hat, auf das Lösungsmittel zurückzuführen.

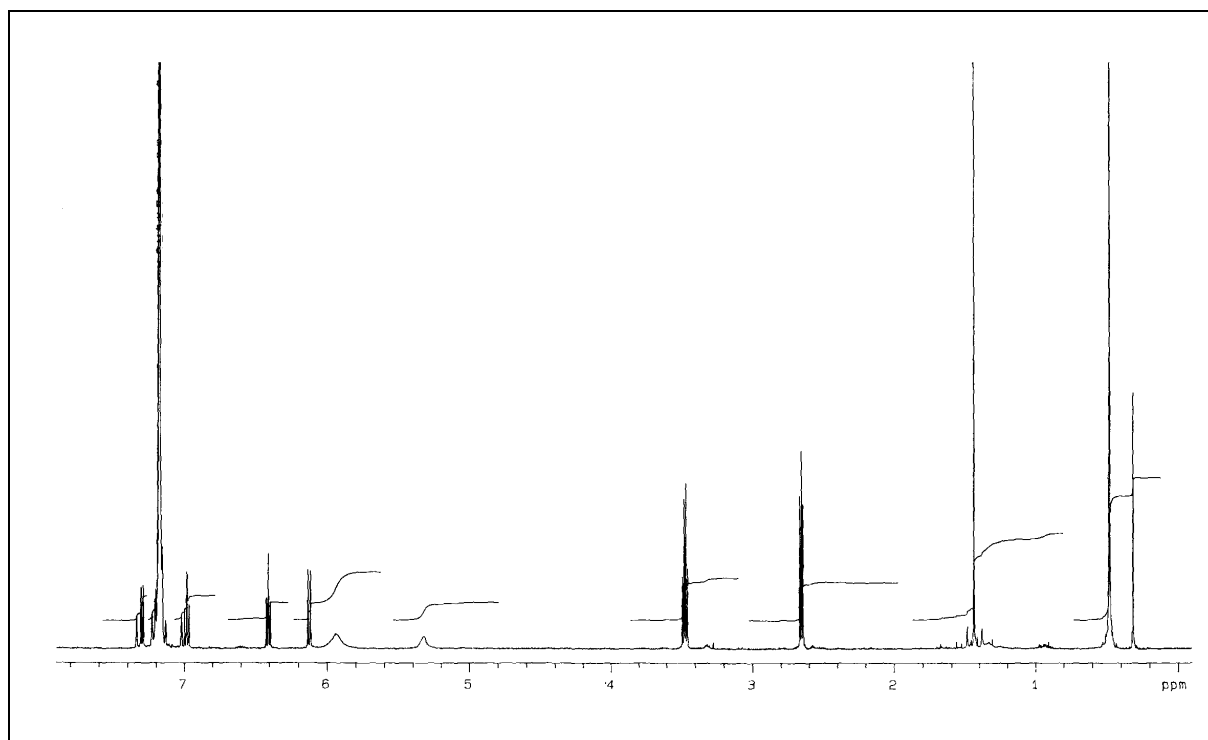
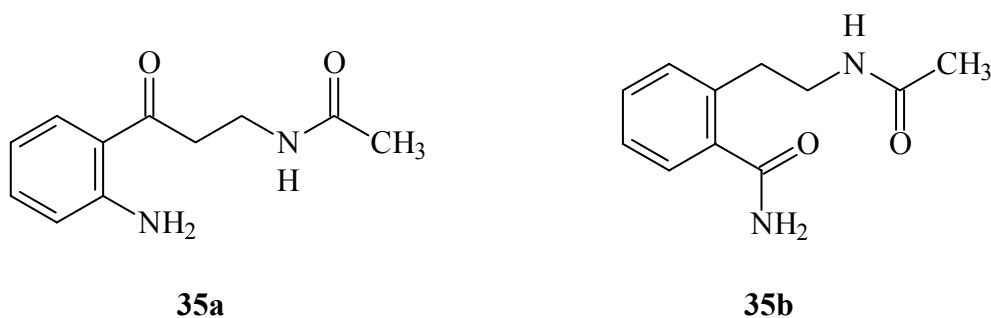


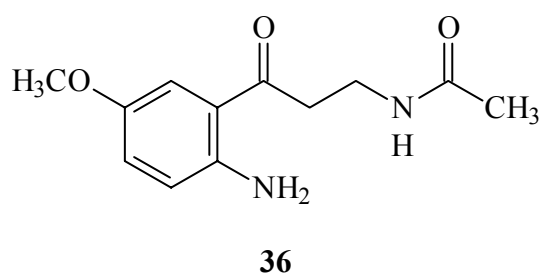
Abbildung 14: ^1H -NMR-Spektrum von N^β -Acetylkynuramin (**35a**) in $[\text{D}_6]$ Benzol.

Aufgrund der Informationen aus dem ^1H -NMR-Spektrum und hochauflösender EI-Massenspektrometrie, mit der sich die Summenformel auf $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ festlegen läßt, können nur die zwei bisher nicht bekannten Strukturen **35a** und **35b** in Frage kommen.



Die Entscheidung welche der beiden Verbindungen vorliegt, wäre mit Hilfe eines ^{13}C -NMR-Spektrums leicht gefallen, denn bei **35a** wäre dann das Signal eines Ketons bei $\delta = 205 - 210$ zu sehen, während **35b** zwei Signale von Carbonsäureamiden bei $\delta = 155 - 165$ liefern würde. Weil aber wegen der zu kleinen Substanzmenge von 0.5 mg ein ^{13}C -NMR-Spektrum nicht zu messen war, mußten andere Kriterien herangezogen werden: Um die ^1H -NMR-Verschiebungen der aromatischen Protonen von **35b** zu überprüfen, wurden 2-Methylbenzamid und 3-Methylbenzamid synthetisiert. Dabei lieferte keins der aromatischen Protonen ein ^1H -NMR-Signal unter $\delta = 7.00$, was darauf hindeutet, daß hier **35a** vorliegt. Hierbei handelt es sich offenbar um ein Folgeprodukt des Tryptophanstoffwechsels: Eine oxidative Ringöffnung von N^β -Acetyltryptamin würde N^β -Acetyl-N-formyl-kynuramin ergeben, das leicht zu **35a** deformyliert werden kann. Obwohl das entsprechende Abbauprodukt von Tryptophan bzw. Tryptamin, das Kynuramin, gut bekannt ist, wurde **35a** als Naturstoff bisher nicht beschrieben.

In Analogie zur Synthese zu dem Melatoninabbauprodukt **36** sollte sich **35a** leicht aus N^β -Acetyltryptamin durch Persäureoxidation und anschließende Deformylierung gewinnen lassen. Entsprechende Syntheserversuche zur Bestätigung der Struktur stehen noch aus.



N-(2-Phenylethyl)acetamid

Auch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der dritten isolierten Verbindung zeigte die Signale einer N-Acetyl-ethyl-Seitenkette. Zusätzlich erschien ein Multipllett von fünf aromatischen Protonen bei $\delta = 7.24$. Die Annahme, daß es sich bei der gesuchten Verbindung um N-(2-Phenylethyl)acetamid (**37**) handelte, wurde mit Hilfe der durch DCI-MS bestimmten Molmasse und einem $^1\text{H-NMR}$ -Vergleichsspektrum aus der Sammlung bewiesen.

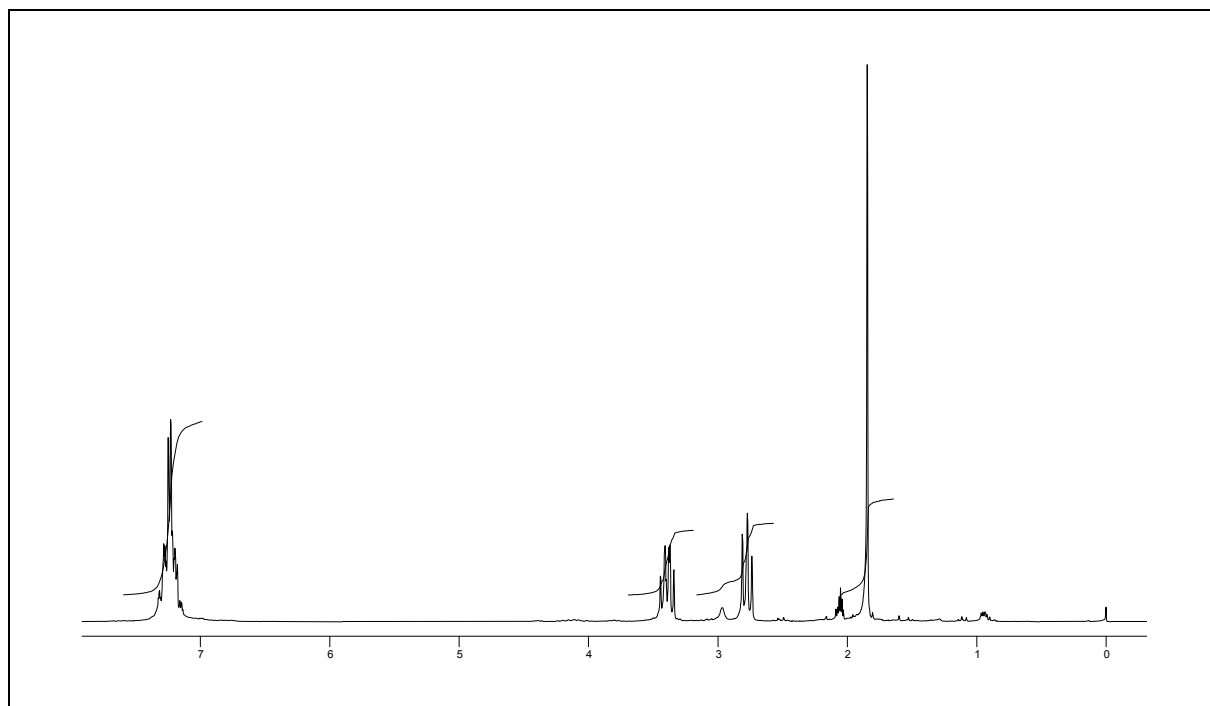
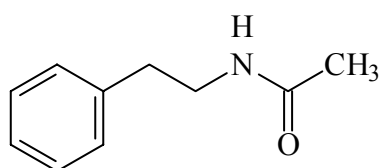


Abbildung 15: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (200 MHz) von N-(2-Phenylethyl)acetamid (**37**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$



37

Stamm ANT V/2 381

Der antarktische Meereisstamm ANT V/2 381 wurde aufgrund seiner Aktivität gegen Hefen ausgesucht. Obwohl der Extrakt aus einer in Bremerhaven angezüchteten 20-l-Fermentation im Dünnschichtchromatogramm keine interessanten Zonen zeigte, wurde er an Sephadex

chromatographiert. Die Fraktionen I – III zeigten mäßige Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Die Fraktionen wurden einer HPLC/UV-VIS-Analyse unterzogen, wobei keine interessanten Zonen detektiert wurden. Daraufhin wurde der Stamm nicht weiter bearbeitet.

Stamm ARK XIII/2 373

Der Stamm ARK XIII/2 373 konnte aus arktischem Meereis isoliert werden und erwies sich in der 16S-rRNA-Analyse als genetisch eng verwandt mit *Brachybacteria tyrofermenta*.

Aufgefallen ist der Stamm im biologischen Screening durch seine Aktivität gegen *Mucor miehei*, *Escherichia coli* und die Algen *Scenedesmus subspicatus* und *Chlorella vulgaris*. Im Dünnschichtchromatogramm war eine mit Anisaldehyd/Schwefelsäure schwarzviolett anfärbbare Zone aufgefallen.

Um den Einfluß der Wachstumszeit auf die Bildung von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, erntete man zwei Schüttelkulturen mit jeweils einem Volumen von 20 l nach 21 d und 28 d Inkubationszeit und extrahierte sie an Harz nach der Expanded-bed-Methode. Nach dem zweimaligen Entfetten der Extrakte überprüfte man durch Dünnschichtchromatographie das Muster der Inhaltsstoffe, konnte aber keine größeren Unterschiede feststellen, so daß man die Methanol-Fraktionen vereinigte. Nach Chromatographie an Sephadex LH-20, präparativer Dickschichtchromatographie und präparativer HPLC-Trennung erhielt man einen weißen Feststoff als Reinsubstanz.

N-Acetyl- β -oxotryptamin

Dessen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wies deutliche Ähnlichkeiten zu dem von N $^\beta$ -Acetyltryptamin (**34a**) auf: so waren die Signale des Indolrestes und der Methylgruppe nahezu identisch. Statt der Signale der Ethylgruppe war offenbar nur eine Methylengruppe vorhanden.

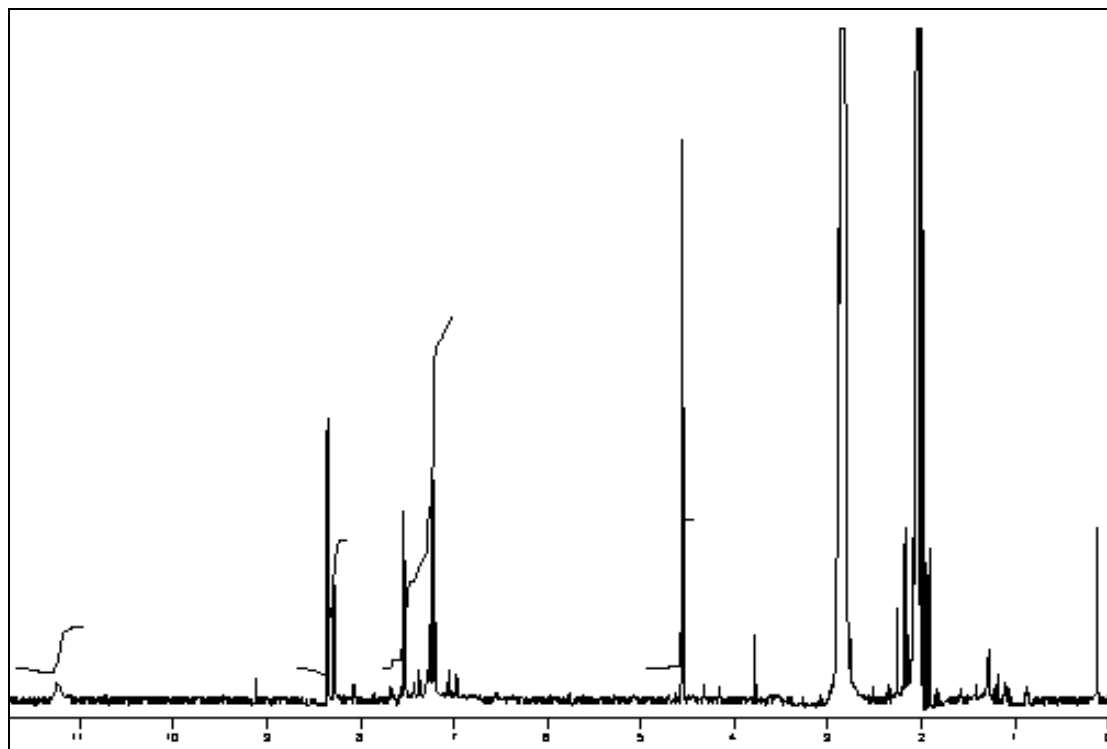


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von N-Acetyl- β -oxotryptamin (**38**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

Eine Suche in AntiBase lieferte mit diesen Merkmalen und einer durch EI-MS ermittelten Masse von 216 Da als einzige verbleibende Verbindung N-Acetyl- β -oxotryptamin (**38**) (s. Abb. 17). Ein Vergleichsspektrum stimmte mit dem gemessenen überein.

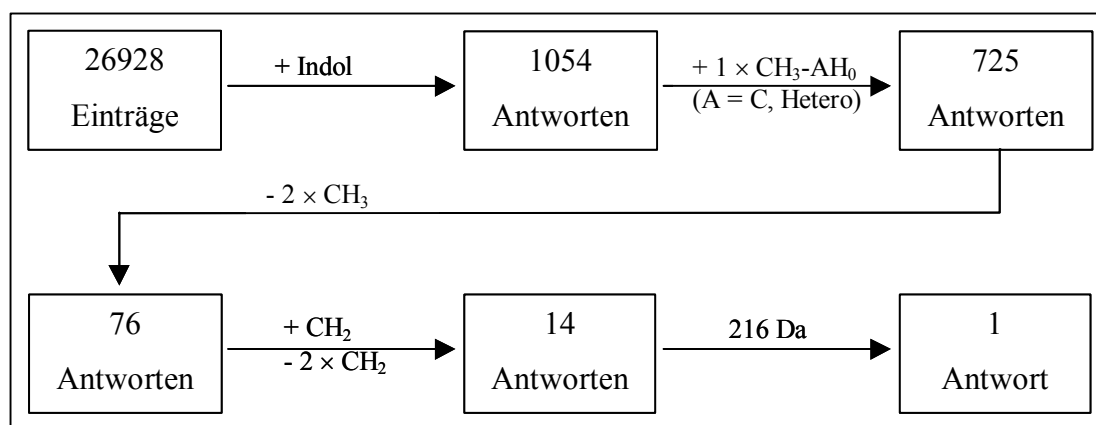
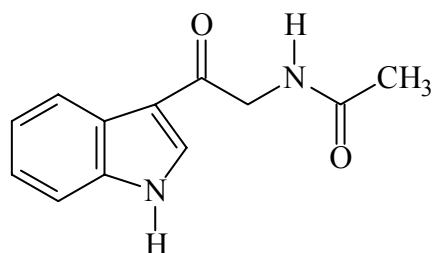


Abbildung 17: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von N-Acetyl- β -oxotryptamin (**38**)



38

Stamm ARK XIII/2 437

Im Rohextrakt des aus antarktischem Meereis isolierten Stammes ARK XIII/2 437 konnten mit dem HPLC/ESI-MS-Screening zwei Substanzen mit Molmassen über 400 Da detektiert werden. Der Stamm wurde in einer 20-l-Schüttelkultur angezüchtet, die man nach 28 d Tagen an Harz nach der Expanded-bed-Methode extrahierte. Dazu wird eine mit ausreichend Harz gefüllte Glassäule verwendet, an deren unterem Auslaß und in einem oben aufgesetzten Glasstopfen eine Glasfritte eingesetzt ist, damit das Harz nicht herausgespült wird. Denn die Kulturbrühe wird mittels einer regelbaren Schlauchpumpe von unten so in die Säule gepumpt, daß das Harz zwar aufschwimmt, aber nicht an die oben abschließende Fritte gedrückt wird. Ein großer Vorteil dieser Extraktionsvariante ist, daß die vorher nicht abgetrennten Zellbestandteile aufgrund ihres geringen Gewichtes wieder mit herausgeschwemmt werden und das Harz nicht verschmutzen. Obwohl hier kein dicht gepacktes Harzbett mehr vorliegt, ist die Extraktion nahezu vollständig. Im Vergleich zur Aufarbeitungsprozedur mit Lösungsmitteln steigt der Zeitaufwand zwar insgesamt um das Drei- bis Vierfache, kann aber auch über Nacht ohne Aufsicht fortgesetzt werden und ist deutlich weniger arbeitsintensiv. Die Desorption vom Harz erfolgt wie üblich mit reinem Methanol von oben nach unten.

Auf ein Entfetten des nur 1.28 g schweren Extraktes mit Cyclohexan wurde verzichtet, um eine möglichst ressourcenschonende Auftrennung auch von in beiden Phasen löslichen Substanzen zu ermöglichen.

Durch Chromatographie an Sephadex LH-20 wurde der Extrakt in vier Fraktionen getrennt. Fraktion II enthielt eine mit Anisaldehyd/Schwefelsäure rötlich anfärbare Substanz, die abgetrennt werden konnte. Aus Fraktion IV erhielt man eine UV-löschende Substanz nach prä-

parativer HPLC und eine zweite nach einer weiteren Reinigung durch präparative Dick-schichtchromatographie und erneuter Sephadex-Chromatographie (s. Abb. 18).

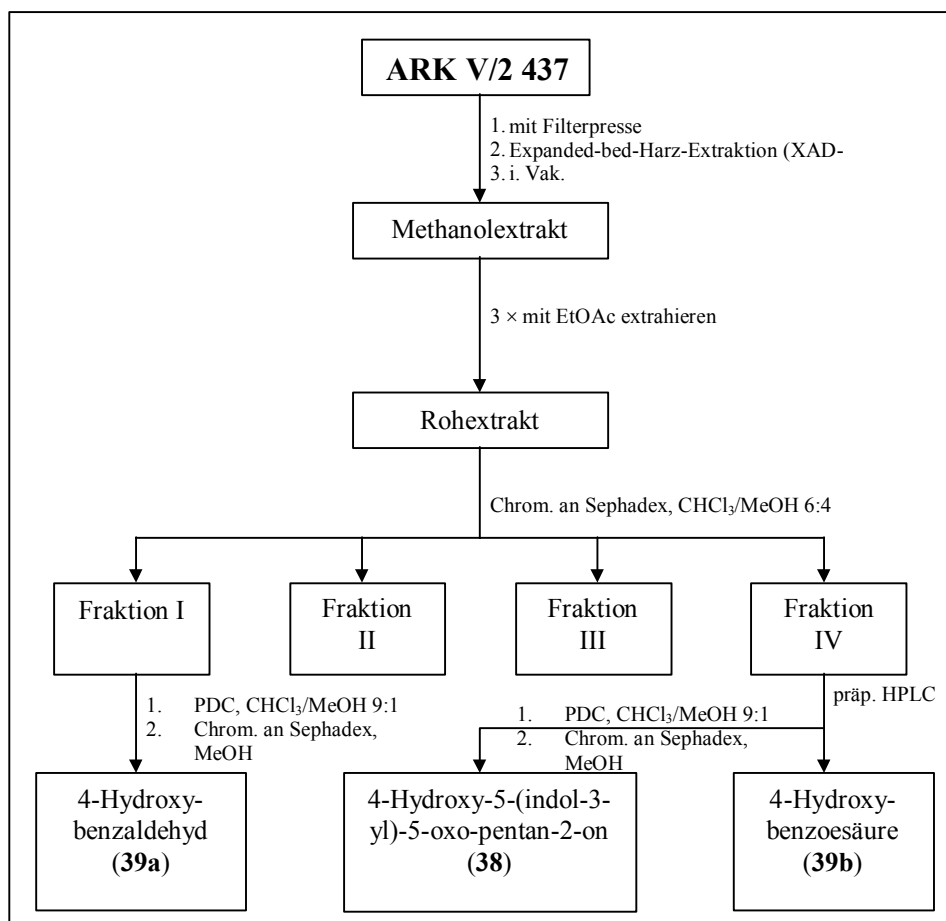


Abbildung 18: Aufarbeitungsschema des Extraktes von Stamm ARK XIII/2 437

4-Hydroxy-5-(indol-3yl)-5-oxo-pentan-2-on

Im aromatischen Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums war erneut das Kopplungsmuster eines 3-substituierten Indolderivates zu erkennen. Untermauert wurde dessen Vorliegen durch ein Fragment von 144 Da im EI-Massenspektrum, das immer bei solchen Indolderivaten auftritt, die in 3-Position mit einer Carbonylgruppe substituiert sind. Eine charakteristische Anfärbung der Substanz mit Ehrlichs Reagenz war ebenfalls möglich. Die Molekülmasse (EI-MS) wurde mit 231 Da bestimmt.

Ein weiteres $^1\text{H-NMR}$ -Signal eines Methinprotons erschien als Dublett vom Dublett bei $\delta = 5.21$, das mit einer in ihrer Rotation gehinderten Methylengruppe bei $\delta = 2.98$ und 2.77 koppelte. Wegen eines Singulettsignals bei $\delta = 2.20$ mußte die Verbindung zusätzlich eine Methylgruppe enthalten, die an eine Carbonylgruppe oder ein Stickstoffatom gebunden war. Die Anbindung an einen aromatischen Ring konnte wegen der dafür zu geringen Molmasse der

Verbindung ausgeschlossen werden. Schließlich zeigte das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum noch ein austauschbares Signal der Intensität 1 bei $\delta = 4.44$.

Nachdem eine Suche in AntiBase keinen Erfolg brachte, wurde ein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, das außer den erwarteten Signalen des Indolrestes noch das einer Ketogruppe bei $\delta = 195.9$ und zwei Signale bei $\delta = 71.8$ und 50.1 enthielt, die der im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sichtbaren Methin- und Methylengruppe zuzuordnen waren. Nicht zu sehen waren der zur Methylgruppe gehörende Kohlenstoff und der einer eventuell vorhandenen zweiten Carbonylgruppe, deren Signale beide unter denen des als Lösungsmittel benutzten Acetons liegen konnten. Mittels eines HMBC- Spektrums (s. Abb. 19) wurden diese fehlenden Signale sichtbar, und die am Indol gebundene Seitenkette konnte aufgrund zahlreicher Kopplungen aufgeklärt werden.

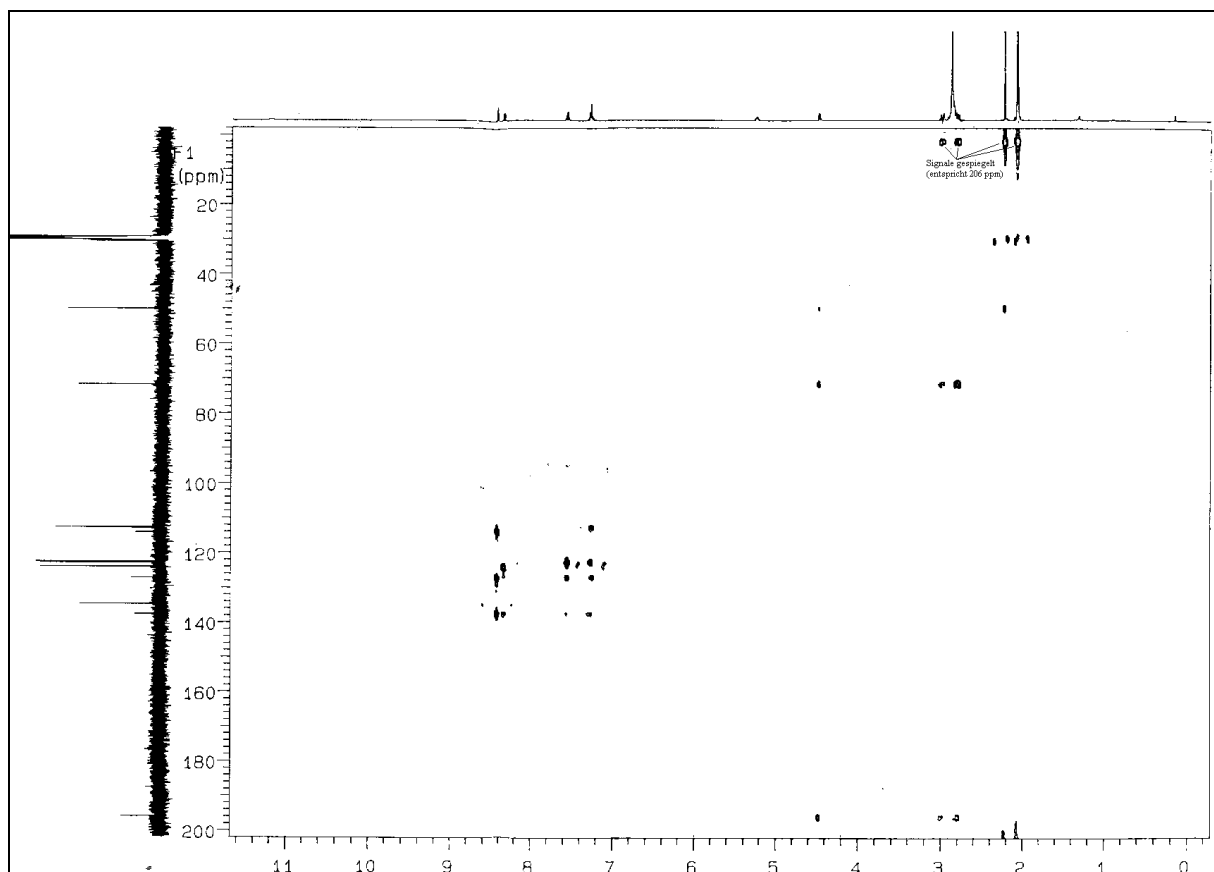
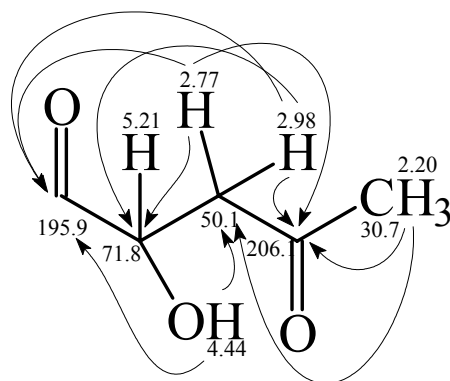
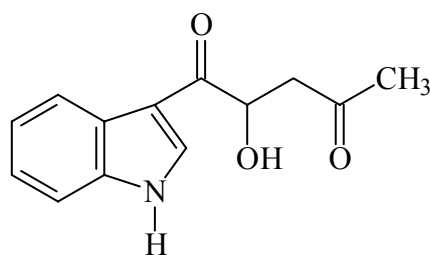


Abbildung 19: HMBC-NMR-Spektrum von 4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (**39**) in [D₆]Aceton

Daß es sich bei dem aciden Substituenten um eine Hydroxygruppe handelte, ergab sich aus der verbleibenden Massendifferenz zwischen den durch Spektren ermittelten Strukturbestandteilen und der Molmasse. Die Summenformel wurde durch hochauflösende EI-Massenspektrometrie bestätigt. Somit mußte hier die Verbindung 4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (**39**) vorliegen.



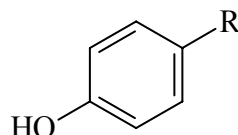
39

Dieser Naturstoff ist bereits von Cardellina *et al.* aus den Pilzen *Dysidea etheria* und *Uloa ruetzleri* isoliert worden und zeigte dort eine regulierende Wirkung auf das Wachstum von Kopfsalatsämlingen.^[74] Antibiotische oder algicide Wirkungen konnten nicht festgestellt werden. Das parallele Auftreten von **39** in Pilzen und Bakterien ist bemerkenswert.

4-Hydroxybenzaldehyd und 4-Hydroxybenzoesäure

Im ¹H-NMR-Spektrum der aus Fraktion II isolierten Substanz waren lediglich zwei Dubletts im aromatischen Bereich und ein nicht austauschbares Singulett bei $\delta = 9.86$ zu sehen, d. h. die gesuchte Verbindung enthielt einen 1,4-disubstituierten Aromaten und eine Aldehydgruppe. Durch EI-MS bestimmte man eine Molmasse von 122 Da, von der nur noch 17 Da verblieben, wenn man die vorher genannten Strukturbestandteile subtrahierte. Als weiterer Substituent am aromatischen Ring kam nur eine Hydroxygruppe in Frage, die nicht immer als Signal im ¹H-NMR-Spektrum erscheint. Ein Vergleich mit vorhandenen Spektren bestätigte, daß es sich bei der Verbindung um 4-Hydroxybenzaldehyd (**40a**) handelte.

Das ¹H-NMR-Spektrum der zweiten Verbindung zeigte nur zwei Dubletts im Aromatenbereich. Durch EI-MS wurde die Masse mit 138 Da bestimmt und ein Vergleich des Fragmentierungsmusters mit Hilfe einer Datenbank identifizierte die Substanz als 4-Hydroxybenzoesäure (**40b**). Zusätzlich war ein identisches ¹H-NMR-Vergleichsspektrum aus der Sammlung verfügbar.



40a: R = CHO

40b: R = CO₂H

Stamm ARK XIII/2 442

Der zu den γ -Proteobakterien zählende Stamm ARK XIII/2 442 wurde aus antarktischem Meereis isoliert. Die 16S-rRNA ist der von *Shewanella frigidimarina* sehr ähnlich. Aufgefalten ist der Organismus durch seine hohe Aktivität gegen Hefen. Eine 20-l-Schüttelkultur wurde nach Filtration mit Harz extrahiert. Den Eindampfrückstand des Eluats extrahierte man mit Ethylacetat und erhielt 383 mg Extrakt, den man durch präparative HPLC in sieben Fraktionen auftrennte. Nur zwei Fraktionen mußten durch Chromatographie an Sephadex bzw. präparative Dickschichtchromatographie nachgereinigt werden (s. Abb. 20).

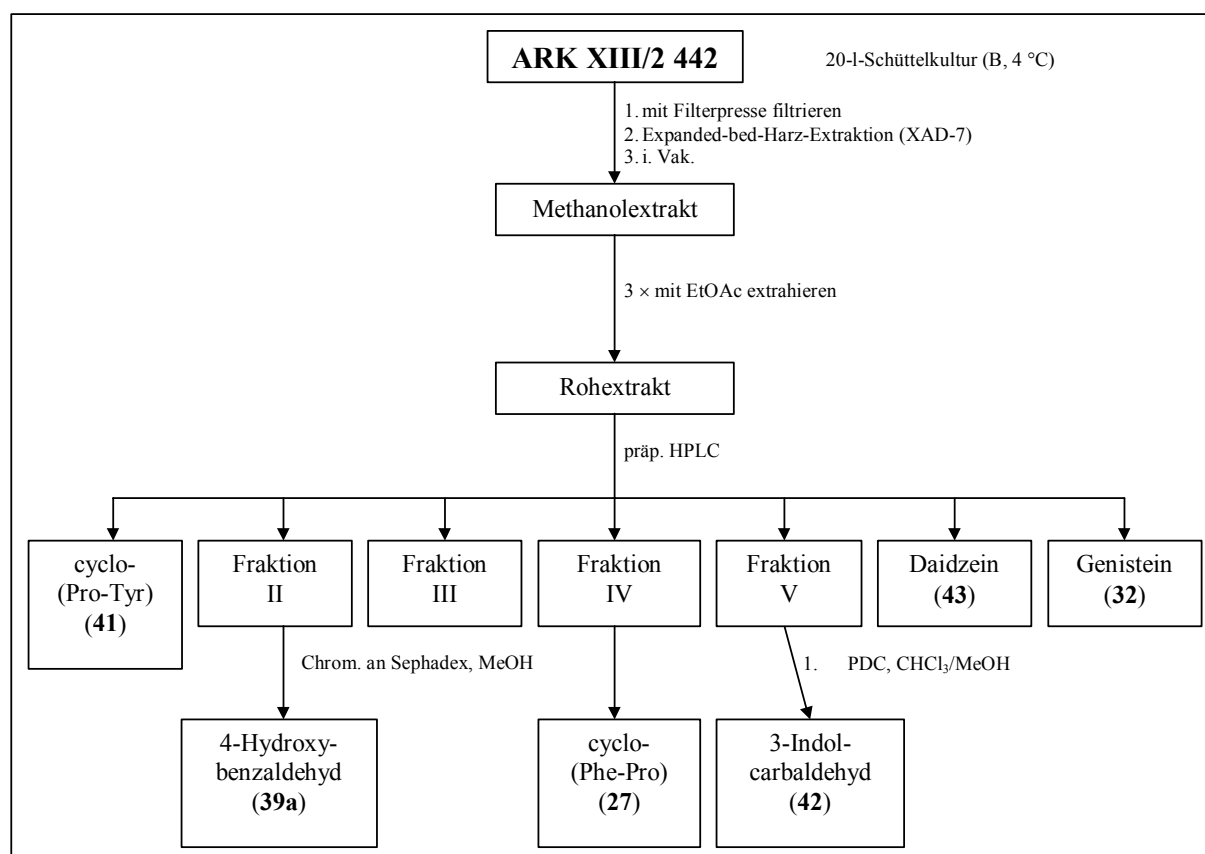


Abbildung 20: Aufarbeitungsschema des Extraktes von Stamm ARK XIII/2 442

***cyclo*(Phe-Pro) und 4-Hydroxybenzaldehyd**

Drei der sechs isolierten Substanzen waren schon aus den vorigen Extrakten kryophiler Bakterien isoliert worden, weshalb sie durch den Vergleich mit den HPLC-UV-Spektren und den Retentionszeiten leicht zu identifizieren waren. Zur Bestätigung wurden für *cyclo*(Phe-Pro) (**27**) und 4-Hydroxybenzaldehyd (**40a**) die $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektren herangezogen. Zur Identifizierung von Genistein (**32**) wurde wegen der sehr guten Übereinstimmung der UV-Spektren und der Retentionszeit nur eine kleine Menge aufgefangen und massenspektrometrisch aufgrund des Fragmentierungsmusters (EI-MS) charakterisiert.

***cyclo*(Pro-Tyr)**

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der als Fraktion I isolierten Substanz zeigte eindeutig, daß ein Diketopiperazin vorlag. Aufgrund der zwei Dubletts im aromatischen Bereich handelte es sich wahrscheinlich um *cyclo*(Pro-Tyr) (**42**), was man durch die Molmasse (ESI-MS) und eine erfolglose Suche nach Alternativen in AntiBase verifizierte.

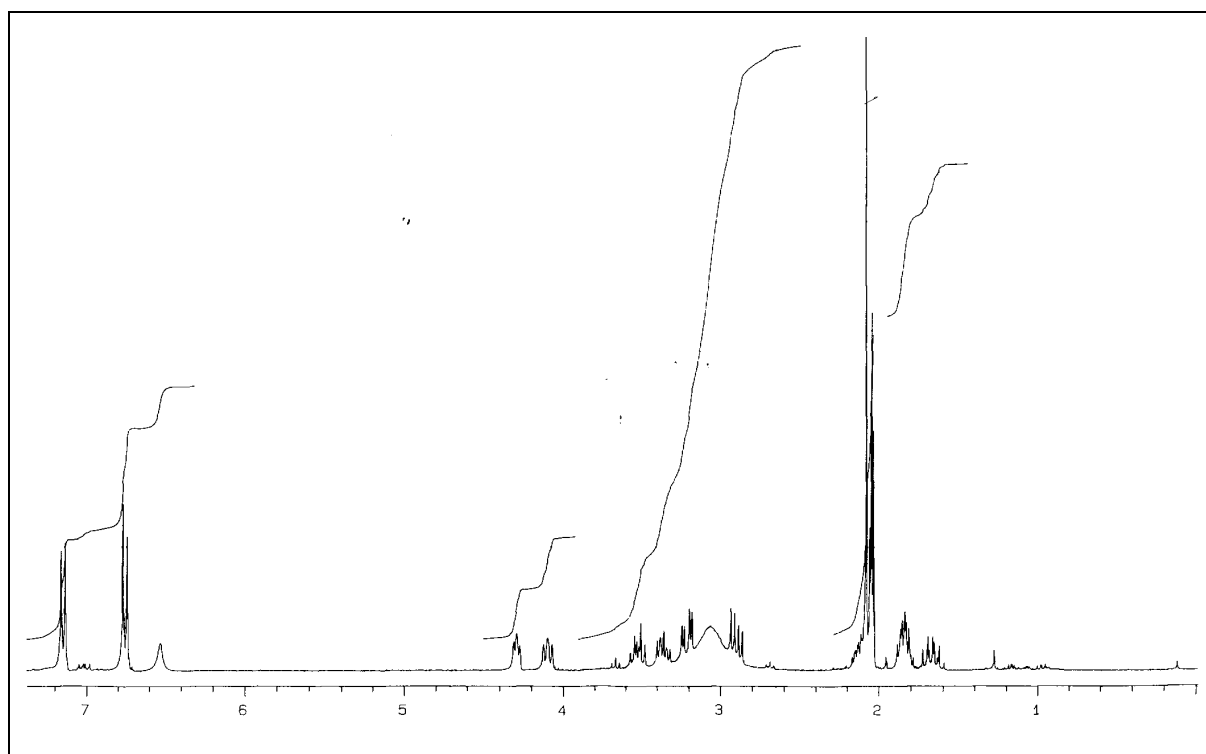
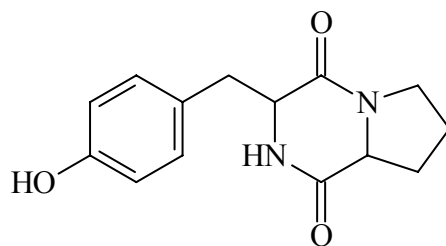


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz) von *cyclo*(Pro-Tyr) (**42**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$



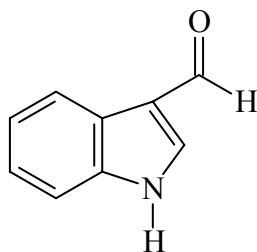
42

Das L,L-Isomer wurde 1988 von STIERLE *et al.* als gegen die Flockenblume (*Centaurea maculosa*) wirksames Phytotoxin identifiziert. In den USA breitete sich diese Grasart wegen fehlender Konkurrenten und Verbraucher schnell aus und verursachte einen großen Schaden in der Viehfutterproduktion, so daß nach einem sehr spezifisch wirkenden Phytotoxin gesucht wurde. Gefunden wurde *cyclo(L-Pro-L-Tyr)* in dem Pilz *Alternaria alternata*, der Flockenblumen epidemisch befiel und dort eine Blattfäule auslöste. Aufgrund dieses Zusammenhangs trägt das Diketopiperazin auch den Namen Maculosin.^[75]

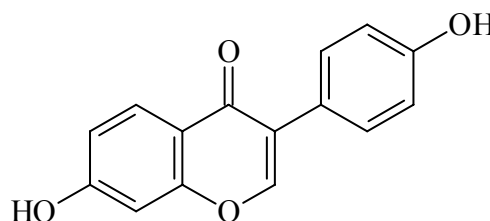
3-Indolcarbaldehyd und Daidzein

Die Substanz aus Fraktion II lieferte im ¹H-NMR-Spektrum außer den bekannten Signalen eines 3-substituierten Indolderivates nur ein zusätzliches Singulett bei $\delta = 10.02$ ppm. Wie durch die Molmasse und die Fragmentierung (EI-MS) bestätigt wurde, handelte es sich hierbei um 3-Indolcarbaldehyd (**43**).

Das UV-Profil der verbliebenen Verbindung wies im Vergleich mit den Datenbank-UV-Profilen eine große Ähnlichkeit zu Daidzein (**44**) auf. Daher wurde auch hiervon nur ein kleiner Teil aufgefangen, um massenspektrometrisch die erwartete Bestätigung zu bekommen.



43



44

Farbige Meereisbakterien

Einige der Meereisbakterienstämme bildeten auf Agarplatten gelbe, orangefarbene und rote Farbstoffe. Aus diesem Grund untersuchte man 15 dieser Stämme, indem jeweils von drei

Agarplatten das Zellmaterial abgenommen und mit Ethylacetat extrahiert wurde. Im Anschluß wurde die Extrakte einem HPLC/UV-Screening unterzogen, um Hinweise auf die Farbstoffgruppe zu bekommen. Alle detektierten Pigmente waren sehr unpolar und zeigten ein für Carotinoide typisches „Dreifinger“-UV-Profil, das drei eng beieinanderliegende Maxima im Wellenlängenbereich von 400 – 500 nm aufweist. Aufgrund der sehr geringen Mengen konnten keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

Sekundärmetabolite aus anderen Mikroorganismen

Bei der Bearbeitung der arktischen und antarktischen Meereisbakterien entstanden durch lange Fermentationszeiten von drei bis vier Wochen und Schwierigkeiten bei der Anzucht in Bremerhaven längere Wartezeiten, die dazu genutzt wurden, andere in der Arbeitsgruppe betriebene Forschungsprojekte mit ähnlicher Thematik zu unterstützen. Daraus ergab sich im Rahmen des niedersächsischen Verbundprojektes Meeresbiotechnologie, in dem die Ökologie des Wattenmeers erforscht wird, die Untersuchung eines Nordseebakteriums. Außerdem wurden im Rahmen der langjährigen Arbeiten an marinen Streptomycceten vier Stämme bearbeitet, deren Rohextrakte interessante Aktivitäten im Test gegen Krebszelllinien zeigten. Weitere vier im Primärscreening auffällige terrestrische Streptomyccetenstämme wurden ebenfalls untersucht.

Stamm HEL 45

Der Stamm HEL 45 wurde aus einer Meerwasserprobe isoliert, die vor der Küste Helgolands gesammelt worden war. Durch eine 16S-rRNA-Genclusteranalyse konnte das Bakterium der Gattung *Sulfitobacter* zugeordnet werden.

Extrakt I

Der Stamm wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Lang in Braunschweig in einer 40-l-Fermentation in tryptonhaltigem Medium angezchtet. Mycel und Überstand wurden durch Filtration getrennt und mit Ethylacetat extrahiert. Die jeweiligen organischen Phasen wurden eingedampft und ergaben 2.1 g Überstand- und 0.8 g Zellextrakt. Weiterbearbeitet wurde der Extrakt aus dem Überstand, indem man ihn mit Cyclohexan entfettete und durch Chromatographie an Sephadex in sieben Fraktionen auftrennte (s. Abb. 22).

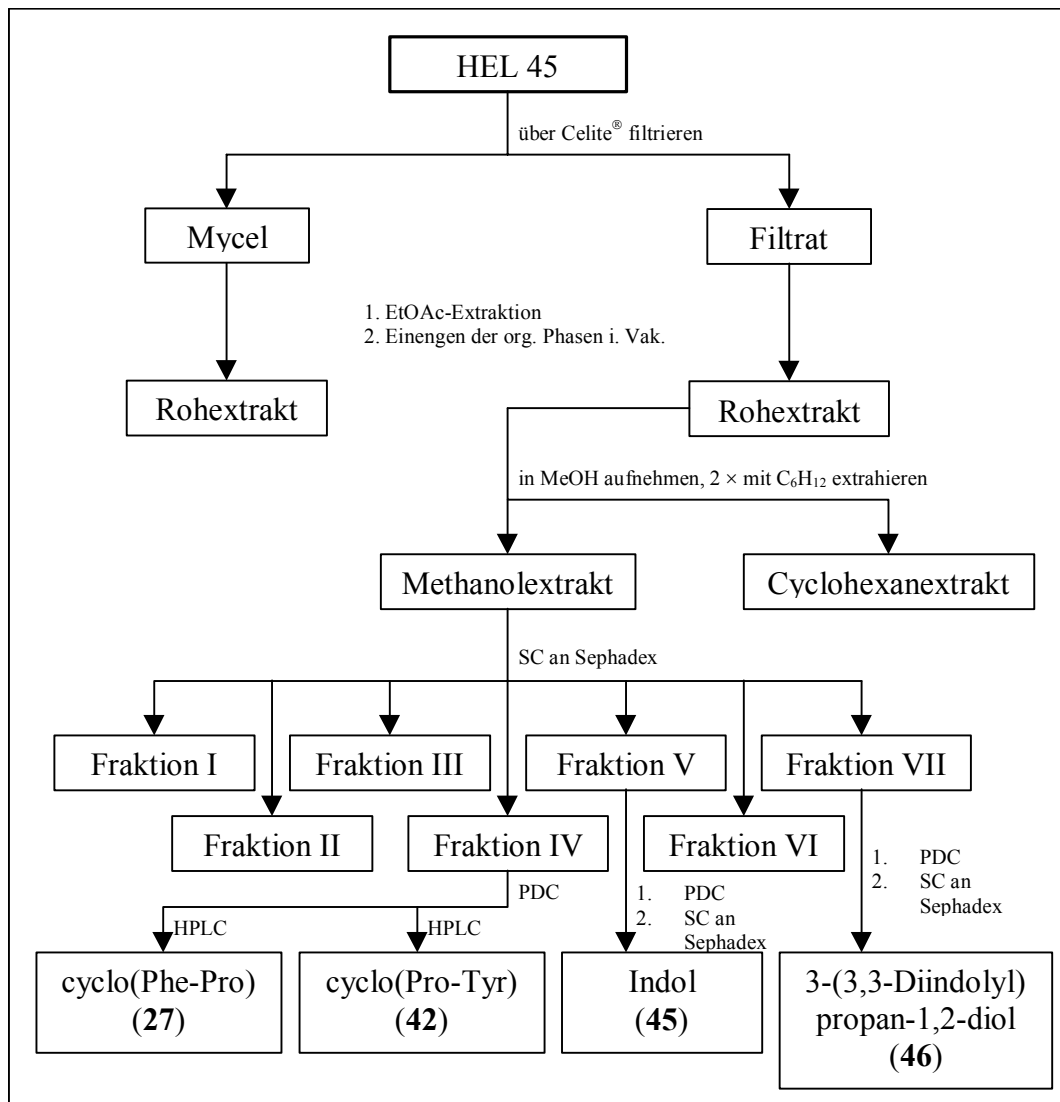


Abbildung 22: Aufarbeitungsschema für Stamm HEL 45

Im chemischen Screening war zu erkennen, daß der Extrakt aus dem Mycel im Vergleich zum Überstandsextrakt außer einigen Fettbestandteilen keine unterschiedlichen Zonen enthielt. Der Überstandsextrakt selbst zeigte einige Zonen, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz interessante Färbungen ergaben. In den mikrobiologischen Hemmtests gab es deutlichere Unterschiede: der Überstandsextrakt zeigte eine schwache bis mittlere Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, wohingegen der Mycel-extrakt das Wachstum von *Mucor miehei* stark hemmte.

Aus der aktiven Fraktion IV des Überstandsextraktes konnten durch PDC und HPLC lediglich die schon bekannten Diketopiperazine *cyclo*(Phe-Pro) (27) und *cyclo*(Pro-Tyr) (42) isoliert werden.

Indol

In Fraktion V war eine unpolare Zone enthalten, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure eine intensiv orange und mit Ehrlichs Reagenz eine violette Färbung ergab. Mit Hilfe des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums und der Molmasse (EI-MS) wurde sie als Indol (**45**) identifiziert. **45** wurde noch einmal aus dem Mycelextrakt isoliert, weil durch eine Bioautographie mit *Mucor miehei* in diesem R_f -Bereich die Aktivität detektiert wurde.

(R)-(+)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol

Aus Fraktion VII wurde eine mittelpolare Substanz isoliert, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure braunorange anfärbte. Ihr $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte die typischen Aromatensignale eines in Position 3 substituierten Indols. Im Vergleich zu den Signalen zweier Methingruppen bei $\delta = 4.79$ und 4.49 waren die Intensitäten jedoch doppelt so groß. Außerdem waren zwei Signale des dem Stickstoff benachbarten Protons bei $\delta = 7.43$ und 7.29 zu sehen, so daß offensichtlich zwei Indolreste in sehr ähnlicher Weise in das Molekül eingebunden waren. Zusätzlich deutete ein Multipllett bei $\delta = 3.56$ auf weitere vier Protonen hin, von denen zwei austauschbar waren. Nach dem Austausch der Protonen durch Deuterium verwandelte sich das Multipllett in das ABX-Signal einer Methylengruppe.

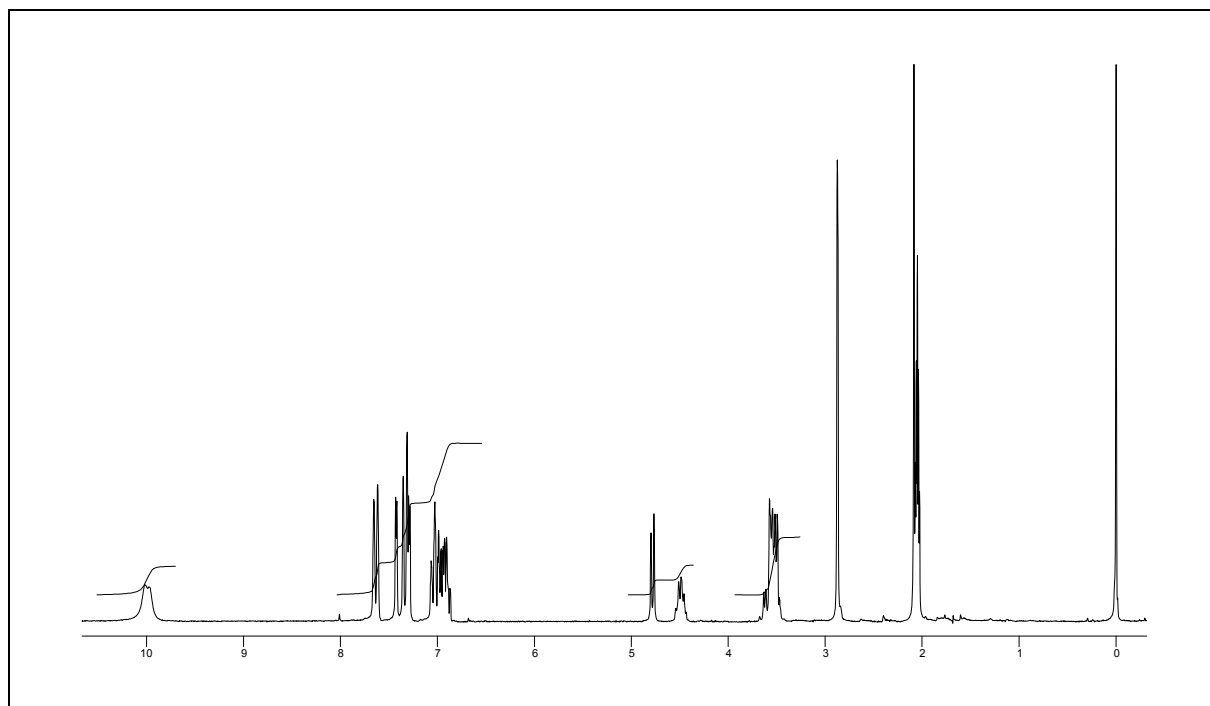
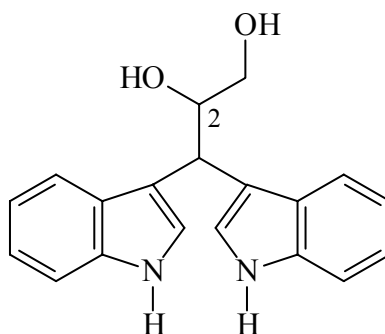


Abbildung 23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (200 MHz) von (R)-(+)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

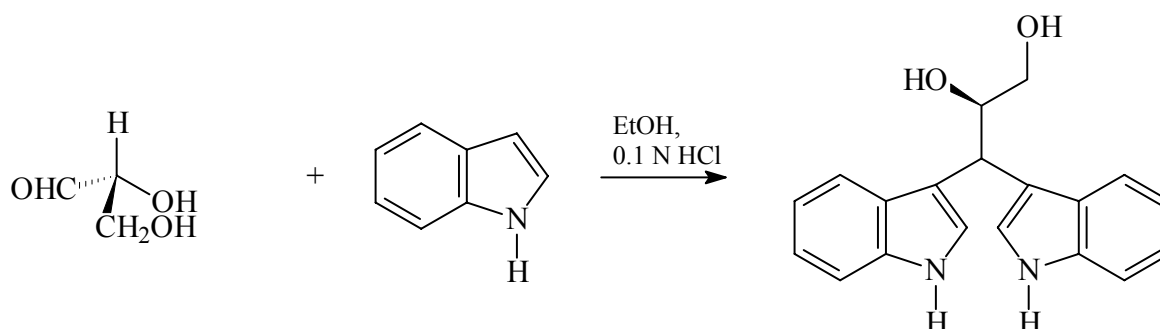
Die Molmasse der Verbindung wurde EI-massenspektrometrisch zu 306 Da bestimmt. Falls das Molekül zwei Indolreste, zwei Methin- und eine Methylengruppe enthält, verblieben noch 34 Da, die zusammen mit den beiden austauschbaren Protonen auf zwei Hydroxygruppen hinwiesen. Die sich daraus ergebende Summenformel $C_{19}H_{18}N_2O_2$ konnte durch hochauflösende Massenspektrometrie (EI-MS) bestätigt werden. Da eine Datenbankrecherche in Anti-Base keine Lösung ergab und die Verknüpfung der Komponenten noch nicht geklärt war, wurden ^{13}C -NMR- und HMBC-NMR-Spektren gemessen. Die einzige weitere dadurch erhaltene Information aus einer Kopplung des Protons bei $\delta = 4.79$ mit verschiedenen Kohlenstoffkernen aus den Indolresten war, daß die Indolringe direkt mit dieser Methingruppe verknüpft sein mußten. Die erwarteten Kopplungen in der Seitenkette waren nicht zu sehen, weshalb erst über ein H,H-COSY-Spektrum die restlichen Konnektivitäten zugänglich waren. Bei der vorliegenden Verbindung handelte es sich danach um das Indolalkaloid 3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**). Eine Suche im Dictionary of Natural Products[®] ergab, daß **46** bereits 1977 aus dem Pilz *Balansia epichloë* isoliert worden war.^[76]

**46**

Aufmerksamkeit erregte der Pilz, weil Rinder beim Fressen von befallenem Weidegras beide Formen des Ergotismus entwickelten. Bei gangränösem Ergotismus treten erst ein Kribbeln, Taubheitsgefühl und dann sehr schmerzhaft arterielle Durchblutungsstörungen auf, die schließlich zu Gangrän führen können: einer Zersetzung von abgestorbenem Gewebe durch Fäulnisbakterien. Konvulsiver Ergotismus äußert sich durch Krämpfe, Störungen des Zentralnervensystems und beim Menschen durch Persönlichkeitsveränderungen. Diese Vergiftungserscheinungen sind von Mutterkornalkaloiden bekannt und führten in früheren Jahrhunderten durch die Verwendung von befallenem Getreide beim Menschen zu Massenvergiftungen.^[77, 78]

Im Test mit Hühnerembryos erreichten PORTER *et al.* mit einer Konzentration von 99 $\mu\text{g}/\text{Ei}$ eine hundertprozentige Tötungsrate.^[76]

46 enthält an Position 2 ein Stereozentrum. Um aufzuklären, welches der beiden Stereoisomeren vorlag, wurde das (R)-Enantiomer synthetisiert, indem man in einer Kondensationsreaktion D-Glyceraldehyd mit Indol umsetzte.



Die Drehwerte des isolierten Naturstoffs und des Syntheseprodukts waren nahezu identisch, d. h. **46** besitzt (R)-Konfiguration.

Die Indolsubstituenten sind chemisch in gleicher Weise im Molekül gebunden, und daher wäre zu erwarten, daß deren Protonen magnetisch äquivalent sind. Zum großen Teil ist das auch der Fall, wie man an der Überlappung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale im aromatischen Bereich sieht. Allein die Protonen in Position 2 der Indolringe scheinen sich magnetisch in verschiedenen Umgebungen zu befinden, denn ihre Signalverschiebungen unterscheiden sich um $\delta = 0.14$. Die Ursache für diesen Unterschied ist vermutlich in einer Einschränkung der freien Drehbarkeit an C-3 zu suchen. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde die energieärmste Konformation des Moleküls mit semiempirischen Methoden berechnet. Ein signifikanter sterischer Unterschied der beiden relevanten Protonen war jedoch nicht zu erkennen.

Extrakt II

Um die Produktion der Biomasse des Stammes HEL 45 zu steigern, wurden in der Arbeitsgruppe von Lang in Braunschweig umfangreiche Experimente mit Nährmedienzusammensetzungen durchgeführt. Dabei wurde zunächst vergeblich versucht, ein Minimalmedium zu finden, weshalb man sich im folgenden auf die Variation des ursprünglich verwendeten tryptonhaltigen Mediums konzentrierte. Am Ende erwies sich eine Reduzierung des Tryptonanteils auf 20 % und die Zugabe von L-Tryptophan als beste Alternative. Mit dem optimierten Medium inkubierte man den Stamm im 40-l-Maßstab 46 h und arbeitete in gleicher Weise wie beim ersten Mal auf (s. Abb. 24).

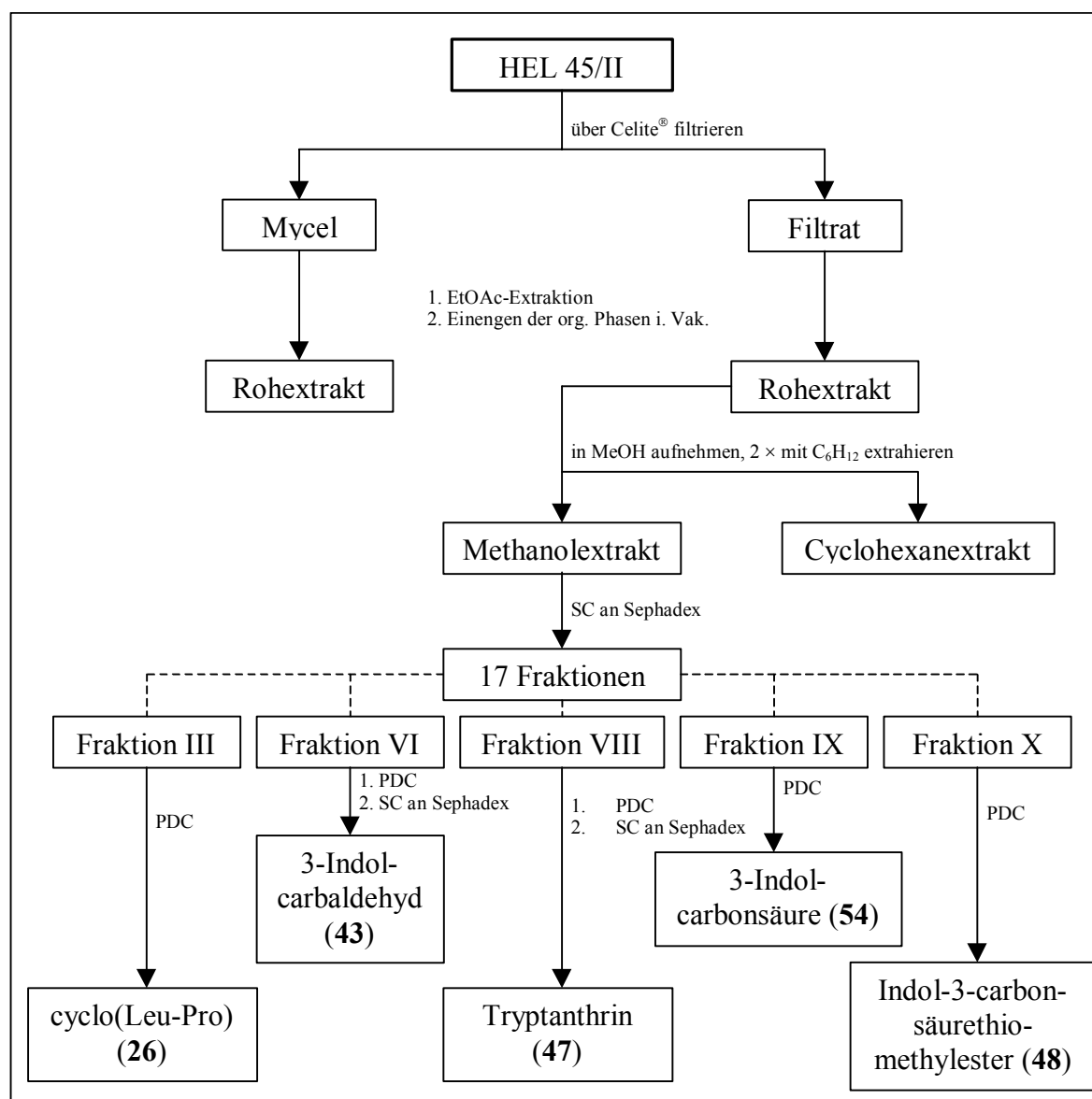


Abbildung 24: Aufarbeitungsschema für Stamm HEL 45/II

cyclo(Leu-Pro) und 3-Indolcarbaldehyd

Aus Fraktion III wurde ein weißer Feststoff isoliert, der durch den Vergleich seines ¹H-NMR-Spektrums mit vorhandenen Daten als *cyclo(Leu-Pro)* (**26**) identifiziert wurde. Bei der aus Fraktion VI isolierten Verbindung konnte der Verdacht, daß es sich um 3-Indolcarbaldehyd (**43**) handelt, durch ¹H-NMR- und EI-Massenspektrum bestätigt werden.

Tryptanthrin

Fraktion VIII zeigte in Hemmtests mittlere Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Chlorella sorokiniana* und im Dünnschichtchromatogramm eine unpolare zitronengelbe Substanz. Ihr

^1H -NMR-Spektrum zeigte ausschließlich die aromatischen Signale von insgesamt acht Protonen. Zu erkennen waren drei Dublettsignale bei $\delta = 8.60$, 8.41 und 8.01 mit Kopplungskonstanten von ca. 8 Hz, die für *ortho*-Kopplungen typisch sind. Außerdem enthielt das Spektrum zwei Triplettsignale bei $\delta = 7.61$ und 7.40 und ein Multiplett bei $\delta = 7.83$.

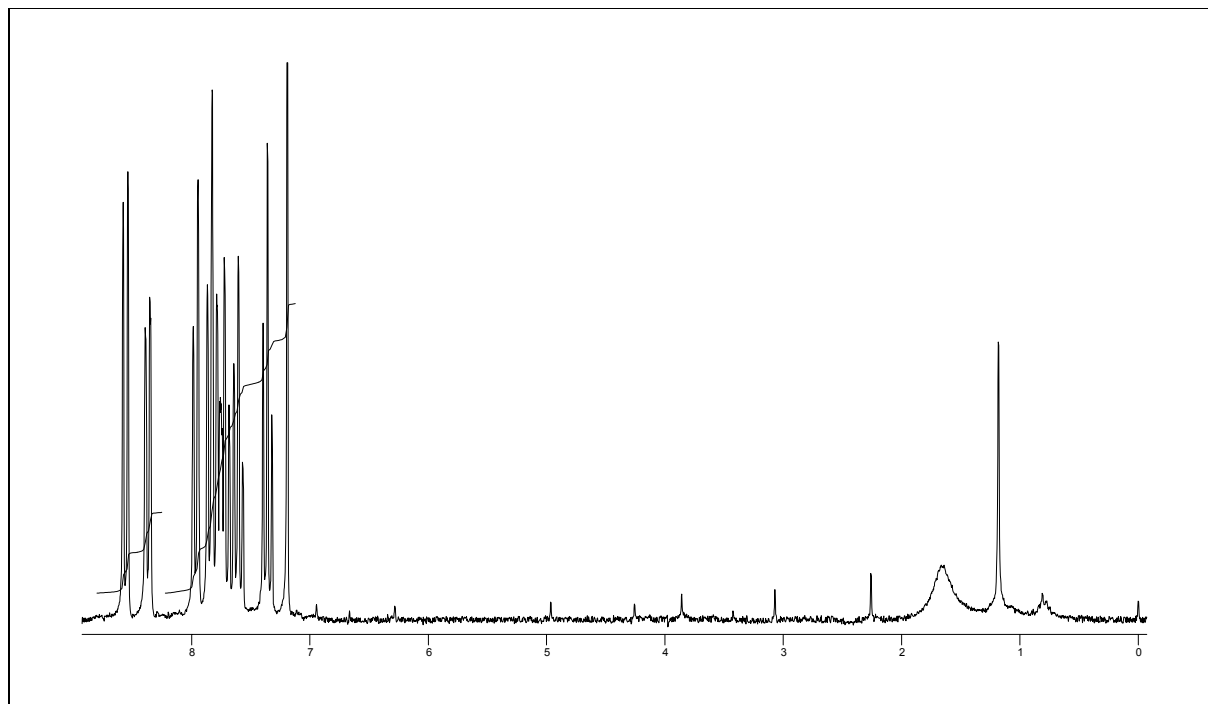


Abbildung 25: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von Tryptanthrin (**47**) in CDCl_3

Zusammen mit der massenspektrometrisch bestimmten Molmasse (DCI-MS) von 248 Da wurde eine Struktursuche in AntiBase durchgeführt, die als einzig bekanntes Ergebnis Tryptanthrin (**47**) lieferte.

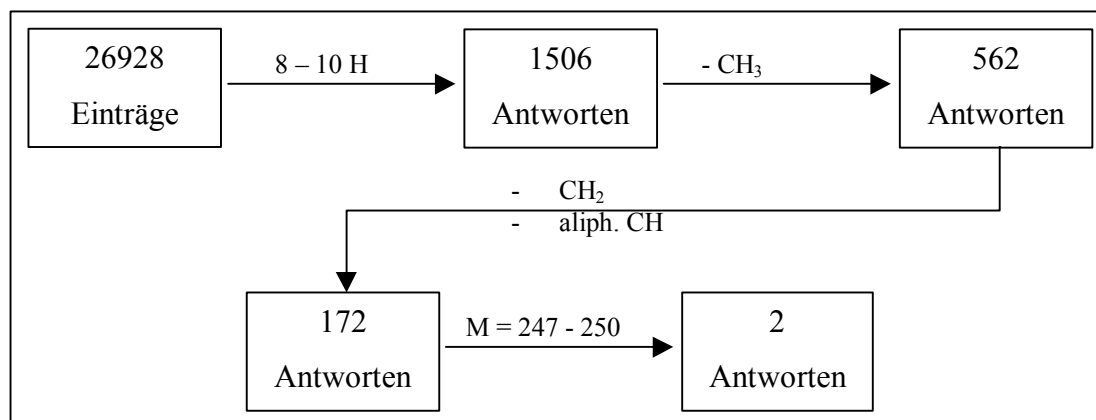


Abbildung 26: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von Tryp-
tanthrin (**47**)

Diese Verbindung war kurz zuvor in der Arbeitsgruppe schon einmal isoliert worden, so daß über einen Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren das Resultat verifiziert werden konnte.

3-Indolcarbonsäure

Fraktion IX enthielt ein weiteres Indolderivat, wie durch die Orangefärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure und die Vioettfärbung mit Ehrlichs Reagenz leicht zu erkennen war. Mit der Molmasse und dem EI-MS-Fragmentierungsmuster wurde die Verbindung als 3-Indolcarbonsäure (**54**) identifiziert.

Indol-3-carbonsäurethiomethylester

In der aus Fraktion X isolierten Substanz wurde aus den gleichen Gründen wie bei **54** ein an Position 3 substituiertes Indolderivat vermutet. Erwartungsgemäß enthielt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum deren typisches Kopplungsmuster. Das einzige zusätzliche Signal war das Singulett einer Methylgruppe bei $\delta = 2.41$, was auf den ersten Blick als das Signal einer Acetylgruppe gedeutet werden könnte. Die Molmasse (EI-MS) war jedoch für 3-Acetylintol zu hoch. Da der Indolrest nur einfach substituiert war, konnte die Methylgruppe nicht direkt an diesen gebunden sein. Eine Methylsubstitution am Indolstickstoff würde laut ACD ein Signal zwischen $\delta = 3.40$ - 3.80 liefern.

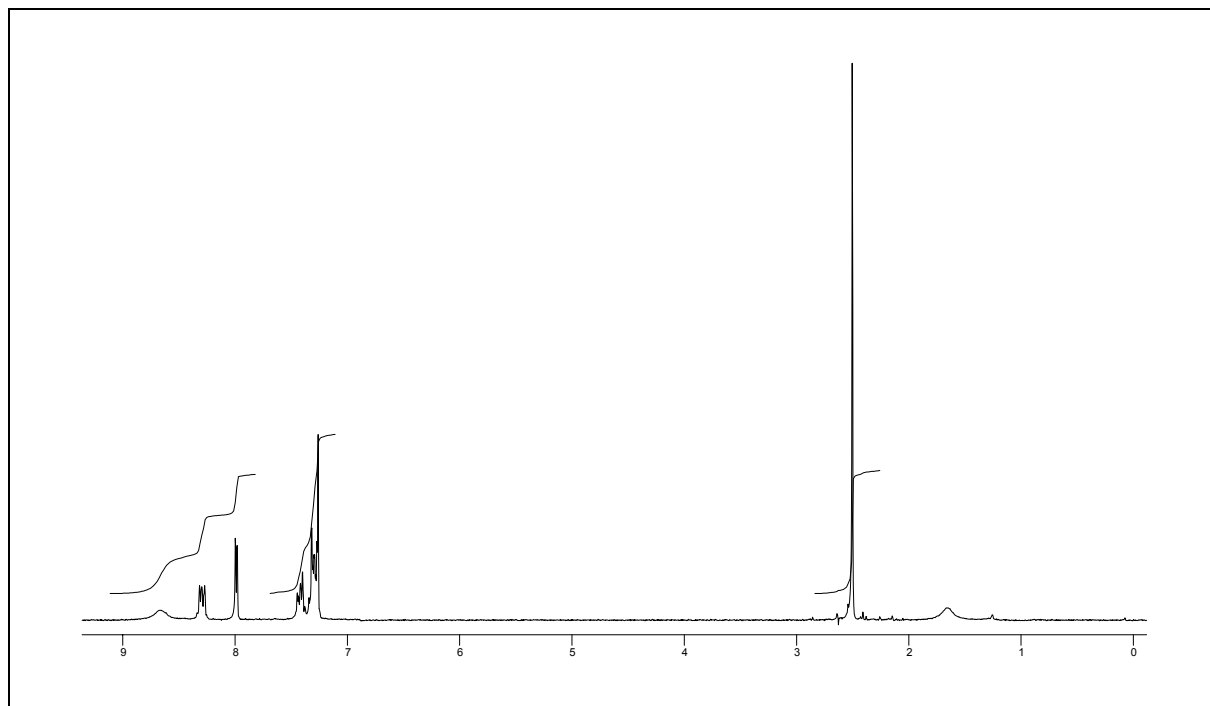
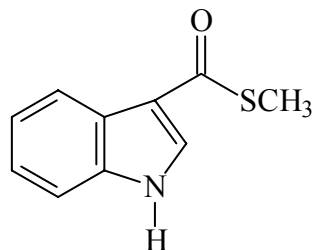


Abbildung 27 : ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Indol-3-carbonsäurethiomethylester (**48**) in $[\text{D}_6]$ Aceton

Bei genauerer Betrachtung des Molpeaks im EI-Massenspektrum fiel ein zweiter Peak bei 193 Da auf, möglicherweise ein Isotopensignal. Falls die gesuchte Verbindung Schwefel enthielte, würde ein solcher Peak mit einer auf das erste Isotopensignal bezogenen Intensität von $1/10$ zu sehen sein. Ein weiterer Hinweis auf Schwefel war die erste Fragmentierung, die ein um 47 Da leichteres Bruchstück erzeugte. Dieses wurde schon häufig bei der Abspaltung eines Thiomethylfragmentes beobachtet. Eine auf diese Weise gebundene Methylgruppe könnte im ^1H -NMR-Spektrum ein Singulett bei $\delta = 2.41$ hervorrufen, während in Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom das Signal bei $\delta = 3.0 - 3.3$ erscheinen würde. Als weiteren Nachweis für Schwefel dienten Hexachloroplatinat in Verbindung mit Kaliumiodid und ein Fluorescein/Succinimid-Sprühreagenz. Beide Tests mit der vorliegenden Verbindung waren positiv: Mit dem ersten Reagenz bildete sich ein brauner Fleck auf dem Dünnschichtchromatogramm und mit dem zweiten färbte sich das gesamte Chromatogramm rötlich bis auf die mit der Substanz behafteten Stelle. Ein dritter Test mit einer NaN_3/Iod -Lösung in Kombination mit Stärke erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse.

Durch Addition der Massen des Thiomethyl- und Indolrestes verblieb zur Gesamtmasse noch eine Differenz von 28 Da, die dem Gewicht einer Carbonylgruppe entspricht. Daraus wurde geschlossen, daß als einzig mögliche Struktur Indol-3-carbonsäurethiomethylester (**48**) in

Frage kam. Die daraus resultierende Summenformel konnte durch hochauflösende EI-Massenspektrometrie bestätigt werden. Als Naturstoff war **48** vorher noch nicht bekannt, wohl aber als Syntheseprodukt.^[79] Ein Test der Verbindung gegen Tumorzelllinien bei Prof. Beil in Hannover blieb leider ohne Erfolg.

**48**

Stamm B 4481

Der Extrakt des marinen Streptomyceten B 4481 fiel bei der Firma Oncotest im Screening gegen Krebszelllinien durch eine Wachstumshemmung selbst bei geringsten Konzentrationen auf. Im mikrobiologischen Screening zeigte er ebenfalls beachtliche Aktivität gegen fast alle Testorganismen. Obwohl die gewonnenen Rohextrakte, welche durch Extraktion der Kulturbrühe mit Ethylacetat aus einer 20-l-Fermentation und einer 15-l-Schüttelkultur gewonnen wurden, in den Hemmtests nur noch mäßige Aktivität zeigten, wurden sie einer Analyse unterzogen. Dazu vereinigte man die Rohextrakte und entfettete mit Cyclohexan.

Anschließend wurde der Methanolextrakt durch Hochgeschwindigkeits-Gegenstrom-Verteilungschromatographie (High-speed-countercurrent-coil-chromatography, HSCCC) aufgetrennt. Bei dieser Methode findet eine Verteilung des gelösten Substanzgemisches zwischen zwei flüssigen Phasen statt. Die dafür verwendbaren Lösungsmittelgemische müssen sich nach dem Mischen in einem Gefäß innerhalb von wenigen Sekunden wieder entmischen, denn in den eingesetzten Geräten werden diese Vorgänge sehr schnell durchlaufen. Zwei-Phasen-Systeme, die sich langsam entmischen, würden in diesen Zeitintervallen zu wenig Veränderung erfahren und somit nur eine schlechte Verteilung liefern. Geeignete Systeme enthalten meist Cyclohexan oder Chloroform als unpolare und Wasser als polare Komponente. Die Durchmischung dieser Lösungsmittel wäre allerdings zu gering, so daß noch sogenannte Mediatoren wie Methanol, Ethylacetat oder Aceton hinzugefügt werden. Folglich kommen in der Regel ternäre oder quartäre Lösungsmittelgemische zum Einsatz. Bei spezifischen Trennproblemen sollten sich die zu trennenden Substanzen möglichst gleich in beiden Phasen lösen, was einige Vorversuche zur Bestimmung eines geeigneten Systems erfordert.

Zur Vortrennung des hier gewonnenen Rohextraktes wurde ein Standardsystem eingesetzt, das aus Cyclohexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (3:2:2:3) bestand.

Ein für die HSCCC benötigtes Gerät enthält einen Teflonschlauch kleineren Durchmessers, der nach dem Prinzip der archimedischen Schraube zu einer Spule aufgewickelt wurde. Die Spule ist auf einem Drehteller exzentrisch gelagert und besitzt eine zusätzliche eigene Drehachse. Abhängig davon, ob die schwere oder die leichte Phase des Laufmittelsystems als stationäre dienen soll, wird die Spule links oder rechts herum gedreht. Bei optimaler Drehgeschwindigkeit und Flußrate der fließenden Phase erfährt die stationäre Phase eine gerade ausreichende Kraft entgegen der Flußrichtung, so daß sie im Schlauch verbleibt, während die andere austritt. An diesem Punkt wird das vorher gelöste Substanzgemisch über ein Einlaßsystem in den Teflonschlauch gespült. Durch die Rotation der Spule werden die Phasen im Schlauch je nach Position beschleunigt oder gebremst, wodurch ein Mischen und Entmischen der beiden Phasen bewirkt wird. Dieser Vorgang wird ca. eintausendmal pro Minute durchlaufen. Nach zwei- bis dreistündiger Trennzeit wird die Drehung gestoppt und die daraufhin ausfließende stationäre Phase ebenfalls in Fraktionen getrennt aufgefangen.

Aus der ersten von vier Fraktionen gewann man durch präparative HPLC 7.1 mg eines weißen Feststoffes.

Germicidin

Das ^1H -NMR-Spektrum enthielt das Singulett eines nicht austauschbaren Protons bei $\delta = 5.98$, das wahrscheinlich olefinisch war. Weitere aufschlußreiche Signale von drei Methylgruppen waren bei $\delta = 1.20$, 1.03 und 0.89 in Form von einem Dublett und zwei Triplets zu sehen. Daraus wurde gefolgert, daß in dem Molekül noch eine CH-CH_3 -Gruppe und zwei Ethylgruppen enthalten sein mußten. Zwei Multiplettsignale mit den fehlenden fünf Protonen waren bei $\delta = 2.42$ und 1.60 zu sehen.

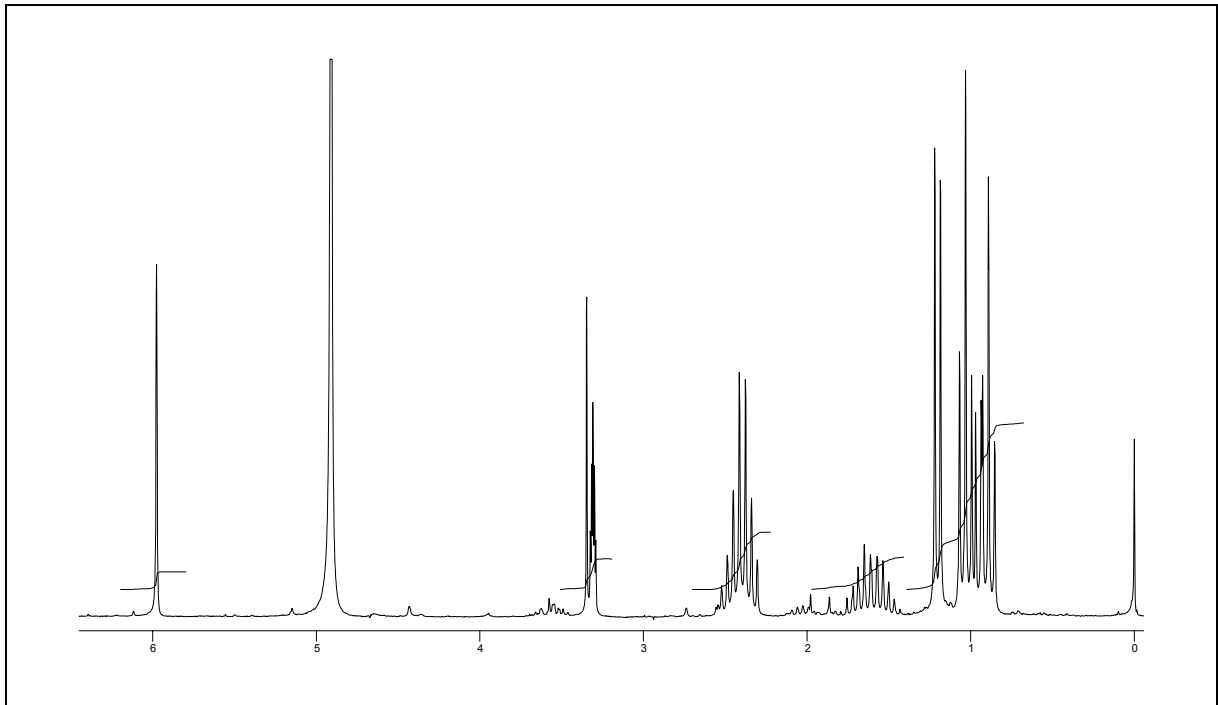


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von Germicidin (**49**) in MeOH

Eine Datenbanksuche in AntiBase mit den Informationen aus dem ^1H -NMR-Spektrum lieferte als Ergebnis Germicidin (**49**, s. Abb. 29). Die korrekte Molmasse von 196 Da wurde massenspektrometrisch (DCI) gefunden.

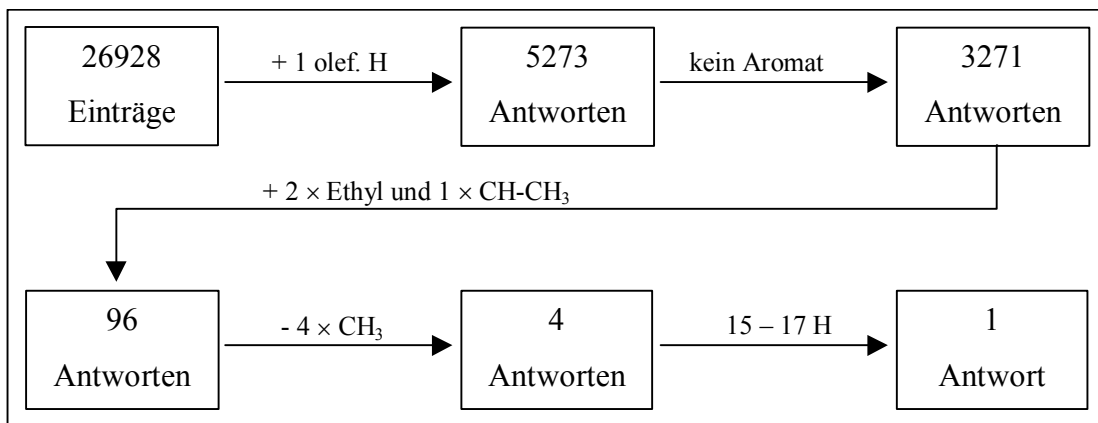
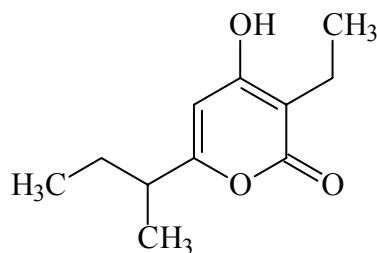


Abbildung 29: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von Germicidin (**49**)



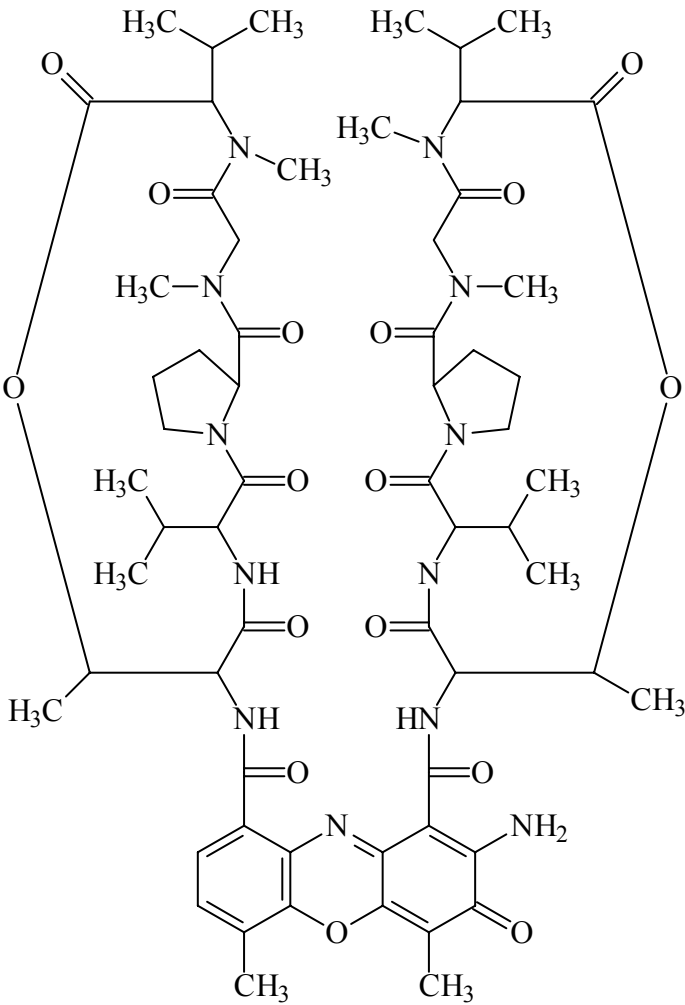
49

Germicidin (**49**) ist 1992 von ZÄHNER *et al.* aus einem *Streptomyces viridochromogenes*-Stamm erstmals isoliert worden. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß diese Verbindung schon bei geringen Konzentrationen das Keimen der Sporen hemmt und damit der erste bekannte Naturstoff mit dieser Wirkung aus einem Streptomyceten ist. Aus Pflanzen und Pilzen sind solche autoregulativen Keimungshemmer schon länger bekannt. Ihre Funktion muß aber nicht autoregulativ sein, sondern kann ebenso andere Organismen beeinflussen. In der Regel handelt es sich bei diesen Botenstoffen um Lactone und Pyrone. Interessanterweise ist die Struktur dieser Verbindungen sehr spezifisch mit der hemmenden Wirkung verknüpft. Bei **49** senkten eine Abänderung der 2-Butyl- zu einer 2-Propyl-Seitenkette, Methylierung der Hydroxygruppe oder Veränderungen im Lactonring das Wirkpotential drastisch.^[80] Germicidin wird in der Augenheilkunde antimikrobiellen Spüllösungen beigemischt.^[81]

Stamm B 4710

Der marine Streptomycet B 4710 fiel ebenfalls durch seine Aktivität im Screening gegen Krebszelllinien der Firma Oncotest auf, weshalb er im 50-l-Maßstab fermentiert wurde. Das weiße Mycel der Kulturbrühe wurde durch Filtration vom Überstand abgetrennt und beide Teile erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Rohextrakte entfettete man mit Cyclohexan.

Anders als im chemischen Primärscreening zeigte der Rohextrakt im Dünnschichtchromatogramm eine orangefarbene Zone, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure rot färben ließ. Dieses Verhalten erweckte den Verdacht, daß ein in der Arbeitsgruppe schon häufiger isoliertes Actinomycin vorliegen könnte, das die Ursache für die gefundenen Aktivitäten ist. Durch eine Bioautographie mit Testkeimen ließ sich die Aktivität in der Tat der farbigen Zone zuordnen. Einen Teil des Extraktes chromatographierte man an Sephadex und erhielt eine einheitliche orangefarbene Substanz, deren Molmasse durch ESI-MS zu 1256 Da bestimmt wurde. Eine Suche in AntiBase nach einem Actinomycin mit dieser Masse lieferte Actinomycin D (**50**) als mögliche Struktur. Bestätigt wurde dies durch den Vergleich eines gemessenen ¹H-NMR-Spektrums mit einem anderen aus der Sammlung.



50

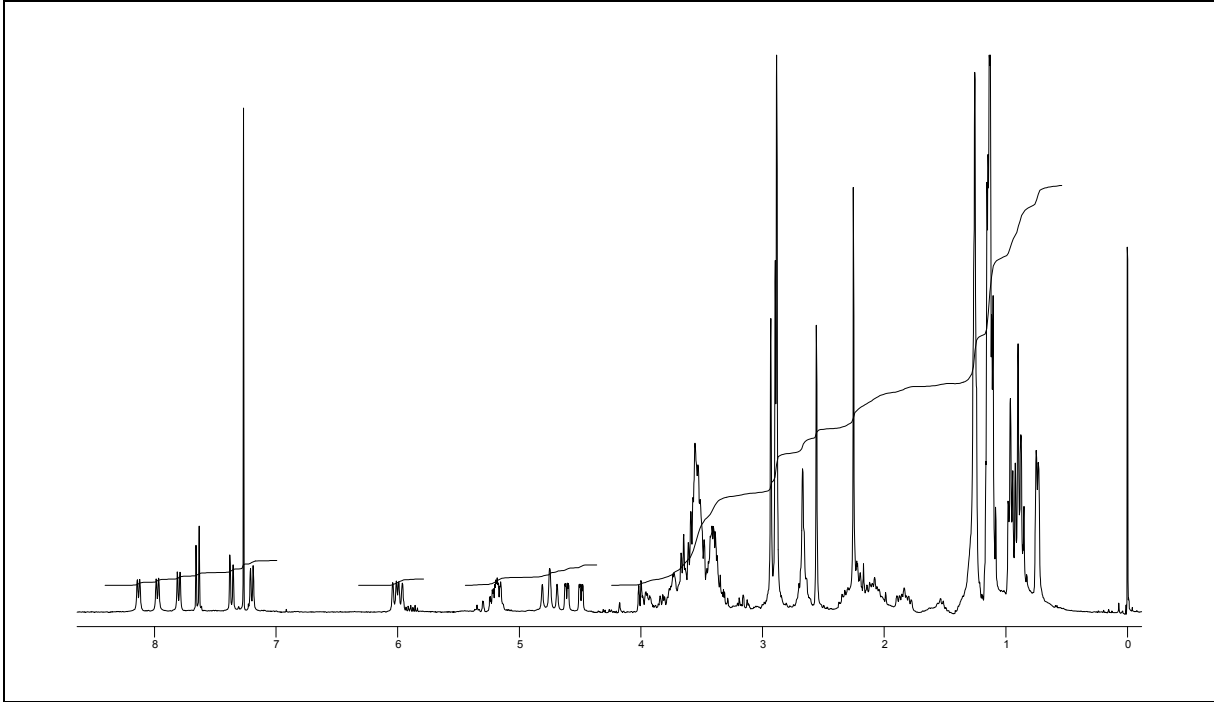


Abbildung 30: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Actinomycin D (50) in CDCl₃

Actinomycin D ist als sehr giftiger Stoff eingestuft, der über die Haut aufgenommen oder eingeatmet sogar zum Tode führen kann.^[82] Teratogene und cancerogene Folgeschäden sind ebenfalls möglich, weil der Phenoxazonrest des Moleküls zwischen zwei Guanin-Cytosin-Basenpaare einer DNA interkalieren kann. In solch einem Fall unterbrechen die nach außen stehenden Peptidreste die Transskription der DNA-Informationen durch die RNA-Polymerase, so daß betroffene Zellen nicht mehr proliferieren.^[83] Dieser Wirkmechanismus wird ausgenutzt bei der Chemotherapie einiger maligner Tumore (z. B. Weichteiltumore, Ewing-Sarkome). Actinomycin D ist dort Bestandteil einer Wirkstoffkombination.^[84]

Stamm B 7029

Der marine Streptomycet B 7029 fiel durch eine starke Aktivität gegen die Nematoden *Caenorhabditis elegans* und den Salinenkrebs *Artemia salina* auf. Die Fermentation erfolgte im 20-l-Maßstab. Mycel und Überstand wurden getrennt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte entfettete man mit Cyclohexan und trennte sie durch Chromatographie an Sephadex in vier Fraktionen. Daraus konnten durch HPLC und präparative Dickschichtchromatographie drei Substanzen isoliert werden.

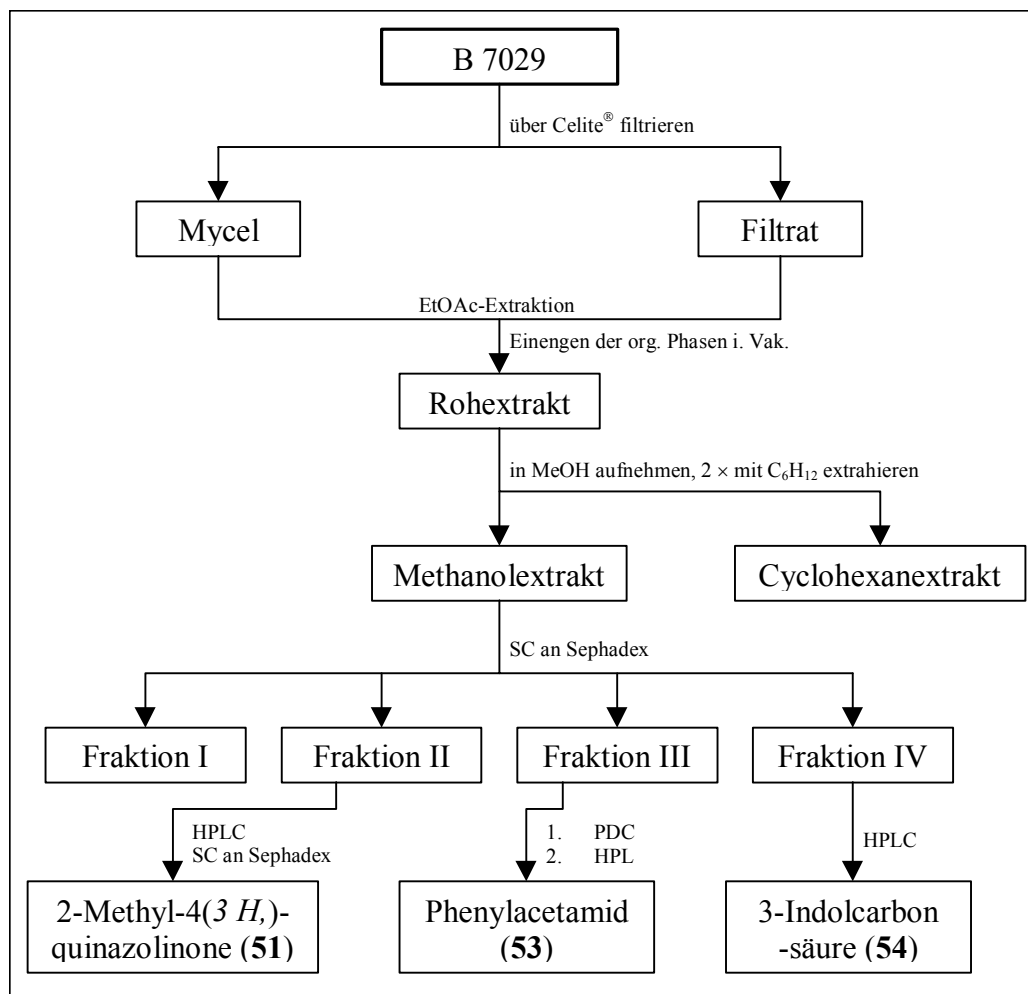


Abbildung 31: Aufarbeitungsschema des Extraktes von Stamm B 7029

2-Methyl-4(3H)-chinazolinon

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der ersten Substanz zeigte ein breites austauschbares Signal bei $\delta = 11.04$, das von dem aciden Proton einer Carbonsäure oder einer Iminogruppe in aromatischer Umgebung hervorgerufen wird. Zwei Dubletts und Tripletts aromatischer Protonen in einem Bereich von $\delta = 8.13 - 7.43$ deuteten auf einen 1,2-disubstituierten Benzolring hin. Das Singulett bei $\delta = 2.43$ gehörte wahrscheinlich zu einer Methylgruppe, die an ein Stickstoffatom oder an einen Aromaten gebunden war. Daß das Signal zu einer üblicherweise bei $\delta = 2.2 - 1.9$ zu beobachtenden Acetylgruppe gehörte, war zwar unwahrscheinlich, wurde aber nicht ausgeschlossen. Eine Datenbankrecherche mit diesen Hinweisen im Dictionary of Natural Products erbrachte als einzige Lösung 2-Methyl-4(3H)-chinazolinon (**51**).

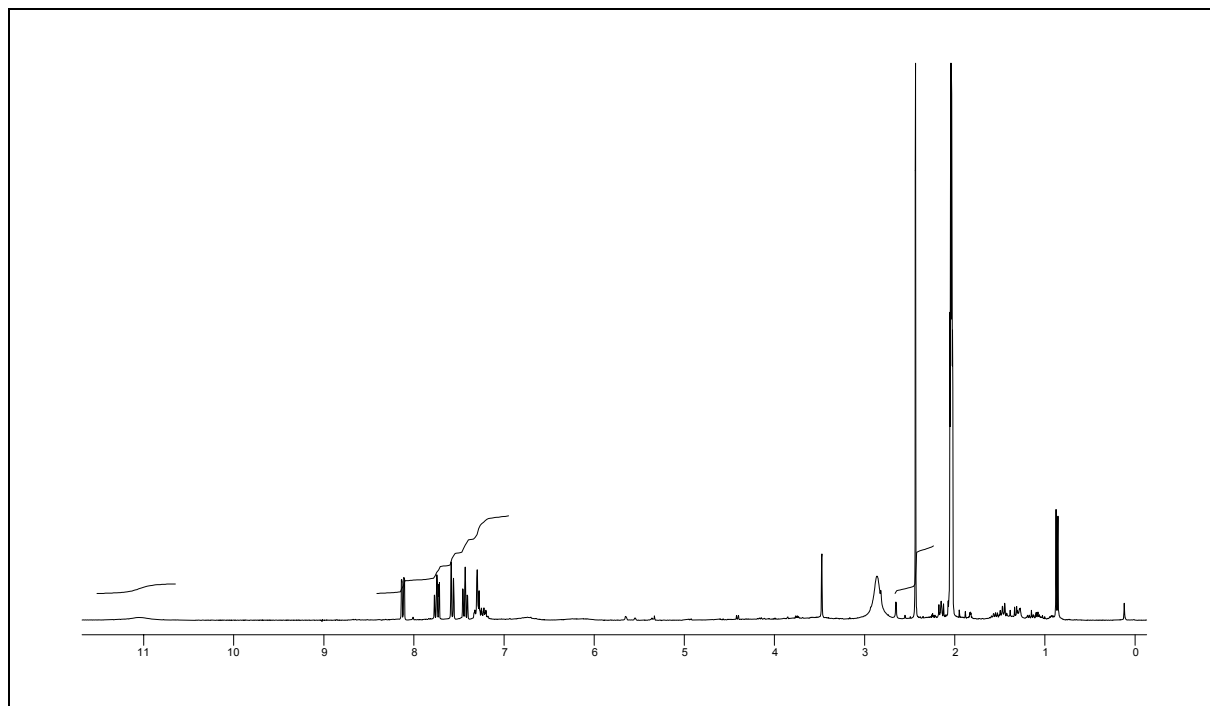
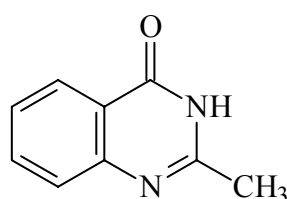
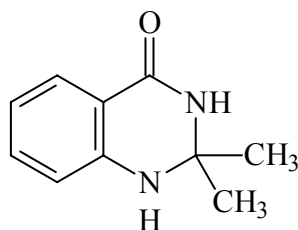


Abbildung 32: ^1H -NMR-Spektrum (200MHz) von 2-Methyl-4(3*H*)-chinazolinon (**51**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$.



51

Das Chinazolinon **51** ist ein Inhibitor der Poly(ADP-Ribose)-Synthetase.^[85, 86] Eine ähnliche Verbindung, das 2,2-Dimethyl-2,3-dihydro-(1*H*)-chinazolin-4-on (**52**), wurde in unserer Gruppe von Speitling aus einem anderen marinen Streptomyceten isoliert.^[87]



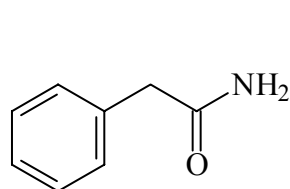
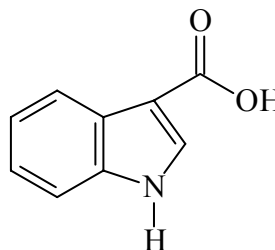
52

Phenylacetamid und 3-Indolcarbonsäure

Das EI-Fragmentierungsmuster der zweiten Substanz führte durch eine Suche in der MS-Datenbank zu drei Verbindungen, von denen nach dem Vergleich der Strukturen mit den Sig-

nalen des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums nur Phenylacetamid (**53**) als einzige mögliche Lösung übrigblieb. Mit Hilfe eines Referenzspektrums aus der Sammlung wurde das Ergebnis bestätigt.

Die dritte isolierte Verbindung wurde als 3-Indolcarbonsäure (**54**) durch die Molmasse (EI-MS) und das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identifiziert.

**53****54**

Stamm B 6003

Der Extrakt des marinen Streptomyceten B 6003 war im Screening durch eine selektive Aktivität gegen Krebszelllinien aufgefallen. Zur weiteren Untersuchung wurde der Stamm zweimal in einem 20-l-Fermenter inkubiert. Weil die Ausbeute an Rohextrakt und dessen Qualität bei der ersten Fermentation nicht zufriedenstellend waren, wurde eine zweite Anzucht nötig. Um das Wachstum des Organismus zu stimulieren, wurden der Nährlösung nach dem Autoklavieren 600 ml Dimethylsulfoxid hinzugefügt, was einem 3prozentigen Anteil an der Gesamtlösung entspricht. Chen *et al.* erreichten bei der Fermentation verschiedener Bakterienstämme mit diesem Zusatz häufig erhöhte Ausbeuten und ein verändertes Sekundärmetabolitenspektrum.^[88] Wie die zweite Fermentation aufgearbeitet und der daraus gewonnene Extrakt aufgetrennt wurde, ist in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

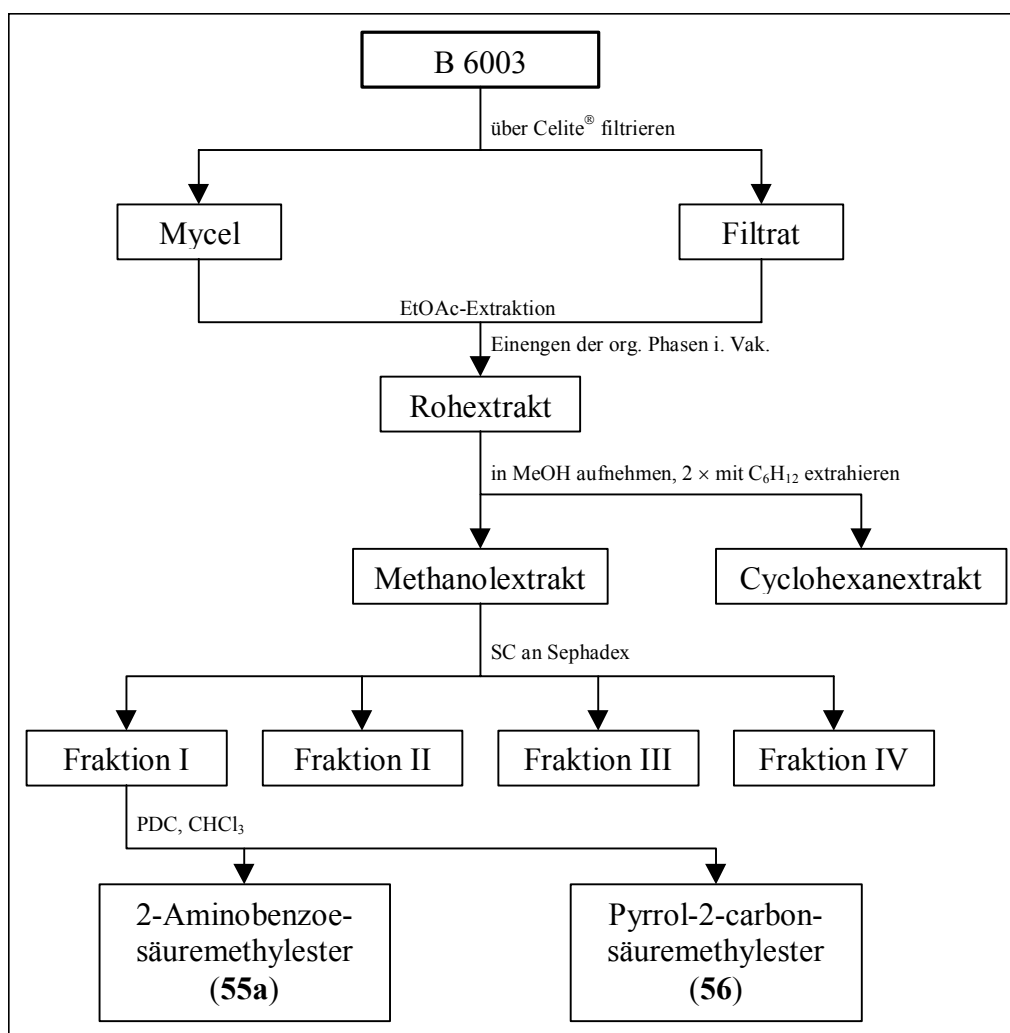


Abbildung 33: Aufarbeitungsschema für Stamm B 6003

2-Aminobenzoesäuremethylester

Aus der ersten Fraktion der Sephadexchromatographie konnten zwei Substanzen gewonnen werden, von denen die eine, nach dem ¹H-NMR-Spektrum zu urteilen, einen 1,2-disubstituierten Aromaten und eine an Sauerstoff gebundene Methylgruppe beinhaltet. Ein austauschbares Signal der Intensität 2 bei $\delta = 4.90$ deutete auf eine Aminogruppe.

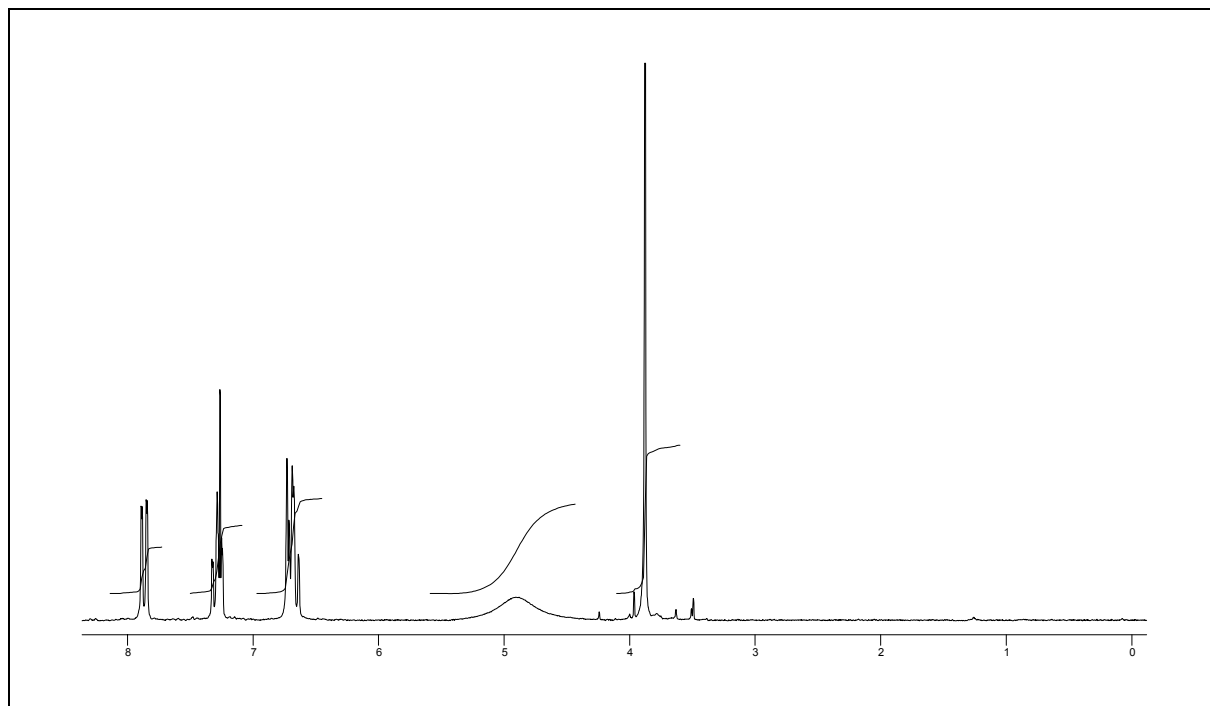


Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von 2-Aminobenzoensäuremethylester (**55a**) in CDCl_3

AntiBase lieferte bei einer Suche 27 Antworten, von denen aber 25 ausgeschlossen werden konnten, weil sie mehr als vier aromatische Protonen enthielten (s. Abb. 35). Die zwei möglichen und sehr ähnlichen Lösungen 2-Amino- (**55a**) und 2-Hydroxybenzoensäuremethylester (**55b**) blieben übrig.

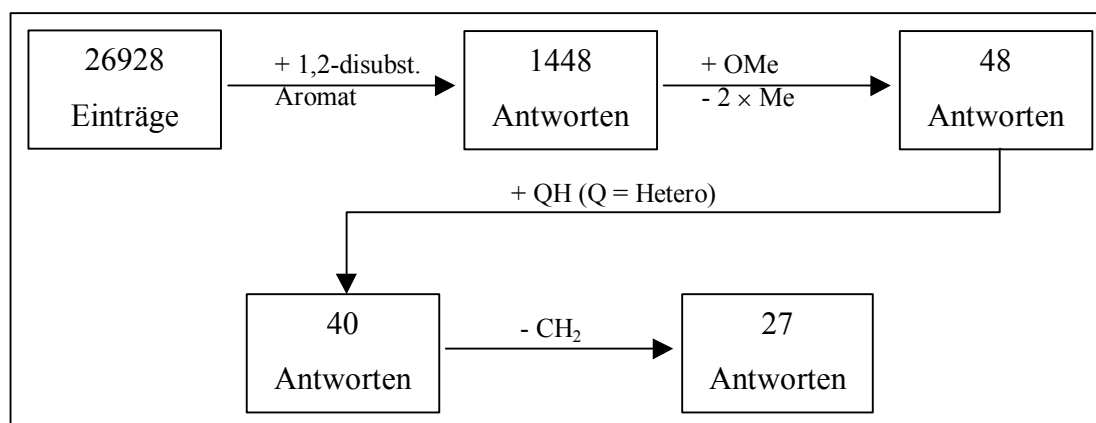
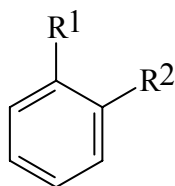


Abbildung 35: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von 2-Aminobenzoensäuremethylester (**55a**)

Eine weitere zu berücksichtigende Verbindung ist 2-Aminoanisol (**55a**), die auch alle genannten Strukturmerkmale enthält. Dagegen spricht jedoch, daß das Dublett des einen aromatischen Protons derart tieffeldverschoben bei $\delta = 7.87$ zu sehen ist. Zu erwarten wäre wegen

des elektronenschiebenden Effekts der Methoxygruppe in den Ring eine Verschiebung des Protonensignals unterhalb von $\delta = 7.24$. Durch die Bestimmung der Molmasse (EI-MS) mit 151 Da konnte **55a** schließlich als richtige Struktur identifiziert werden.



55a: $R^1 = \text{CO}_2\text{Me}$, $R^2 = \text{NH}_2$

55b: $R^1 = \text{CO}_2\text{Me}$, $R^2 = \text{OH}$

55a: $R^1 = \text{OMe}$, $R^2 = \text{NH}_2$

2-Aminobenzoesäuremethylester (**55a**) wird in der Parfümindustrie als künstlicher Orangenblütenduft verwendet.^[85]

Pyrrol-2-carbonsäuremethylester

Die zweite Substanz war schon im Rohextrakt sehr aufgefallen, weil sie sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure dunkelgrün anfärben ließ. Sie zeigte im ¹H-NMR-Spektrum nur die Signale von sieben Protonen in Form von einem Multiplett bei $\delta = 6.93$, einem Dublett vom Dublett bei $\delta = 6.26$ und dem Singulett einer Methylgruppe bei $\delta = 3.84$. Für die Struktursuche in einer Datenbank lieferte dieses Spektrum nur die eine sichere positive Information, daß eine Methylgruppe an Sauerstoff gebunden vorliegt. Die beiden Signale bei tieferem Feld sind dagegen schwerer zu interpretieren. Würden sie von Protonen hervorgerufen werden, die olefinischen Charakters sind, dann könnte man die kleinere Kopplungskonstante des Signals bei $\delta = 6.26$ von 2.6 Hz mit einer vicinalen oder einer Allylkopplung erklären. Aber die größere Kopplungskonstante von 6.1 Hz ist zu klein für eine *cis*-Anordnung, die normalerweise 10 – 12 Hz beträgt, und zu groß für die oben genannten (0 – 3 Hz). Eine weitere Ursache für die Signale könnten auch aromatische Protonen sein, die beispielsweise an einem Benzolring in einer 1,2,4-Anordnung stehen und deren Signale von geeigneten Substituenten hochfeldverschoben werden. In diesem Fall könnte das Proton in 2-Position durch eine *ortho*- und eine *meta*-Kopplung das Signal bei $\delta = 6.26$ hervorrufen, wobei eine *ortho*-Kopplungskonstante von 6.1 Hz etwas zu klein wäre. Die dritte und wahrscheinlichste Alternative ist, daß die drei Protonen an einen Heterocyclus gebunden sind. Es wäre allerdings gefährlich, bei den geschilderten Möglichkeiten eine Vorauswahl zu treffen, denn in der ¹H-NMR-Spektroskopie werden häufiger Anomalien beobachtet, die bei der Datenbankrecherche nicht berücksichtigt werden und zum Ausschluß der richtigen Struktur führen. Daher ist es besonders in diesem

Fall sinnvoller, Strukturmerkmale auszuschließen, die mit Sicherheit nicht vorhanden sind. Dazu gehören hier Methylengruppen und Protonen, die an ein sp^3 -Kohlenstoffatom gebunden sind (s. Abb. 36).

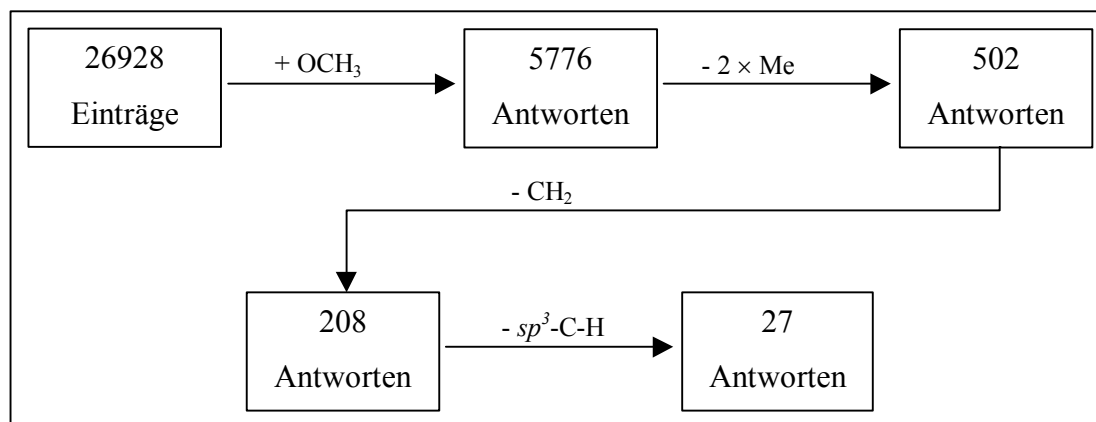
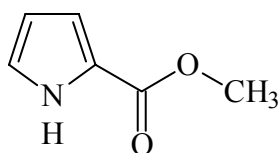


Abbildung 36: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von Pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**56**)

Mit der massenspektrometrisch bestimmten Molmasse (EI) von 125 Da und einem Vergleichsspektrum aus der Sammlung wurde die Verbindung als Pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**56**) identifiziert.



56

Stamm GW 1/1829

Der Extrakt des terrestrischen Streptomyceten GW 1/1829 zeigte eine sehr hohe cytotoxische Wirkung gegen Nematoden und hohe Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57). Auch das Wachstum von Algen wurde gehemmt. Das Dünnschichtchromatogramm enthielt fünf Zonen, die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure rotbraun anfärben ließen.

Die Kulturbrühe eines 20-l-Fermenters trennte man durch Filtration in Mycel und Filtrat, die mit Ethylacetat extrahiert wurden. Den Eindampfrückstand der vereinigten organischen Phasen entfettete man mit Cyclohexan und unterteilte durch Chromatographie an Sephadex in

sieben Fraktionen, die alle eine ähnlich hohe antibiotische Aktivität aufwiesen. Die weitere Auftrennung erfolgte wie in Abb. 37 dargestellt.

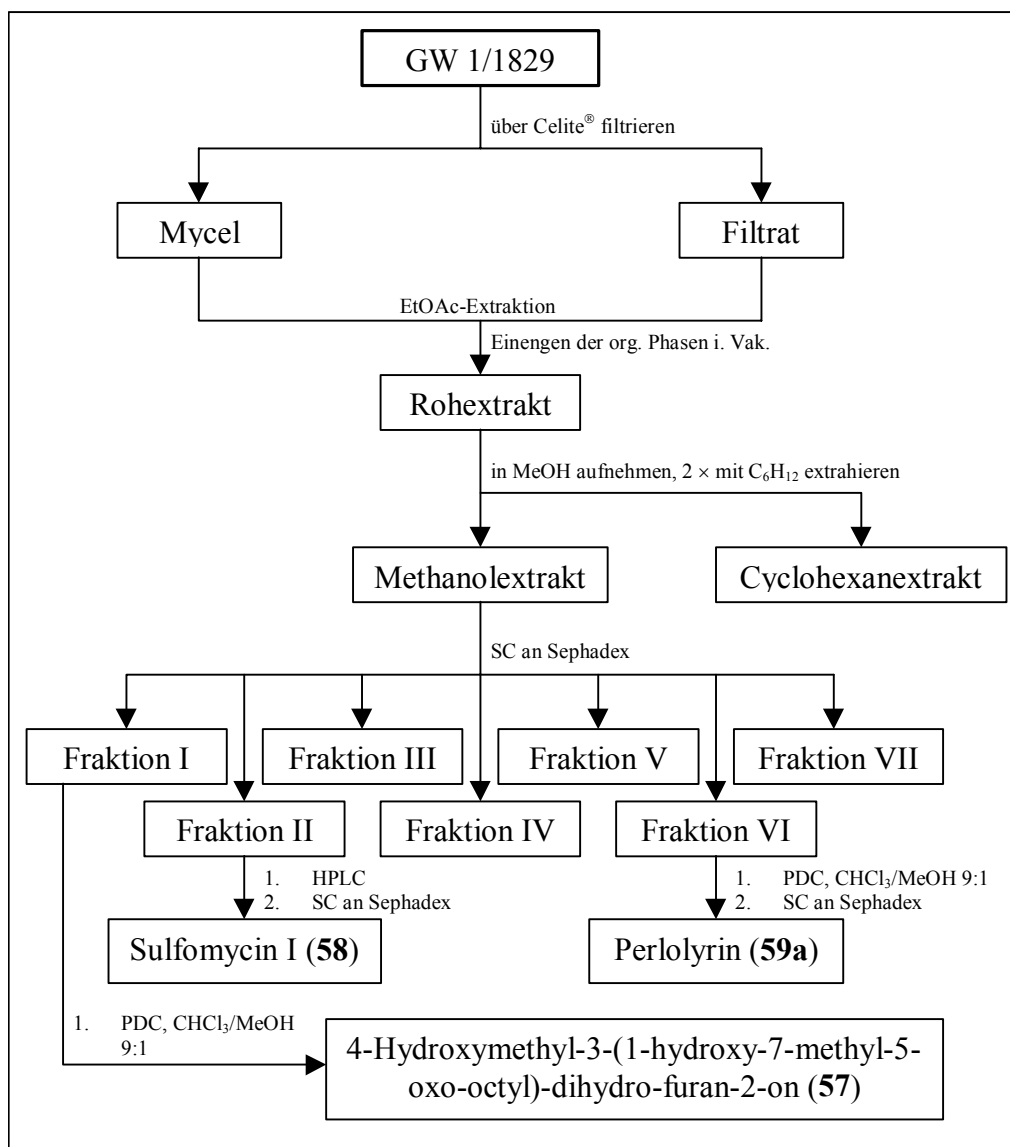


Abbildung 37: Aufarbeitungsschema für Stamm GW 1/1829

4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on

Die aus Fraktion I isolierte Substanz ließ sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure gelb anfärben, zeigte aber in Gegenwart von Ehrlichs Reagenz keine Farbreaktion. Dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war zu entnehmen, daß keine Signale oberhalb von $\delta = 4.35$ zu sehen waren und somit die Verbindung keine aromatischen und olefinischen Protonen enthielt. Ein Dublett mit der Intensität 6 deutete auf eine Isopropylgruppe im Molekül hin.

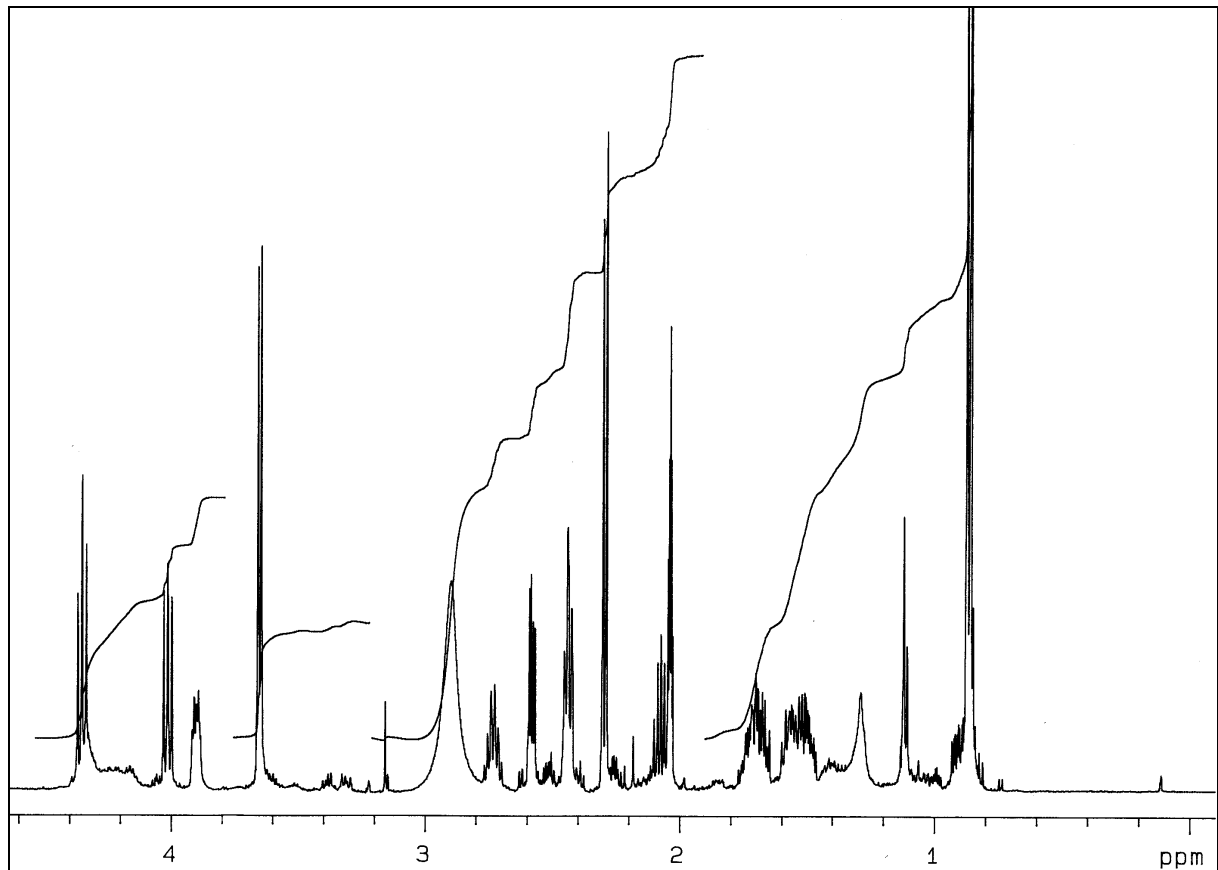


Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) in $[\text{D}_6]$ Aceton

Die Molmasse der Verbindung wurde durch Elektrospray-Massenspektrometrie mit 272 Da bestimmt. Die Summenformel konnte jedoch nur indirekt bestimmt werden, weil bei der EI-Messung nur eine Molmasse von 254 Da gemessen wurde, was vermutlich in der Abspaltung von Wasser begründet ist. Deshalb wurde aus der Summenformel des Fragmentes $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_4$ auf die tatsächliche Zusammensetzung $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_5$ geschlossen.

Mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum konnte die Zahl von 14 Kohlenstoffatomen bestätigt werden. Außerdem war das Signal eines Carbonylkohlenstoffs bei $\delta = 210$ zu erkennen, das zu einer Ketogruppe gehören mußte, und eines bei $\delta = 178$ deutete auf eine Carboxylgruppe hin.

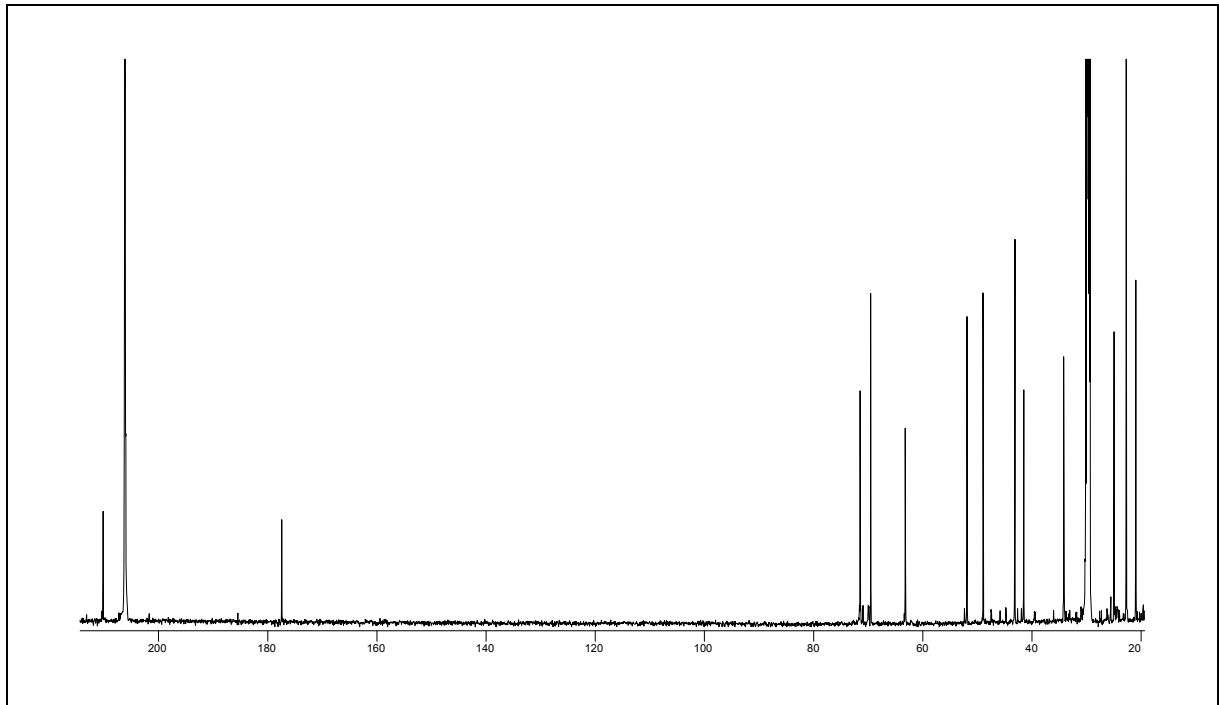
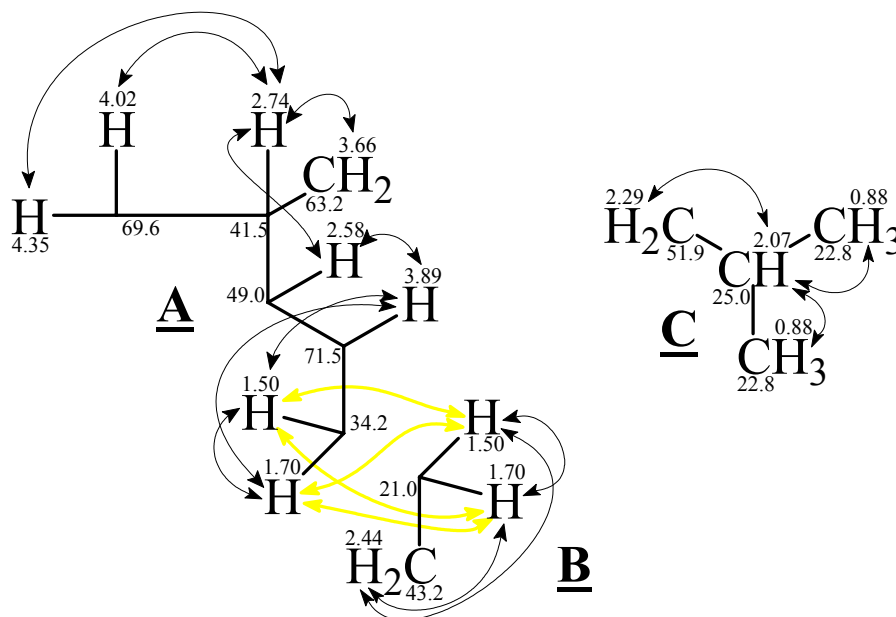


Abbildung 39: ^{13}C -NMR-Spektrum (500 MHz) von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

Da im ^1H -NMR-Spektrum zu sehen war, daß viele Protonen miteinander koppelten, wurde im folgenden ein H,H-COSY -Spektrum aufgenommen, aus dessen Kopplungen sich fast alle Konnektivitäten ableiten ließen:



Die zwischen den Fragmenten A und B grau gezeichneten Pfeile sollen andeuten, daß diese Zuordnungen durch Signalüberlagerungen nicht eindeutig zuzuordnen waren.

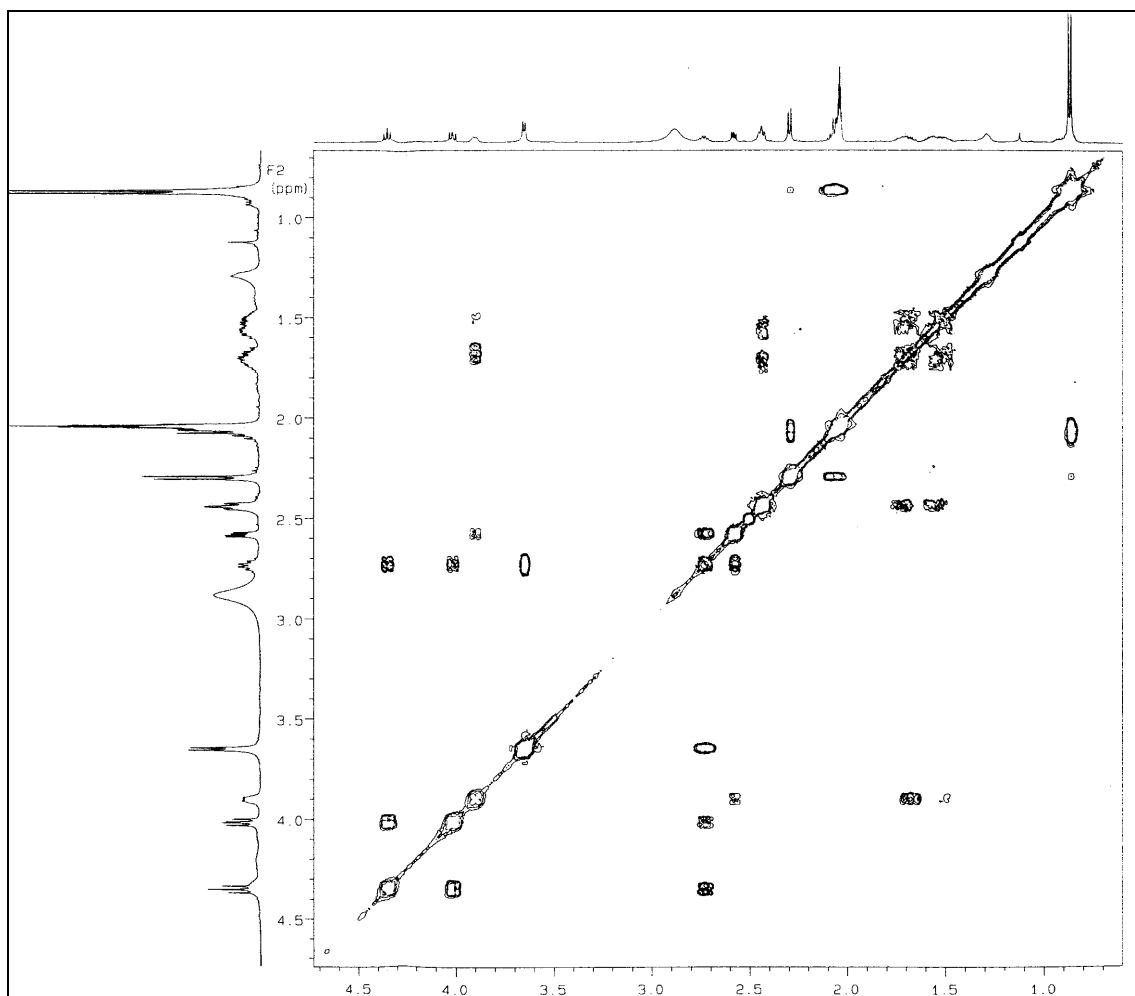


Abbildung 40: H,H-COSY-NMR-Spektrum (600 MHz) von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) in $[D_6]$ Aceton

Durch ein zweidimensionales nJ -korreliertes Spektrum (HMBC-NMR) konnten die aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum ersichtliche Ketogruppe und die Carboxylgruppe zugeordnet werden. Die Protonen der Methylengruppe bei $\delta = 4.35/4.02$ und ein Proton bei $\delta = 2.58$ zeigten Kopplungen auf den Carboxylkohlenstoff. Aufgrund der ^{13}C - und 1H -Verschiebungen kann die Verknüpfung nur in der unten gezeigten Weise erfolgen.

Auf den Carbonylkohlenstoff bei $\delta = 210$ zeigten nur die Protonen zweier Methylengruppen bei $\delta = 2.44$ und 2.29 Kopplungen. In beiden Fällen mußte es sich um 2J -Kopplungen handeln, weil im Falle einer umgekehrten Verknüpfung des Ethylenfragmentes an die Carbonylgruppe Protonen mit einer für diese Umgebung zu geringen Verschiebung von $\delta = 1.5/1.7$ gebunden wären und weil es für die zweite Methylengruppe bei $\delta = 2.29$ in Verbindung mit den Daten aus dem H,H-COSY-Spektrum keine andere Möglichkeit der Anbindung gibt. 3J -Kopplungen waren an dieser Stelle erstaunlicherweise nicht zu sehen.

Die Verknüpfung der beiden Methylengruppen, deren Protonen beide Signale bei $\delta = 1.5$ und 1.7 liefern, konnte durch die HMBC-NMR-Kopplungen bestätigt werden. In der nachfolgenden Abbildung wurden nur die hier besprochenen Kopplungen eingezeichnet.

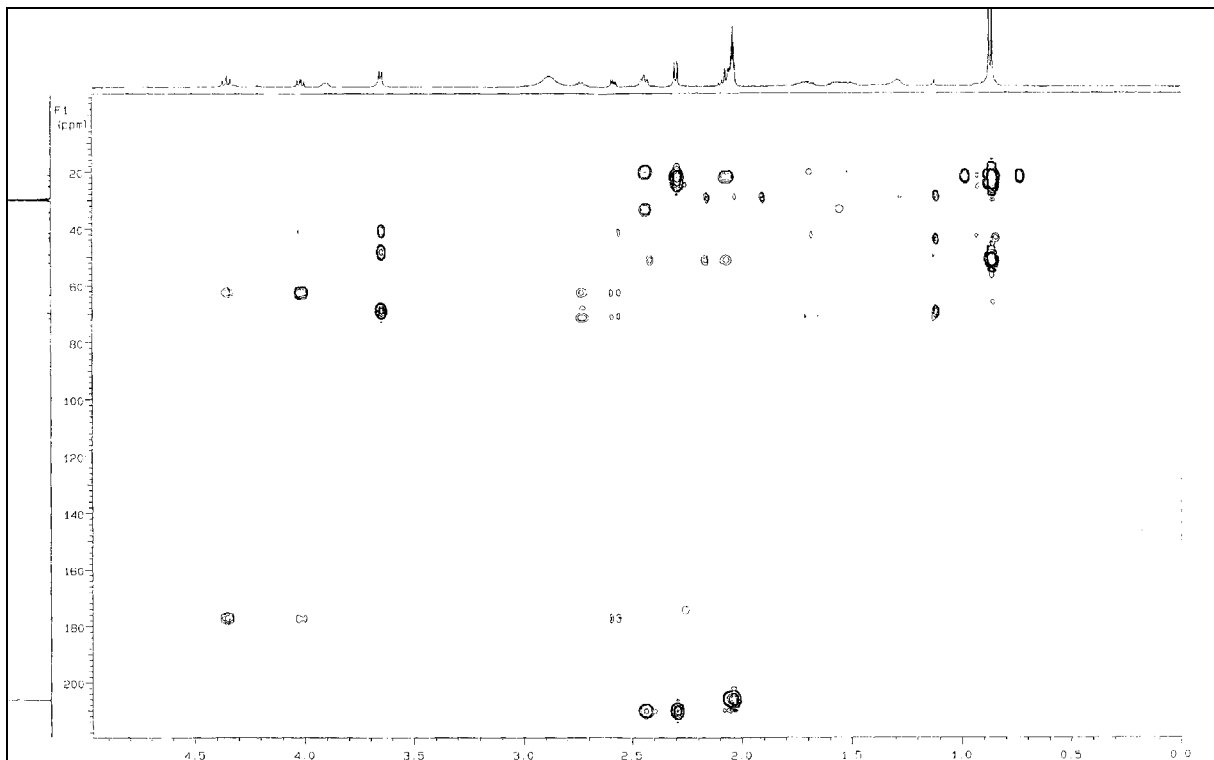
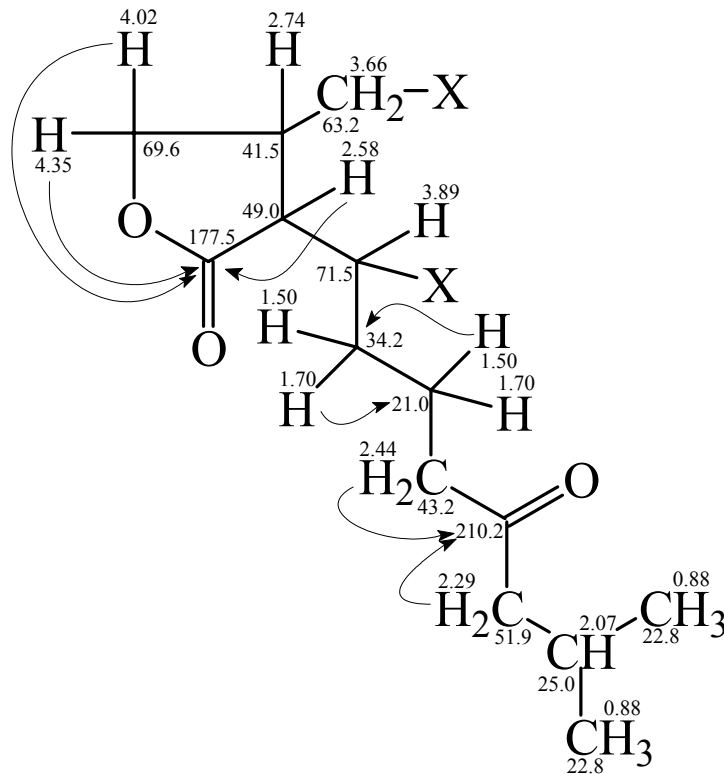
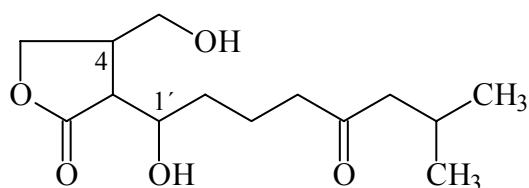


Abbildung 41: HMBC-NMR-Spektrum (600 MHz) von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

Zur Vervollständigung der Struktur fehlten am Kohlenstoff in Position 1' und der an C-4 gebundenen Methylengruppe jeweils ein Substituent. Die ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen an diesen Stellen deuteten auf eine Substitution durch Sauerstoff. Außerdem bestand zur Molmasse noch eine Differenz von 34 Da, weshalb im Molekül offensichtlich noch zwei Hydroxygruppen enthalten waren. Durch diese Lösung erscheinen auch die oben beschriebenen Überlegungen zum massenspektrometrischen Verhalten der Substanz plausibel. Die vorliegende Verbindung ist folglich 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydrofuran-2-on (**57**), das in den Datenbanken AntiBase, Dictionary of Natural Products[®] und Beilstein noch nicht beschrieben und somit als Naturstoff bisher unbekannt war.

**57**

Das Butanolid **57** unterscheidet sich von Graefe's Faktor II nur durch die Carbonylgruppe in Position 5'. Letztere Verbindung zählt zu einer Gruppe von Autoregulatoren, die sich nur in der Länge der Seitenkette und der Substitution in den beiden Hydroxygruppen unterscheiden. Diese Substanzen sind überwiegend aus Actinomyceten isoliert worden, auf die sie einen induzierenden Effekt ausüben. Von den Virginiae-Butanoliden aus *Streptomyces virginiae* weiß man, daß sie einen regulativen Einfluß auf die Biosynthese von Virginiamycin haben.^[89,90]

Sulfomycin I

Aus der Fraktion II, welche die höchste Hemmtestaktivität aufwies, wurde ein weißer Feststoff isoliert, dessen ^1H -NMR-Spektrum eine große Anzahl von sich glücklicherweise kaum überlappenden Signalen zeigte. Außer elf austauschbaren Protonen enthielt das Molekül offensichtlich einige aromatische und olefinische Protonen und mindestens drei Methylgruppen (s. Abb. 42).

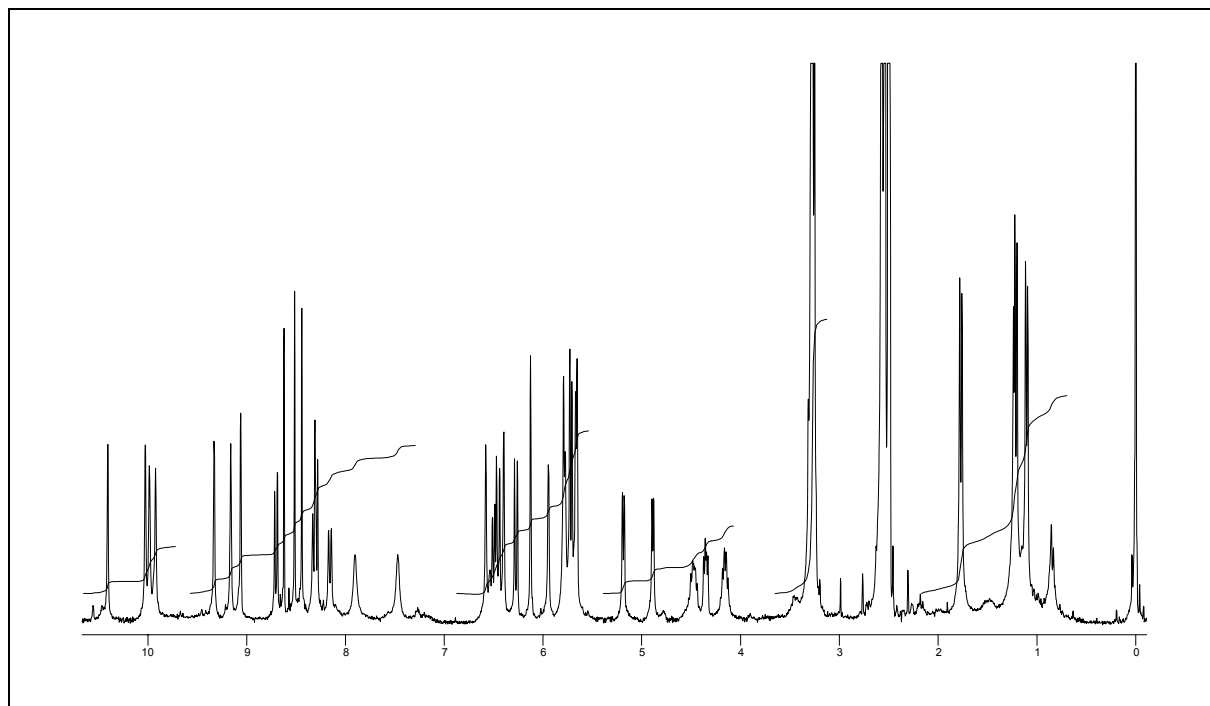
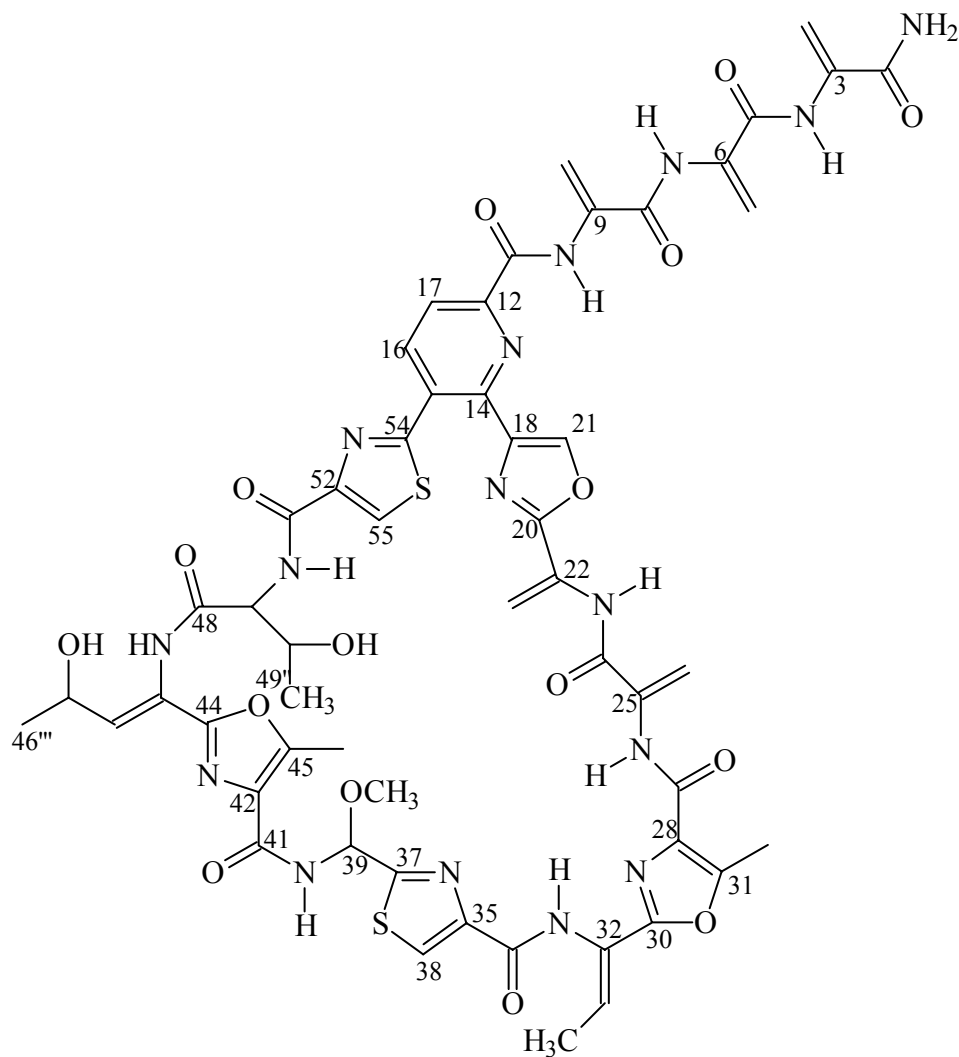


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Sulfomycin I (**58**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$

Eine Suche mit der massenspektrometrisch ermittelten Molmasse (ESI) von 1244 Da in Anti-Base lieferte sechs Verbindungen, von denen vier gleich ausgeschlossen werden konnten, weil sie keine aromatischen oder olefinischen Protonen aufwiesen. Die beiden verbleibenden Thiopeptide Sulfomycin I (**58**) und A-10255B sind sich strukturell sehr ähnlich. Es gab aber einige Indizien im ^1H -NMR-Spektrum, die dagegen sprachen, daß A-10255B vorlag: beispielsweise fehlten die Signale zweier Methylengruppen bei $\delta = 2.21$ und 4.78 und ein olefinisches Proton.

Da sich die beiden Moleküle außerdem in ihren Summenformeln unterschieden (Sulfomycin I (**58**): $\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}_2$; A-10255B: $\text{C}_{53}\text{H}_{48}\text{N}_{16}\text{O}_{15}\text{S}_3$), wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie (ESI) A-10255B als Lösung ausgeschlossen. Ein Vergleich des UV-Spektrums mit der HPLC-UV-Datenbank der Firma bioLeads ergab eine gute Übereinstimmung mit Sulfomycin I (**58**). Ein Vergleich der ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten mit der Literatur bestätigte schließlich diese Struktur (s. Tab. 2).^[91]



58

Tabelle 2: Vergleich der ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten von Sulfomycin I (58)

C-Nr.	$\delta (^{13}\text{C})_{\text{Lit.}}$	$\delta (^{13}\text{C})_{\text{exp}}$	$\delta (^1\text{H})_{\text{Lit.}}$	$\delta (^1\text{H})_{\text{exp}}$
2	165.0	164.9	-	-
3	134.5	134.5	-	-
3'	104.2	104.1	6.12/5.65 (s, s)	6.13/5.67 (s, m)
5	162.2	162.1	-	-
6	136.9	136.8	-	-
6'	111.8	111.6	5.72/5.69 (s, s)	5.76 (m)
8	162.6	162.6	-	-
9	133.8	133.8	-	-
9'	105.7	105.6	6.58/5.95 (s, s)	6.58/5.95 (s, s)
11	161.4	161.3	-	-
12	149.0	148.9	-	-
14	146.7	146.7	-	-
15	130.8	130.7	-	-
16	140.1	140.1	8.71 (d)	8.72 (d)

17	121.9	121.8	8.30 (d)	8.30 (d)
18	138.7	138.6	-	-
20	158.3	158.2	-	-
21	140.2	140.1	8.71 (d)	8.72 (d)
22	129.6	129.5	-	-
22'	112.9	112.8	5.79/5.66 (s, s)	5.81/5.70 (m)
24	162.9	162.8	-	-
25	133.4	133.4	-	-
25'	105.2	105.0	6.40/5.78 (s, s)	6.40/5.75 (s, m)
27	159.8	159.7	-	-
28	128.6	128.6	-	-
30	156.8	156.8	-	-
31	154.1	154.0	-	-
31'	11.5	11.4	2.57 (ü)	2.54 (ü)
32	123.5	123.4	-	-
32'	129.7	129.5	6.49 (q)	6.50 (m)
32''	13.7	13.6	1.76 (d)	1.77 (d)
34	159.1	159.0	-	-
35	148.8	148.8	-	-
37	167.5	167.4	-	-
38	127.0	126.8	8.45 (s)	8.45 (s)
39	77.1	77.1	6.46 (d)	6.42 (m)
OCH ₃	55.4	55.3	3.24 (s)	3.25 (s)
41	161.3	161.2	-	-
42	129.1	129.1	-	-
44	156.3	156.2	-	-
45	153.5	153.4	-	-
45'	11.5	11.4	2.56 (s)	2.58 (s)
46	120.6	120.6	-	-
46'	136.7	136.6	6.27 (d)	6.28 (d)
46''	62.5	62.4	4.46 (ddq)	4.49 (m)
46'''	22.8	22.7	1.21 (d)	1.21 (d)
48	169.7	169.6	-	-
49	59.4	59.2	4.34 (m)	4.36 (m)
49'	66.2	66.1	4.15 (m)	4.16 (m)
49''	20.2	20.0	1.09 (d)	1.11 (d)
51	160.6	160.5	-	-
52	148.8	148.8	-	-
54	162.3	162.2	-	-
55	127.5	127.4	8.64 (s)	8.52 (s)

Sulfomycin I (**58**) wurde erstmals 1968 von EGAWA *et al.* aus *Streptomyces viridochromogenes* isoliert und gehört wie auch Thiostrepton, Micrococcin, Berninamycin und Sporangio-mycin zur Familie der Thiopeptid-Antibiotika, die eine starke Wirkung gegen grampositive Bakterien zeigen.^[92] Der Wirkmechanismus beruht auf der Bindung an einen Protein-RNA-Komplex im Ribosom der Bakterien, wodurch deren Proteinsynthese unterbrochen wird.^[93]

Perlolyrin

Das ^1H -NMR-Spektrum eines aus Fraktion VI isolierten gelben Öls zeigte außer einem austauschbaren Proton bei $\delta = 10.96$ und einer mit Sauerstoff substituierten Methylengruppe sechs Dubletts und zwei Triplets im aromatischen Bereich. Aus dieser Konstellation und den Kopplungskonstanten ging hervor, daß das Molekül einen 1,2-disubstituierten und mindestens zwei weitere aromatische Ringe enthielt.

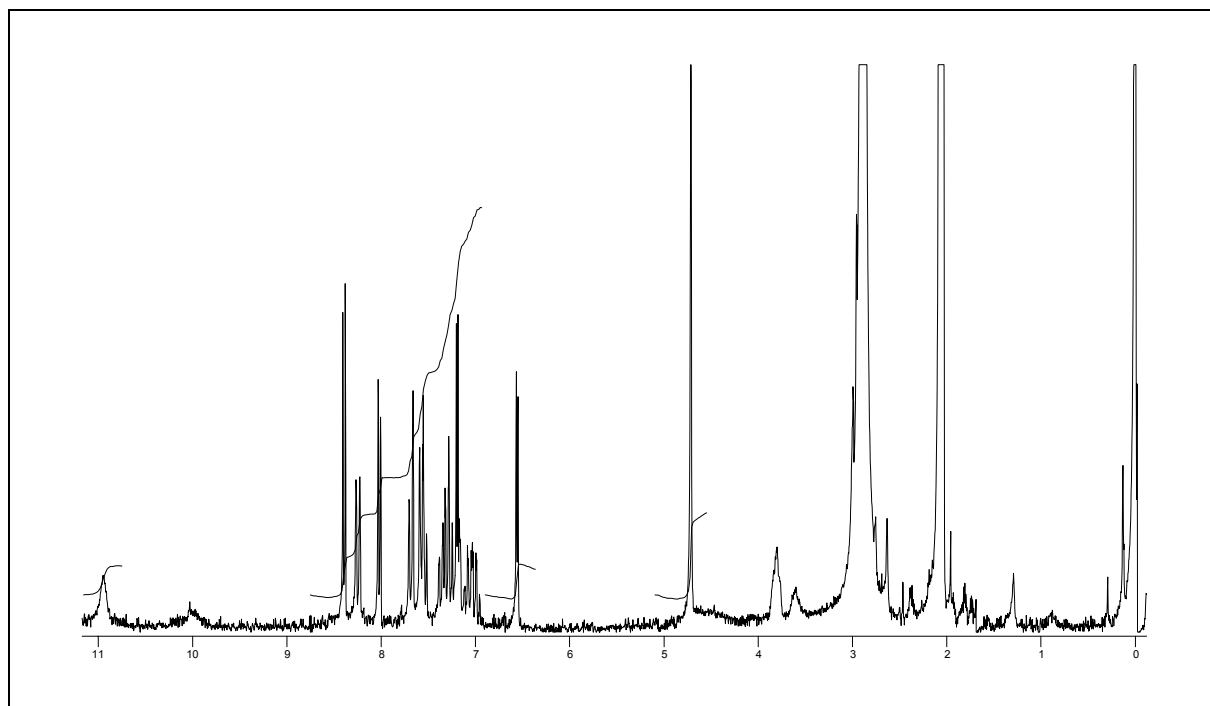


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von Perlolyrin (**59a**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

Die Molmasse (EI-MS) der gesuchten Verbindung betrug 264 Da. Im Dünnschichtchromatogramm ließ sich die Substanz mit Ehrlichs Reagenz blau anfärben. In Verbindung mit der geraden Molmasse läßt sich daraus folgern, daß eine gerade Anzahl von Stickstoffatomen im Molekül enthalten ist. Diese Annahme wurde bestätigt durch die mit hochauflösender Massenspektrometrie (EI) bestimmte Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$.

Weil das ^{13}C -NMR-Spektrum keine neuen Erkenntnisse hervorbrachte, wurde ein nJ -korreliertes 2D-NMR-Spektrum (HMBC-NMR) gemessen, mit dessen Kopplungen Teilstrukturen aufgeklärt wurden.

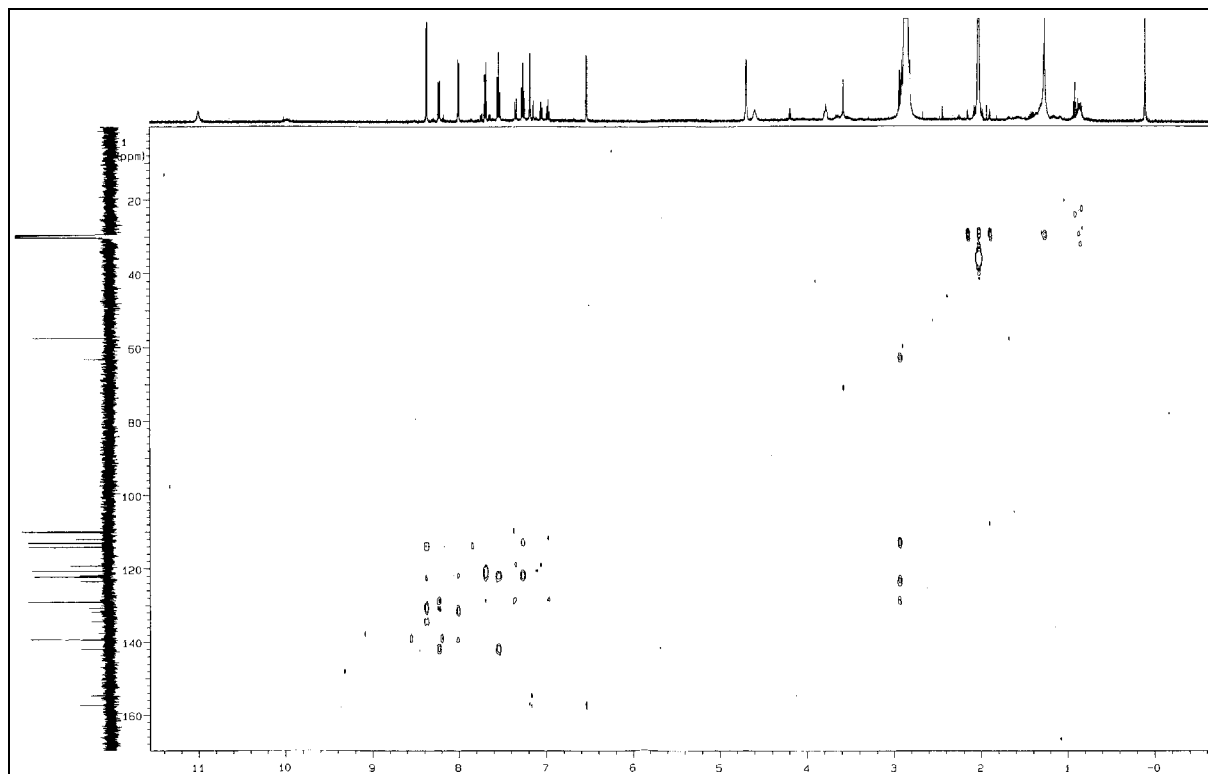
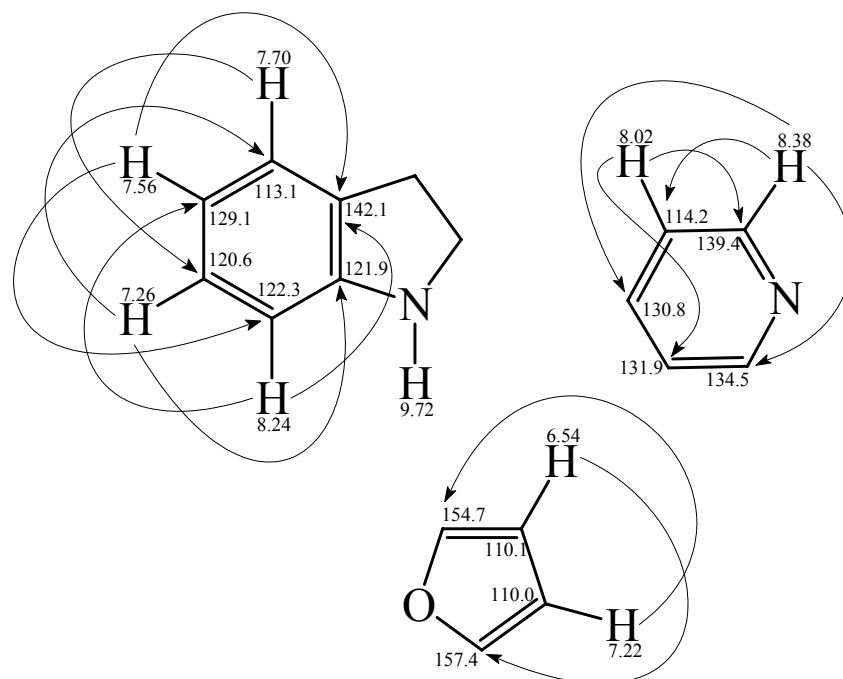


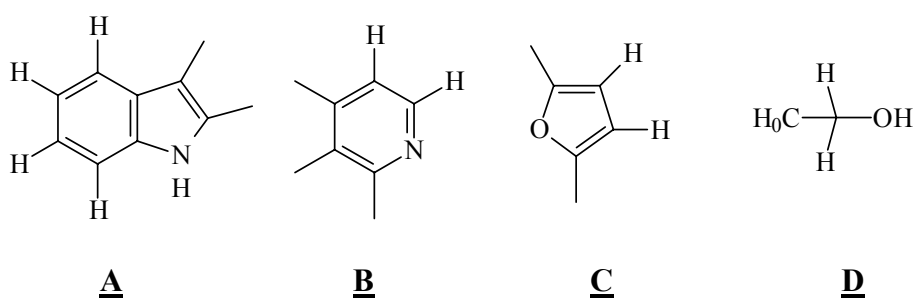
Abbildung 44: HMBC-NMR-Spektrum (600 MHz) von Perlolyrin (**59a**) in $[D_6]$ Aceton

So wurden der 1,2-disubstituierte Ring und das austauschbare Proton bei $\delta = 10.96$ durch zahlreiche Kopplungen als Bestandteile eines Indolrestes identifiziert. Dem Spektrum war außerdem zu entnehmen, daß die Protonen bei $\delta = 8.38$ und 8.02 in einen weiteren Ring gehörten. Ihre Kopplungskonstante von 5.1 Hz deutete darauf hin, daß sie in *ortho*-Position in einem heteroaromatischen Ring gebunden waren. Da beide Protonen insgesamt nur auf fünf Kohlenstoffatome koppelten, konnte ein Sechsring mit einem Heteroatom vorliegen, bei dem es sich wahrscheinlich um das zweite Stickstoffatom handelte. Dies steht außerdem im Einklang mit der Tieffeldverschiebung der ^1H -NMR-Signale.



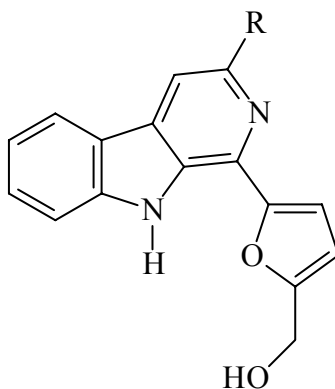
Die beiden verbleibenden aromatischen Protonen bei $\delta = 7.22$ und 6.54 mußten in einem vierten Ring enthalten sein. Die Kopplungskonstanten ihrer ^1H -NMR-Signale von 3.5 Hz könnten auf eine *meta*-Anordnung in einem Sechsring schließen lassen. Jedoch verbleiben aufgrund der Summenformel nur noch vier Kohlenstoffatome und ein Sauerstoffatom für den Rest des Moleküls, wenn man die Existenz einer CH_2OH -Gruppe berücksichtigt. Ein Furanring mit den Protonen in Position 3 und 4 würde die ^1H -NMR-Verschiebungen und die Kopplungskonstante von 3.5 Hz erklären. Die Protonen können nur in den genannten Positionen stehen, weil die beiden quartären Kohlenstoffatome wegen ihrer Verschiebungen von $\delta = 157.4$ und 154.7 an den Sauerstoff gebunden sein müssen.

Damit besteht das gesuchte Molekül aus den vier unten dargestellten Fragmenten, die erstaunlicherweise im 2D-Spektrum nicht untereinander koppeln:



Eine Suche mit diesen Fragmenten und der Molmasse im Dictionary of Natural Products führte zu dem β -Carbolin-Derivat Perlolysin (**59a**), dessen NMR-Literaturdaten weitgehend mit

den experimentellen übereinstimmten (s. Tab. 3). Die ^{13}C -Werte für C-4a und C-9a sind in der Literaturzuordnung aufgrund fehlender 2D-NMR-Daten wahrscheinlich vertauscht worden. Der einzige größere Unterschied besteht in den ^{13}C -Werten für C-8a.^[94] Für das sehr ähnliche in der Arbeitsgruppe parallel zu diesen Arbeiten isolierte Flazin (**59b**), das eine zusätzliche Carboxylgruppe an C-3 trägt, fand sich eine ähnliche Differenz zu dem Literaturwert.^[95]



59a: R = H

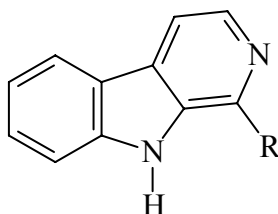
59b: R = COOH

Tabelle 3: ^{13}C - und ^1H -NMR-Datenvergleich von Perlolyrin (**59a**)

C-Nr.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Lit}}^*$	$\delta^1\text{H}_{\text{Lit}}^*$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{exp}}^*$	$\delta^1\text{H}_{\text{exp}}^*$
1	140.9	-	134.5	-
3	138.1	8.32 (d)	139.4	8.38 (d)
4	113.5	7.72 (d br)	114.2	8.02 (d)
4a	120.6	-	130.8	-
4b	130.4	-	131.9	-
5	121.5	7.98 (d br)	122.3	8.24 (d)
6	119.6	7.33 (m)	120.6	7.26 (td)
7	128.3	7.63 (m)	129.1	7.56 (td)
8a	130.4	-	142.1	-
9a	133.1	-	121.9	-
2'	156.6	-	157.4	-
3'	109.0	7.07 (d)	110.0	7.22
4'	109.6	6.38 (d)	110.1	6.54 (d)
5'	152.1	-	154.7	-
CH ₂ OH	55.9	4.77 (s)	57.4	4.72 (s)

* Die Literatur-NMR-Daten wurden in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, die experimentellen in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$ gemessen.

β -Carboline besitzen die Grundstruktur **60**, an die ein Aromat, eine Alkenyl-, Alkyl- oder Acylgruppe oder ein C₁-Fragment gebunden sein kann.

**60**

Sie stammen aus dem Tryptophanstoffwechsel und kommen in Pilzen, höheren Pflanzen, Meerestieren und Mikroorganismen vor. Außerdem fand man sie in Sake, Fischmehl und Sojasauce. In dieser Anzucht wurden Fisch- und Sojamehl jedoch nicht verwendet, so daß die Substanz wohl tatsächlich von dem Stamm gebildet wurde. Perlolyrin (**59**) ist ein Furyl- β -carbolin, das aus englischem Raygras, Ginseng und zwei asiatischen Pflanzen isoliert wurde. Als Bestandteil von Sake und Sojasauce erhielt es die Bezeichnung „Yellow substance“. Viele dieser Alkaloide zeigen pharmakologische Wirkungen als Enzymhemmer, DNA-Interkalatoren und Virustatika. Die β -Carboline sind synthetisch am besten aus Tryptophan oder Tryptamin zugänglich, wobei eine Cyclisierung nach Bischler-Napieralski oder Pictet-Spengler durchlaufen wird.^[94] Perlolyrin (**59**) ließe sich somit aus Tryptophan und Furfurol unter sauren Bedingungen und anschließende Dehydrierung herstellen.

Stamm GW 22/1818

Der terrestrische Streptomycet fiel durch sein blau pigmentiertes Mycel auf. Bei den ersten Anzuchten wurde nach der Aufarbeitung deutlich, daß die blauen Farbstoffe nur in sehr geringen Mengen enthalten waren. Um deren Produktion zu steigern, wurden einige Veränderungen in den Wachstumsbedingungen ausprobiert: bei Schüttelkulturen variierte man die Inkubationszeit zwischen drei und sieben Tagen, verwendete M₂⁺-Mangelmedien, schüttelte unter Lichtausschluß und veränderten Umdrehungsgeschwindigkeiten. Bei diesen Variationen waren zwar Unterschiede in der Blaufärbung erkennbar, aber diese waren nur unregelmäßig. Nur bei einer Veränderung des Start-pH-Wertes von 7.3 bis 8.8 war eine kontinuierlich erhöhte Produktion der blauen Farbstoffe sichtbar.

Eine Schüttelkultur des Stammes GW 22/1818 erfolgte im 15-l-Maßstab über drei Tage, wobei auch blau pigmentiertes Mycel gebildet wurde. Mycel und Überstand wurden durch Filtration getrennt und mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde zweimal mit Cyclohexan ent-

fettet und durch Chromatographie an modifiziertem Kieselgel in sechs Fraktionen aufgeteilt. Fraktion V und VI enthielten die gesuchten Farbstoffe, allerdings in zu geringen Mengen. Durch eine zweite Anzucht des Stammes konnten drei blaue Farbstoffe isoliert werden, die sich aber nur unzureichend lösten, so daß keine ^{13}C -NMR-Spektren zu erhalten waren. Die UV-Spektren zeigten aber eine große Ähnlichkeit zu den indigoartigen Akashinen, die zuvor in unserer Gruppe von Maskey isoliert worden waren (s. Abb. 45).^[96] Beide Substanzen zeigten die gleiche Polarität mit einem R_f -Wert von 0.28 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). Die durch ESI-MS bestimmten Molmassen von DSF3 und Akashin A waren mit 475 Da gleich. Das ^1H -NMR-Spektrum von DSF3 zeigte außer den Protonensignalen des Indigogerüsts aber auch von Akashin A verschiedene.

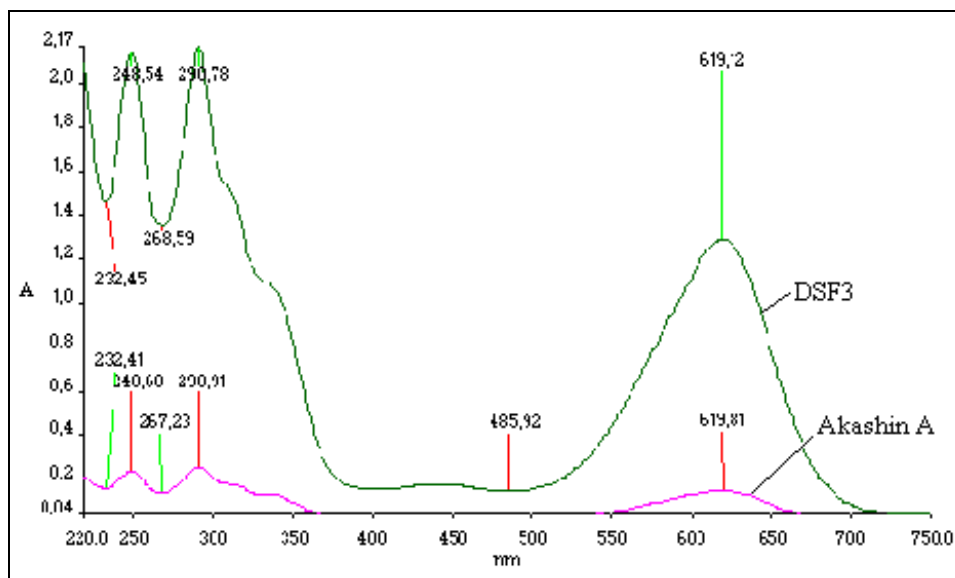
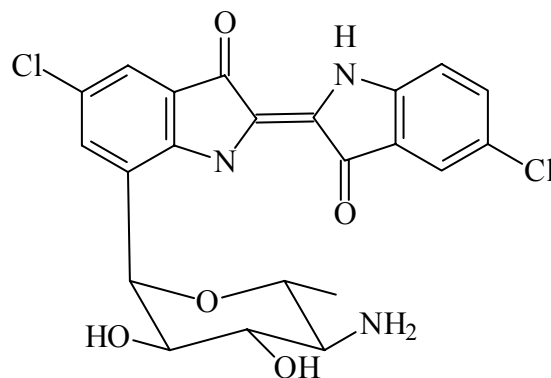


Abbildung 45: UV-Spektren-Vergleich von DSF3 und Akashin A in Methanol



61

Wie aus Abbildung 46 ersichtlich ist, konnten drei andere Naturstoffe aus dem ersten Extrakt isoliert werden.

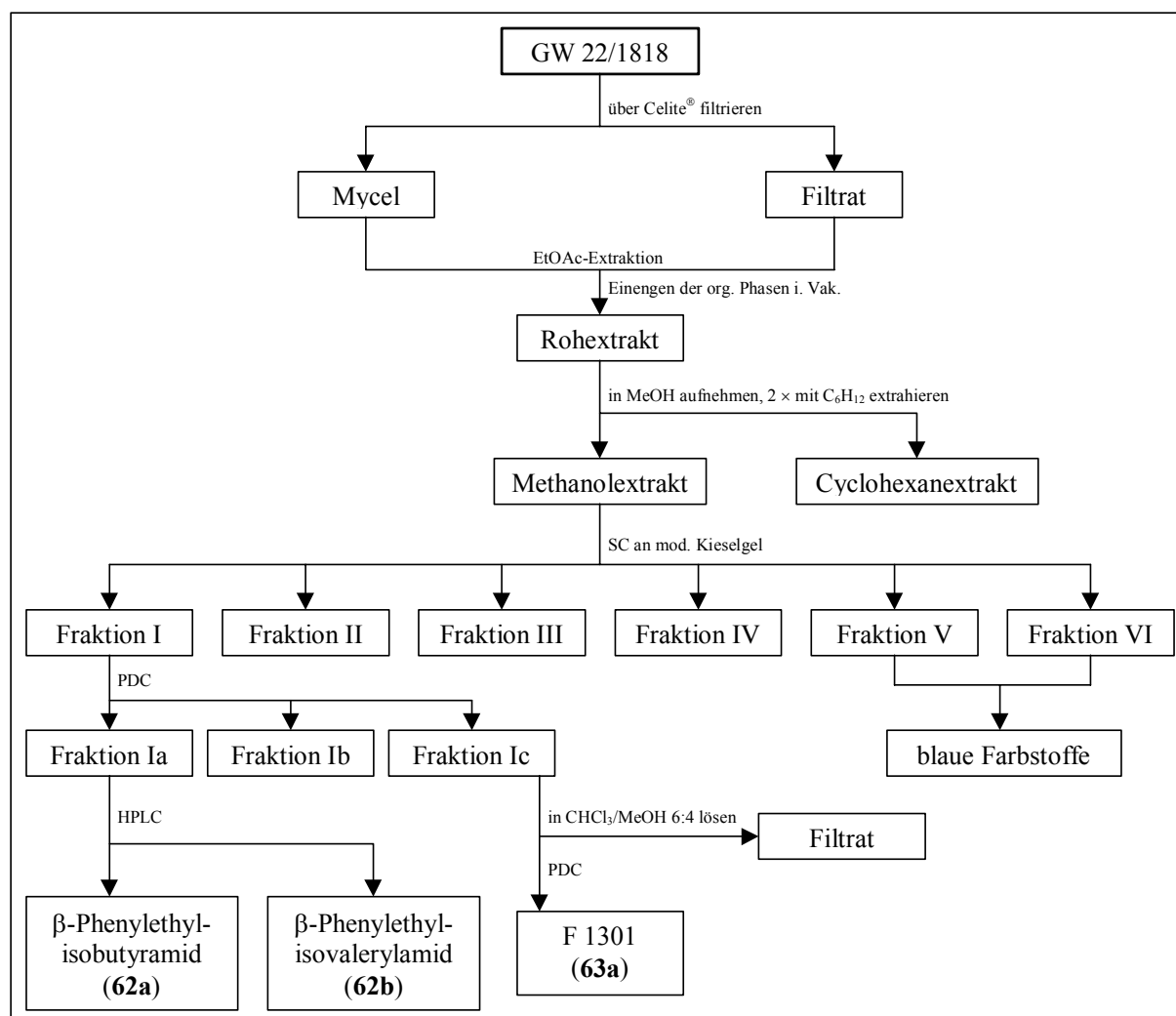


Abbildung 46: Aufarbeitungsschema für Stamm GW 22/1818

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der ersten Reinsubstanz zeigte das Multipllett eines Phenylringes bei $\delta = 7.26$, ein austauschbares Proton bei $\delta = 5.42$, das wahrscheinlich zur Methylengruppe mit dem Signal bei $\delta = 3.52$ benachbart war. Zusammen mit dem Signal einer weiteren Methylengruppe bei $\delta = 2.82$ ergibt sich das Signalmuster des Phenylethylrestes von N_β -Phenylethylacetamid (**37**). Statt der Methylgruppe von **37** enthält dieses Spektrum ein Dublett zweier magnetisch äquivalenter Methylgruppen bei $\delta = 1.11$ und eines damit kopplenden Protons bei $\delta = 2.30$.

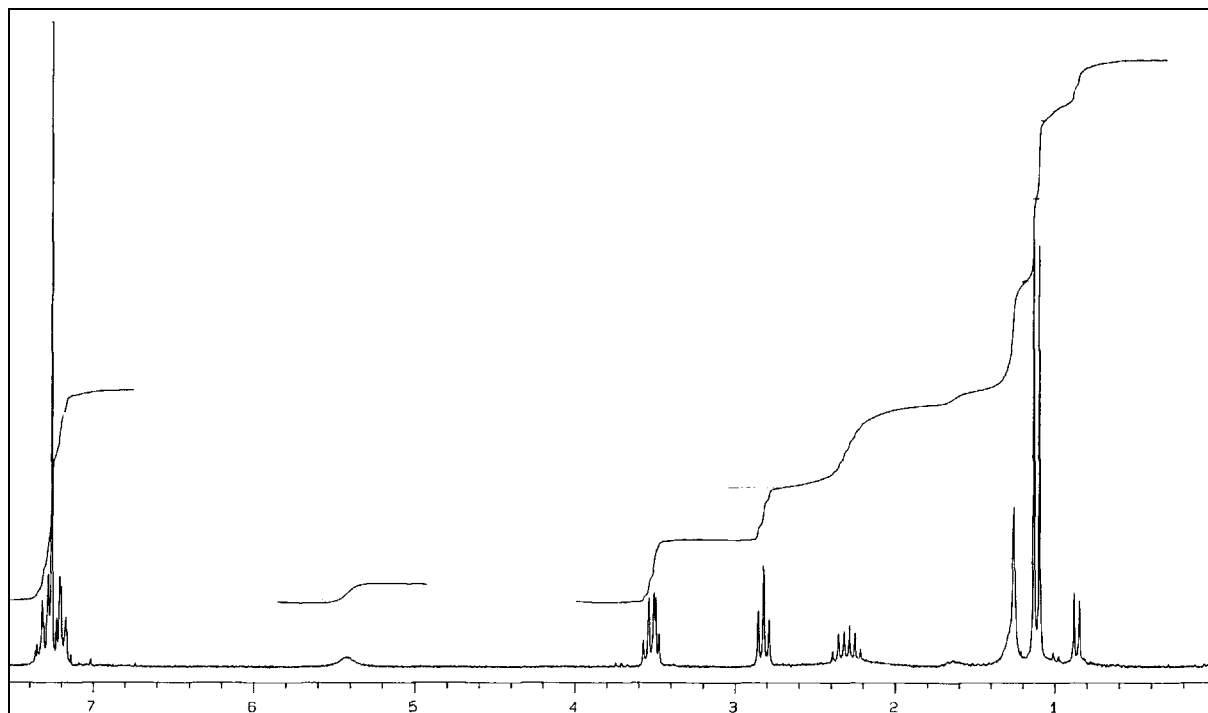
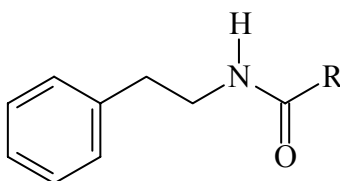


Abbildung 47: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von β -Phenylethylisobutyramid (**62a**) in CDCl_3

Wahrscheinlich handelte es sich bei dieser Verbindung um β -Phenylethylisobutyramid (**62a**). Die ungerade Molmasse von 191 Da stützte dieses Ergebnis. Weil aber diese Verbindung in den verfügbaren Datenbanken nicht vorhanden war, wurde zur Bestätigung ein ^{13}C -NMR-Spektrum gemessen, in dem die noch nicht direkt bestätigte Carbonylgruppe durch ein Signal bei $\delta = 177.0$ nachgewiesen wurde. Die somit bewiesene Struktur war kurz zuvor schon von Asolkar^[97] in der Arbeitsgruppe als neuer Naturstoff isoliert und charakterisiert worden.^[98] Die ^1H -NMR-Spektren stimmten überein.



62a : R = *i*Pr

62b : R = *i*Bu

Mit der vorher aufgeklärten Struktur konnte auch die zweite isolierte Substanz schnell aufgeklärt werden, denn sie enthielt zusätzlich nur eine weitere Methylengruppe bei $\delta = 2.35$, so daß ein Isobutyl- den Isopropylrest ersetzte. Folglich lag hier β -Phenylethylisovalerylamid (**62b**) vor, was ebenfalls von Asolkar vorher identifiziert wurde. Durch den Vergleich der ^1H -NMR-Spektren wurde das Ergebnis bestätigt.^[98]

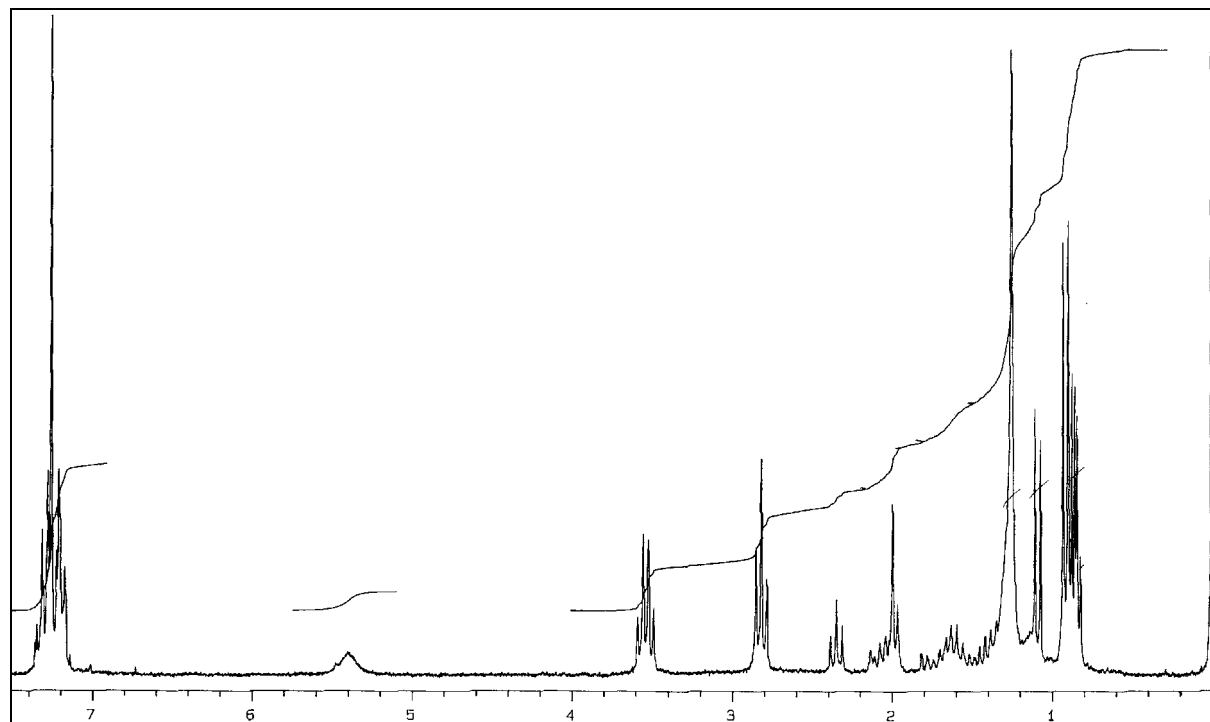


Abbildung 48: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von β -Phenylethylisovalerylamid (**62b**) in CDCl_3

F1301

Die dritte Substanz löste sich nicht in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 6:4 und ließ sich deshalb durch Filtration vom Rest der Fraktion abtrennen. Nach Reinigung an Kieselgel wurde ein kaminroter Feststoff erhalten, dessen Farbe sich mit Natronlauge vertiefte. Außerdem zeigte das ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 12.08$ und 11.48 zwei scharfe austauschbare Signale, die von chelierten Protonen hervorgerufen werden. Beides ließ darauf schließen, daß ein Hydroxychinon vorlag. Weiterhin enthielt das Spektrum drei Singulettssignale von aromatischen Protonen bei $\delta = 7.96$, 7.41 und 7.34 und zwei weitere bei $\delta = 3.96$ und 3.81 , die von an Sauerstoff gebundenen Methylgruppen stammen. Ein zum Quartett aufgespaltenes Signal bei $\delta = 3.02$ und ein damit koppelndes Triplet bei $\delta = 1.25$ deuteten auf eine Ethylgruppe hin und ein Singulett bei $\delta = 2.51$ läßt sich wahrscheinlich einer an einen Aromaten gebundenen Methylgruppe zuordnen. Mit diesen sehr fragmentarischen Informationen aus dem ^1H -NMR-Spektrum und einer Molmasse (ESI-MS) von 454 Da ließ sich in keiner Strukturdatenbank ein Naturstoff finden, der alle diese Bedingungen erfüllte.

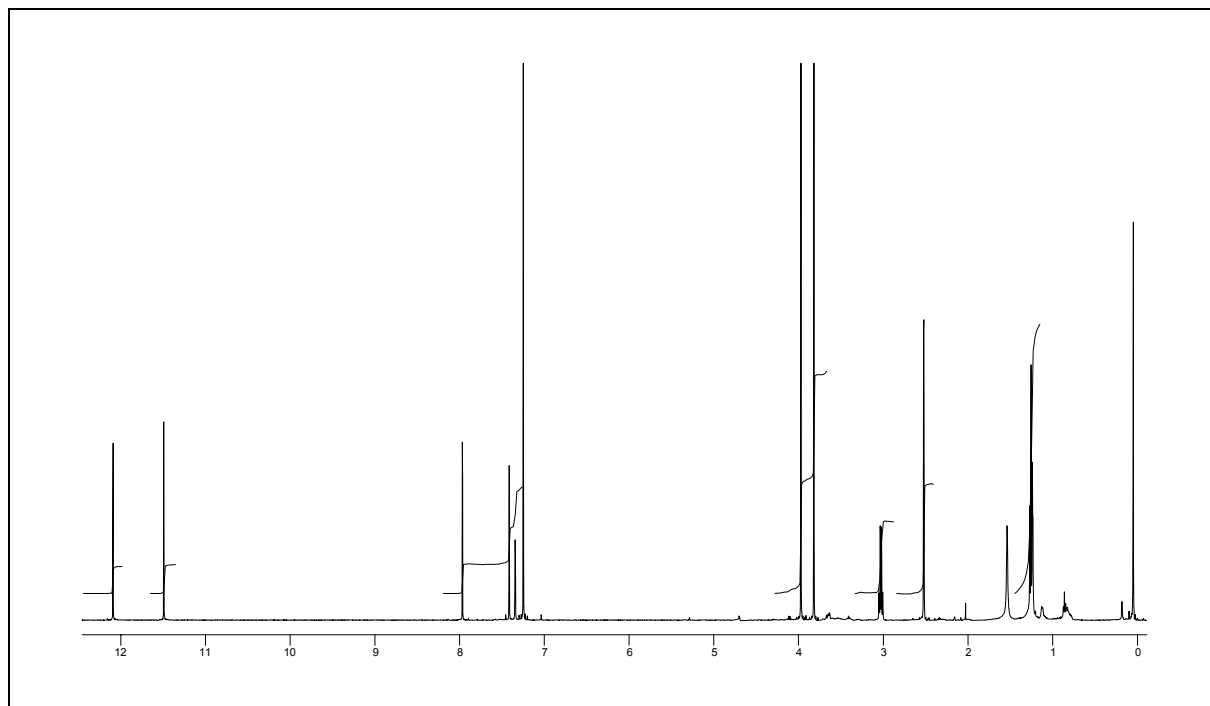
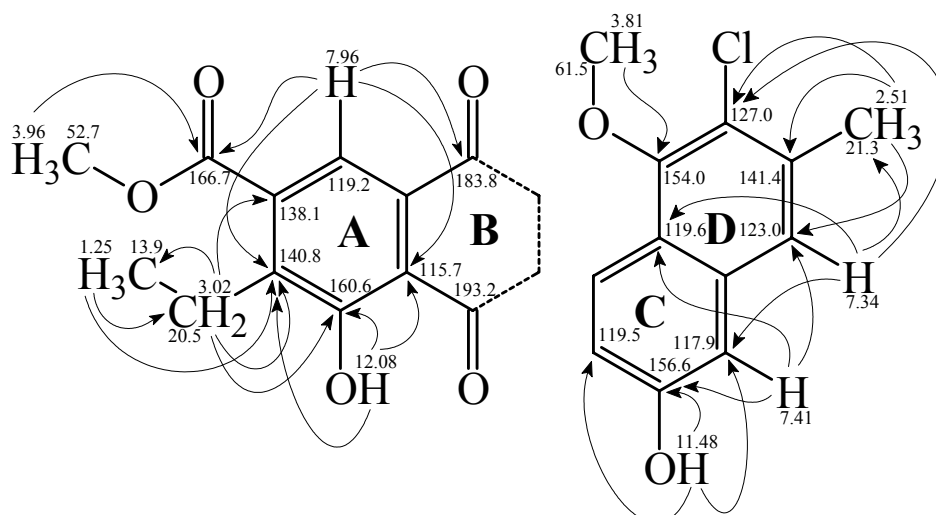


Abbildung 49: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von F1301 (**63a**) in CDCl_3

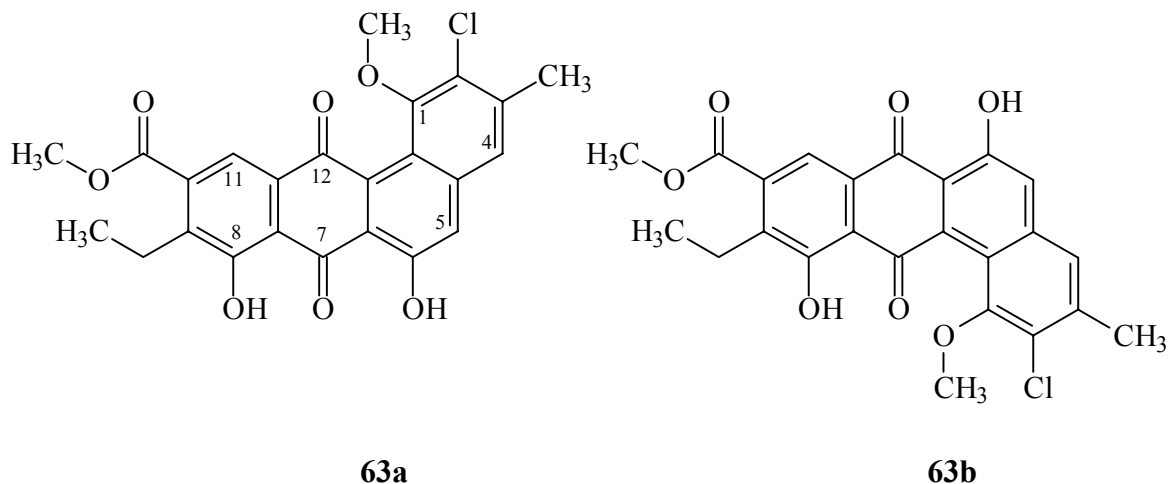
Ein daraufhin gemessenes ^{13}C -NMR-Spektrum beinhaltet die Signale von 24 Kohlenstoffatomen. Aus den sehr unterschiedlichen Verschiebungen der beiden Chinon-Carbonylgruppen von $\delta = 193.2$ und 183.8 ließ sich ableiten, daß die beiden Hydroxygruppen, deren chelierte Protonen im ^1H -NMR-Spektrum zu sehen sind, auf einer Seite des Chinongerüsts stehen. Im anderen Falle wären beide Kohlenstoffsignale bei $\delta = 186$ - 188 zu sehen. Zwei der vier folgenden Signale zwischen $\delta = 166.7$ und 154.0 müssen zu den Kohlenstoffatomen gehören, an welche die beiden Hydroxygruppen gebunden sind. Die beiden verbleibenden könnten auf Ester- oder Amidgruppen hinweisen. Außerdem enthält das Molekül noch 13 Kohlenstoffatome mit aromatischem Charakter und fünf aliphatische, deren Zuordnung durch die Daten eines 1J -korrelierten HMQC-NMR-Spektrums bestätigt wird.

Mit Hilfe der Kopplungen aus einem HMBC-NMR-Spektrums ließen sich zwei Fragmente, bestehend aus den Ringen **AB** und **CD**, erstellen. Daß die Ringe **A** und **B** auf die unten gezeichnete Weise miteinander verknüpft sind, läßt sich insbesondere durch die 3J -Kopplung zwischen dem Proton bei $\delta = 7.96$ und dem Carbonylkohlenstoff bei $\delta = 183.8$ beweisen. Lediglich ableitbar daraus ist die Zuordnung des Carbonylkohlenstoffs bei $\delta = 193.3$. Der Ring **B** muß ein Sechsring sein, weil zum einen nur so die erforderliche Anzahl an Kohlenstoffatomen erreicht wird und zum anderen eine derart starke Chelierung des Protons bei $\delta = 12.08$ sonst nicht möglich wäre.

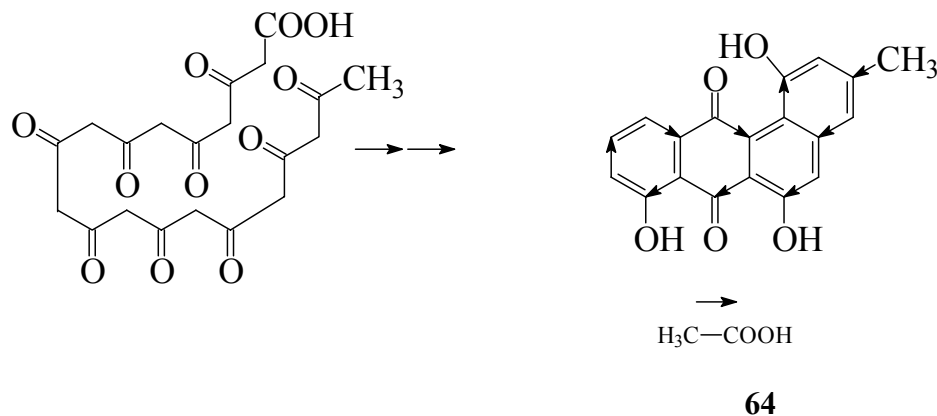


Auch die Verknüpfung der Ringe **C** und **D** ließ sich aus den Kopplungen plausibel ableiten. Der Hinweis auf einen Chlorsubstituenten ergab sich aus der Massendifferenz von 35 Da der bis dahin erstellten Strukturen zur Molmasse und konnte durch die charakteristische Isotopenverteilung in den Molpeaks des EI-Massenspektrums und durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt werden. Insgesamt konnten die drei quartären Kohlenstoffatome in Position 4a, 11a und 12a den Verschiebungen $\delta = 138.9$, 137.2 und 133.5 aufgrund fehlender Kopplungen nicht direkt, sondern nur durch den Vergleich mit ähnlichen Naturstoffen wie Tetrangulol und Berechnung mit dem Programm ACD zugeordnet werden.^[85, 99]

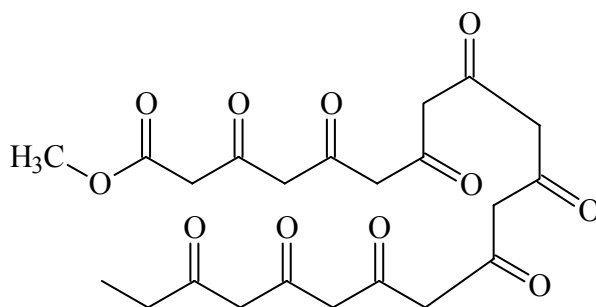
Die Verknüpfung der beiden Fragmente über die Ringe **B** und **C** bzw. die Positionen 6a und 12a könnte auf entgegengesetzte Weise erfolgen, so daß entweder **63a** oder **63b** vorliegt. Im Vorangegangenen wurde schon wegen der unterschiedlichen Verschiebungen der Carbonylkohlenstoffatome 7 und 12 gefolgert, daß die beiden chelierten Protonen dem Kohlenstoffatom bei $\delta = 193.3$ benachbart sind, so daß der Ring **D** zur anderen Seite des Moleküls ausgerichtet sein muß. Diese Schlußfolgerung läßt sich durch sehr ähnliche Verhältnisse in gleichartigen Naturstoffen wie Tetrangulol und Angucyclinon bestätigen und wird zusätzlich durch Berechnungen mit ACD^[100] gestützt. Somit hat die vorliegende Verbindung die Struktur **63a** und ist als Naturstoff neu.



Die Biosynthese von **63a** kann wahrscheinlich von der des Angucyclinons (**64**) abgeleitet werden, bei der ein Decaketid durch Ringschlußreaktion und Oxidation in **64** übergeführt wird (s. u.). Die Ethylgruppe an C-9 von **63a** könnte dann durch den Einbau einer Butyrat- statt einer Acetateinheit entstanden und das Molekül durch nachträgliche Acetylierung an C-10, Methylierung der Hydroxygruppe an C-1 und Halogenierung an C-2 in seine endgültige Form übergeführt worden sein.



Ein alternativer Biosyntheseweg über ein Polyketid mit elf oder zwölf Acetateinheiten, dessen äußerer Ringschluß sich zwischen C-9 und C-10 vollzieht, ist wegen der sich daraus ergebenden Lage der Carbonylgruppen eher auszuschließen:



Aus Mikroorganismen sind bisher erst 14 Naturstoffe isoliert worden, die ein Phenanthrachinon-Grundgerüst besitzen. Davon enthalten immerhin drei Chlor als Substituenten, wenn auch in anderen Positionen. Zwei dieser Verbindungen wurden aus dem Actinomycetenstamm WP4669 isoliert.^[1]

Stamm GW 5/1543

Weil der terrestrische Streptomycet GW 5/1543 das Wachstum einiger Krebszelllinien hemmte und mittlere Aktivität gegen die Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) zeigte, wurde er zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

Die Anzucht erfolgte in Schüttelkultur mit einem Volumen von 24 l. Nachdem das Mycel vom Überstand durch Filtration getrennt worden war, wurden beide mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen eingedampft. Den Extrakt entfettete man mit Cyclohexan und trennte durch Chromatographie an Sephadex in sieben Fraktionen, von denen die zweite besondere antibiotische Aktivität zeigte.

^[1] L. C. Brinkman, F. R. Ley, P. J. Seaton, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 374-380.

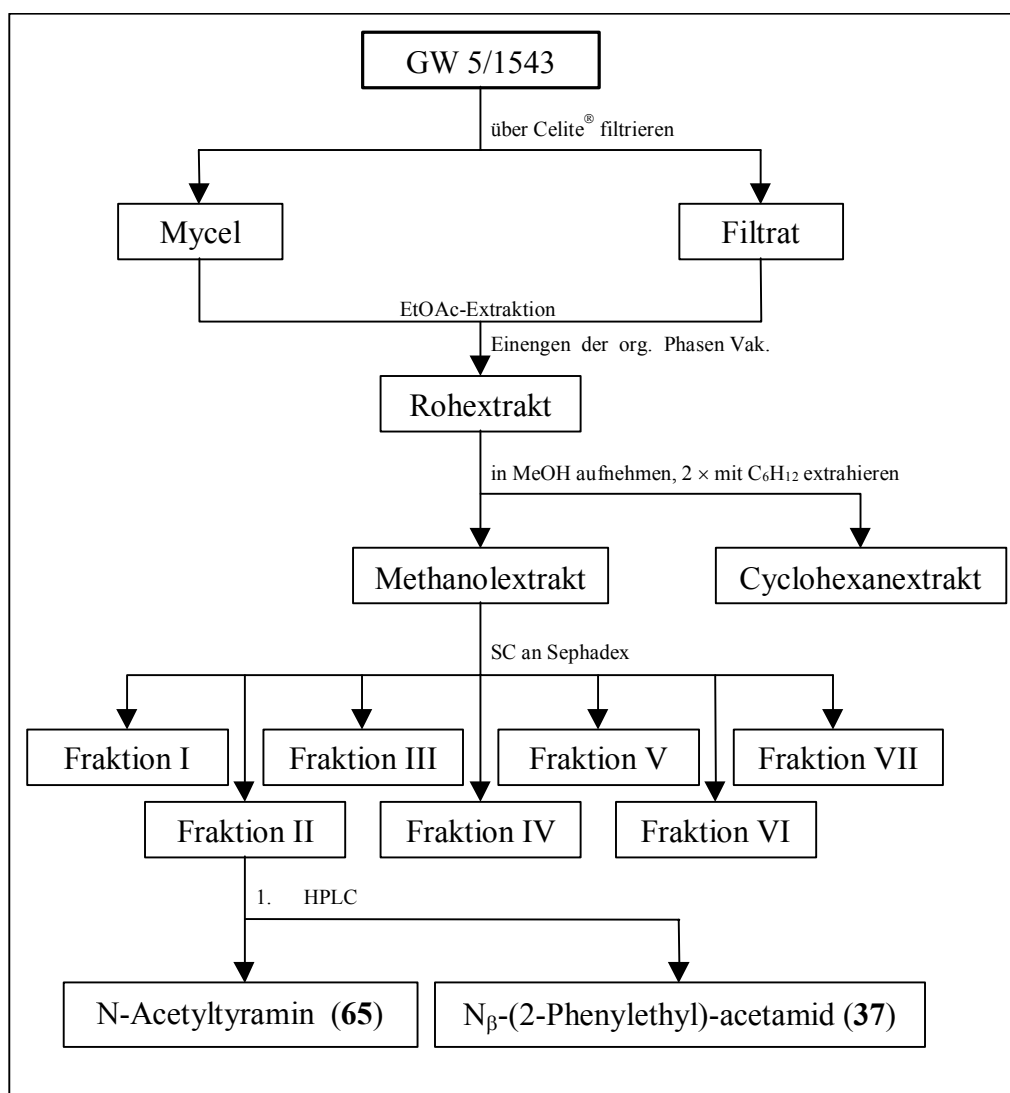


Abbildung 50: Aufarbeitungsschema für Stamm GW 5/1543

N-Acetyltyramin und N β -(2-Phenylethyl)acetamid

Aus Fraktion II konnten durch HPLC zwei Substanzen isoliert werden, von denen die zweite als das schon früher isolierte N β -(2-Phenylethyl)acetamid (37) identifiziert wurde. Von deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum unterschied sich die erste Verbindung nur im aromatischen Bereich: statt eines Phenyl-Multiplettsignals waren die zwei Dublettsignale eines 1,2-disubstituierten Aromaten und ein austauschbares Singulett bei $\delta = 7.12$ zu sehen. Durch den Vergleich mit einem Referenzspektrum aus der Sammlung wurde die Vermutung bestätigt, daß N-Acetyltyramin (65) isoliert wurde. Die Substanz zeigte in Hemmtests keine antibiotische oder phycotoxische Aktivität.

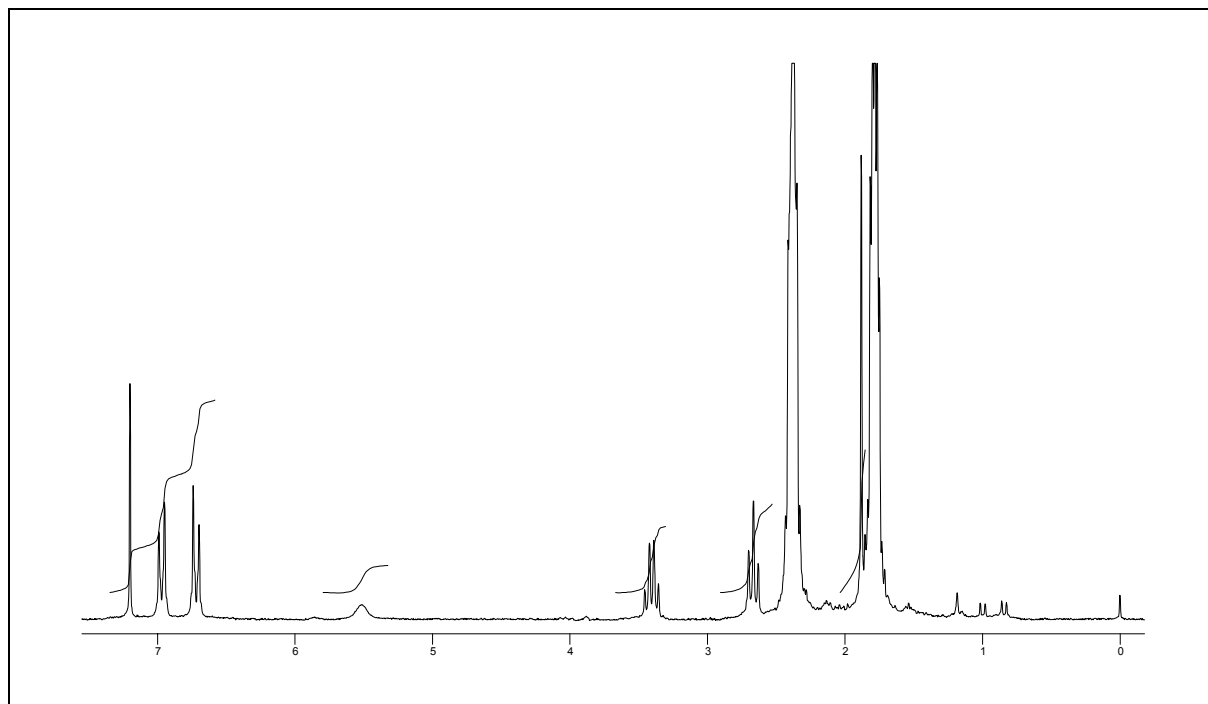
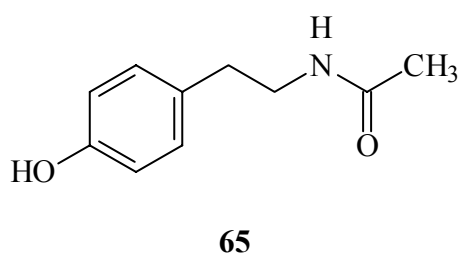


Abbildung 51: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von N^β -Acetyltyramin (**65**) in CDCl_3



Stamm GW 39/1573

Der Extrakt des terrestrischen Streptomyceten fiel im Primärscreening durch sehr hohe Aktivitäten gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) und die Alge *Scenedesmus subspicatus* auf.

Nach einer 20-l-Fermentation trennte man das Mycel vom Überstand und extrahierte beide Teile mit Ethylacetat. Der Extrakt aus den vereinigten organischen Phasen wurde anschließend mit Cyclohexan entfettet, und zusätzlich extrahierte man den methanolischen Eindampfrückstand mit Aceton. Weil der Acetonextrakt die höchste Aktivität gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) aufwies, trennte man ihn durch Chromatographie an Sephadex in vier Fraktionen.

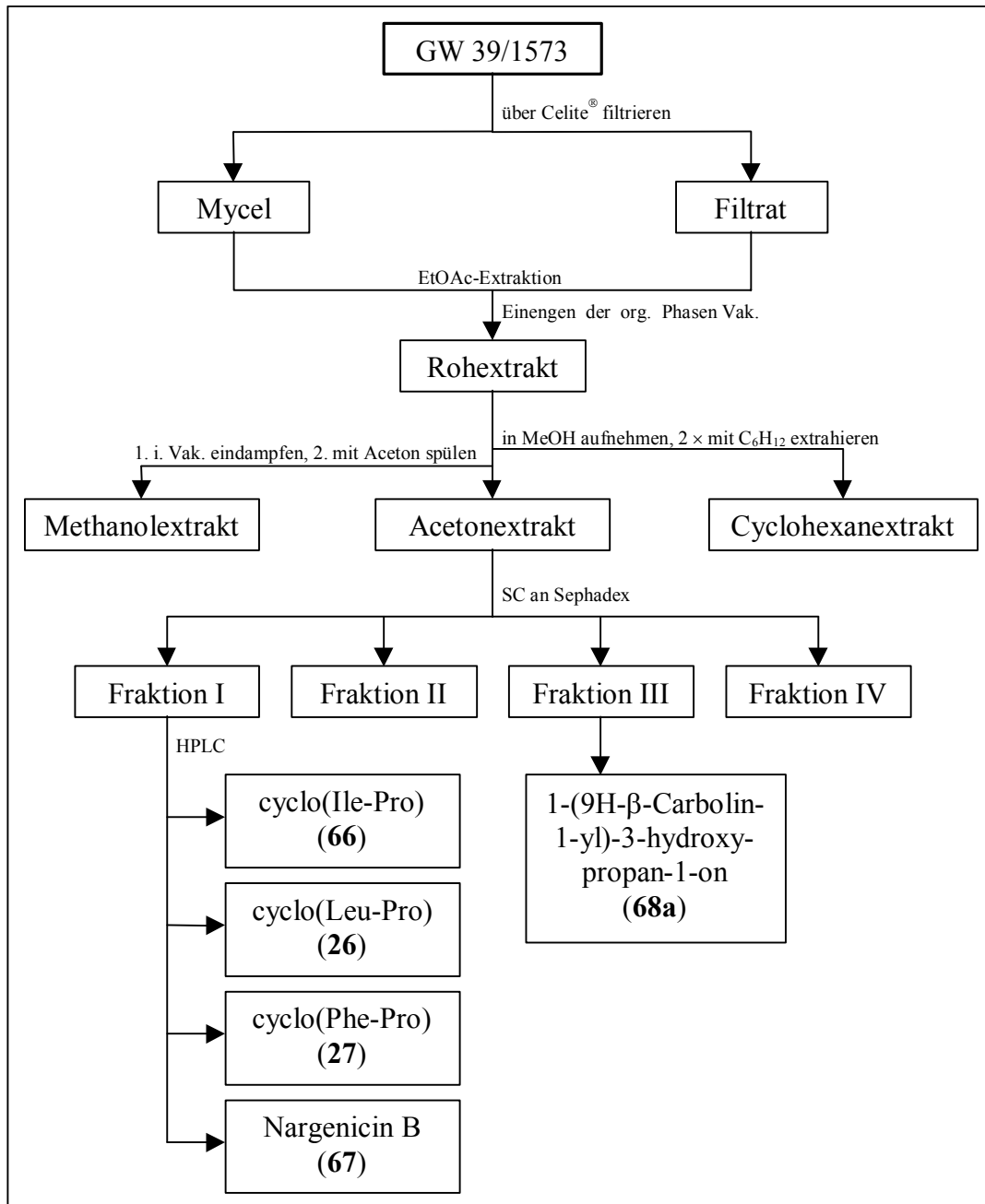


Abbildung 52: Aufarbeitungsschema für Stamm GW 39/1573

cyclo(Ile-Pro), *cyclo(Leu-Pro)* und *cyclo(Phe-Pro)*

Die erste Substanz zeigte im Vergleich des HPLC-UV-Spektrums und des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums große Ähnlichkeiten zu den bereits aufgeklärten Prolyl-diketopiperazinen. Der Rest der anderen Aminosäure enthielt eine zum Dublett und eine zum Triplet aufspaltende Methylgruppe bei $\delta = 1.05$ und 0.93 . Außerdem war das Multiplett einer Methylengruppe bei $\delta = 1.31$ zu sehen, was insgesamt auf einen *iso*-Butylrest und damit auf

Isoleucin als zweite Aminosäure deutete. Daß hier tatsächlich *cyclo*(Ile-Pro) (**66**) vorlag, konnte durch ein Vergleichsspektrum aus der Sammlung bestätigt werden.

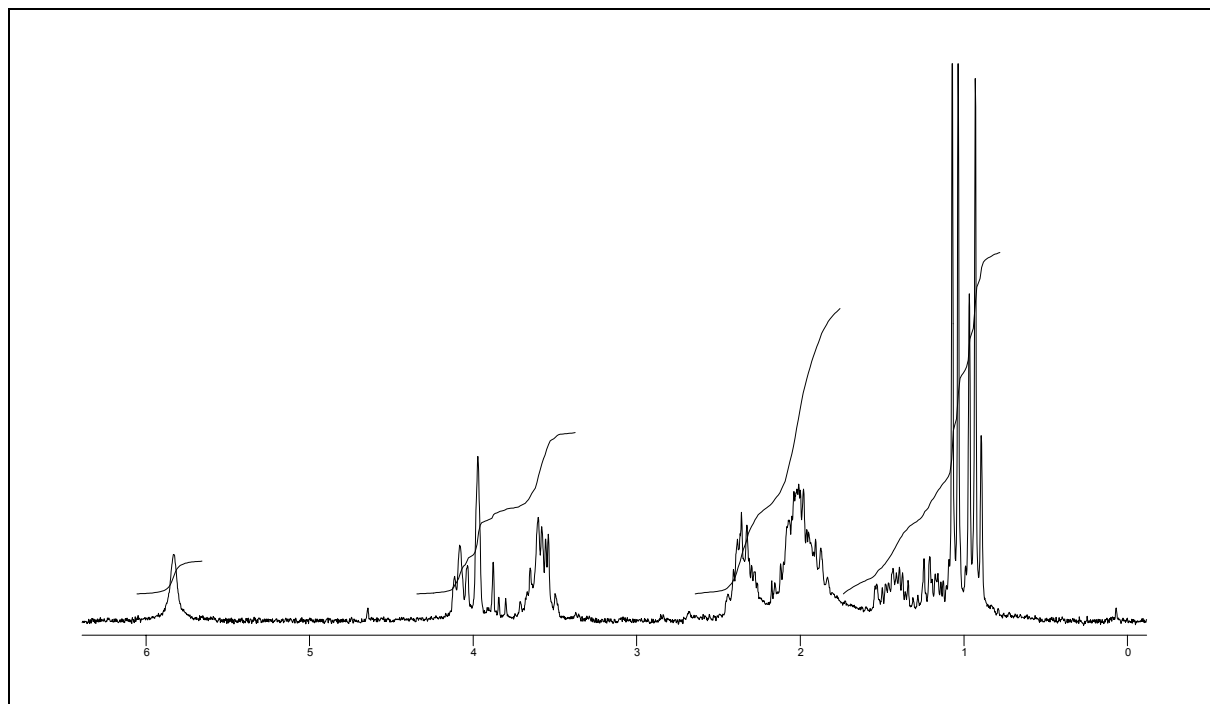
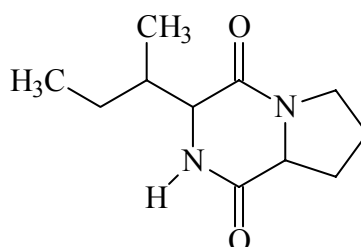


Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (200 MHz) von *cyclo*(Ile-Pro) (**66**) in CDCl_3



66

Zwei weitere Substanzen wurden durch ihre $^1\text{H-NMR}$ -Spektren als *cyclo*(Leu-Pro) (**26**) und *cyclo*(Phe-Pro) (**27**) identifiziert.

Nargenicin B1

Aus der Fraktion I wurden 151 mg eines farblosen Öls isoliert, das ein komplexes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lieferte. Drei der Protonensignale bei $\delta = 7.07$, 6.90 und 6.22 erinnerten stark an die Signale der aromatischen Protonen des Pyrrol-2-carbonsäuremethylesters (**56**). Außerdem deutete ein Signal bei $\delta = 5.85$ auf ein olefinisches Proton hin, während weitere vier Signale zwischen $\delta = 5 - 6$ ebenso von Methingruppen stammen konnten, die einem Sauerstoffatom benachbart sind. Zwei Singulets bei $\delta = 3.31$ und 3.16 konnten nur von aliphatischen Methylethern stammen, weil Methylestersignale und aromatische Methylether erst zwi-

schen $\delta = 3.8$ und 4.0 erscheinen. Ein weiteres etwas verbreitertes Singulett der Intensität 3 bei $\delta = 1.81$ ist charakteristisch für eine Methylgruppe in Allylstellung zu einem olefinischen Proton und das Dublett bei $\delta = 1.29$ deutete auf eine Methylgruppe in Nachbarschaft zu einer Methingruppe hin.

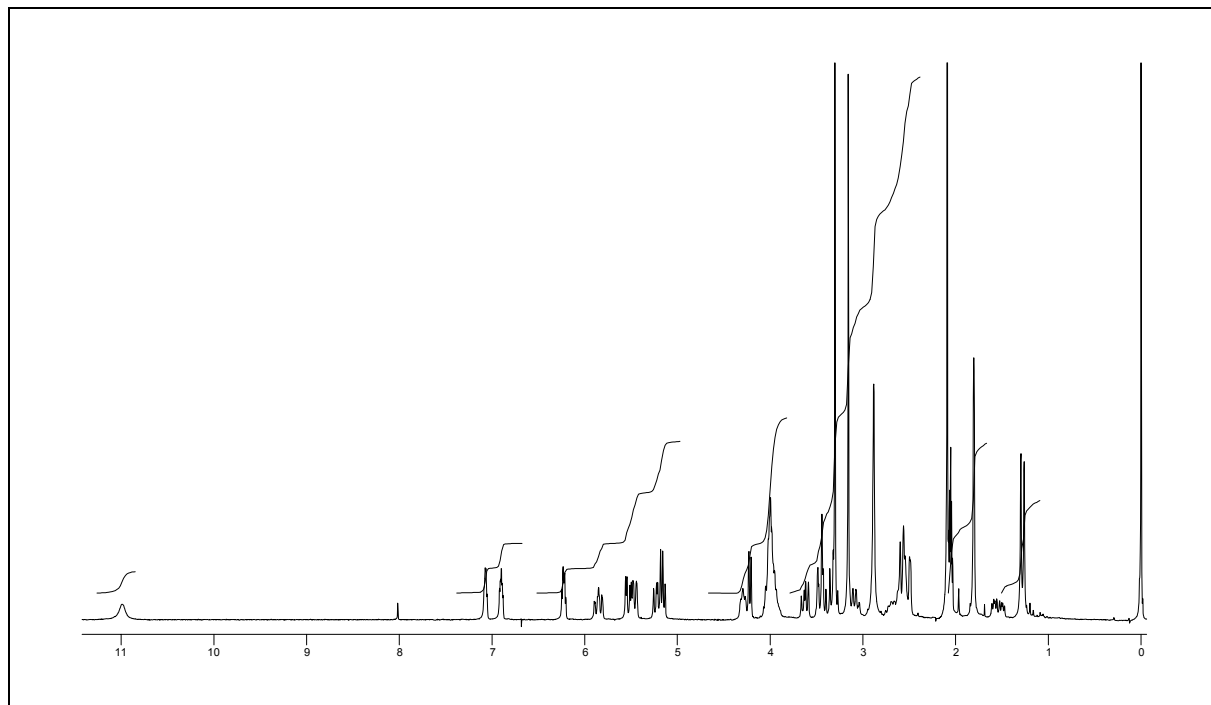


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum von Nargenicin B1 (**67**) in $[\text{D}_6]$ Aceton.

Eine Recherche in AntiBase lieferte in Verbindung mit der Molmasse von 562 Da 1 Verbindungen (s. Abbildung 55).

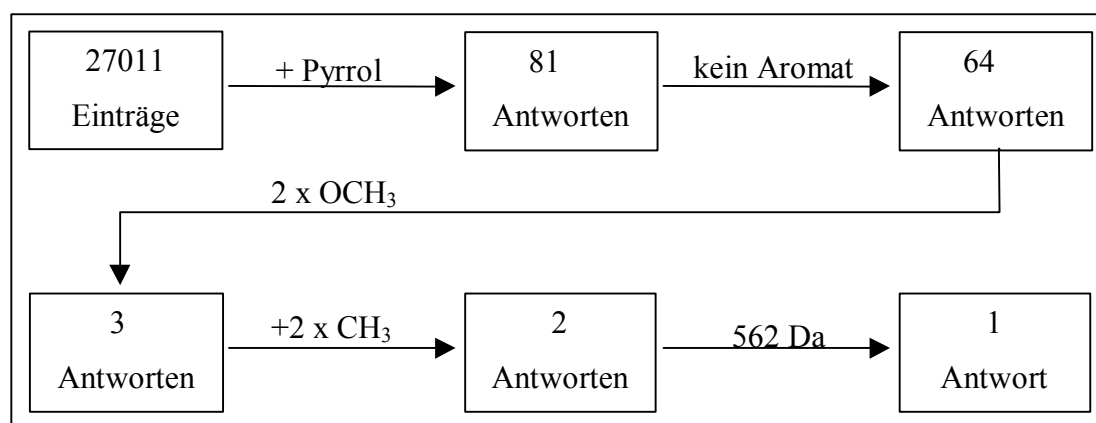


Abbildung 55: Datenbanksuche in AntiBase mit den spektroskopischen Daten von Nargenicin B (**67**).

Leider waren von Nargenicin B1 (**67**) in der Literatur^[101] keine NMR-spektroskopischen Daten verfügbar, so daß zwar ein Vergleich mit den ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von Narge-

nicin A^[102] darauf hindeutete, daß die richtige Lösung gefunden war, aber eine endgültige Bestätigung der Struktur konnte nur über 2D-NMR-Experimente erfolgen. Die erwarteten Kopplungen im H,H-COSY- und HMBC-Spektrum sind durch die Pfeile in den Abbildungen 56 und Abb. 58 dargestellt.

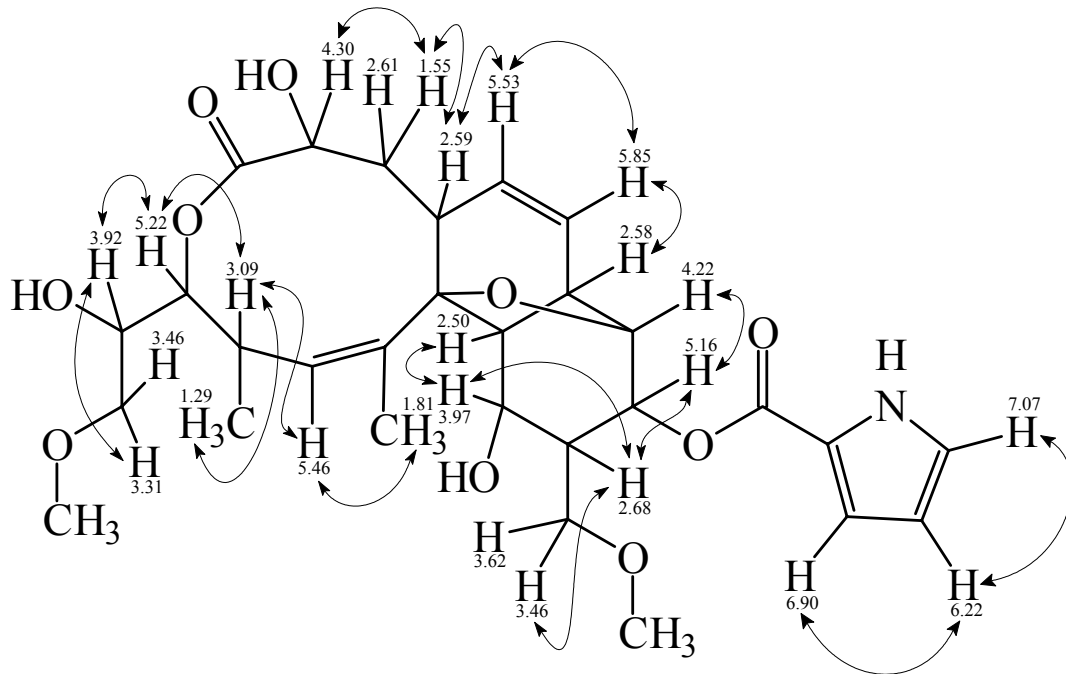


Abbildung 56: H,H-COSY-NMR-Kopplungen von Nargenicin B1 (**67**) in [D₆]Aceton.

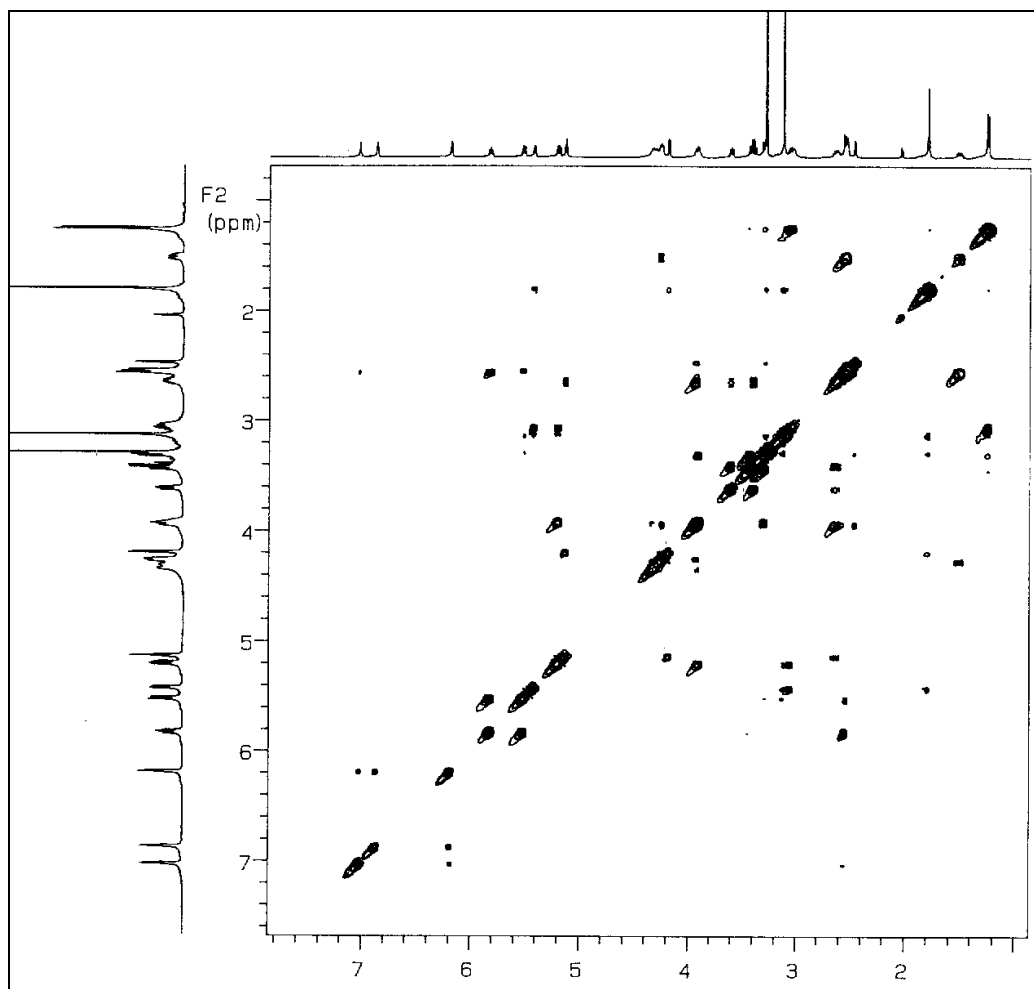


Abbildung 57: H,H-COSY-NMR-Spektrum von Nargenicin B1 (**67**) in $[D_6]$ Aceton.

Mit den Daten des H,H-COSY-NMR-Spektrums ließen sich nahezu alle Verknüpfungen im Molekül finden. Nur wegen der Anbindung des Pyrrolrestes und der zwei Methoxygruppen mußten die entsprechenden Kopplungen im HMBC-NMR-Spektrum überprüft werden. In Abbildung 58 sind nur diese relevanten Kopplungen dargestellt.

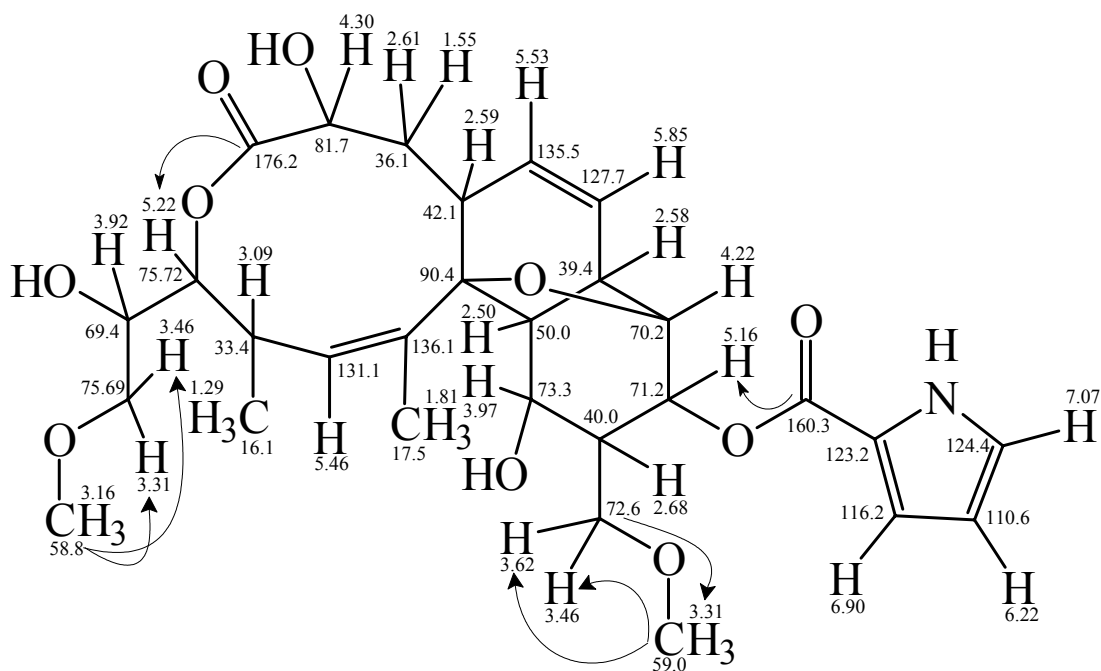


Abbildung 58: Relevante HMBC-NMR-Kopplungen von Nargenicin B1 (67) in $[\text{D}_6]$ Aceton.

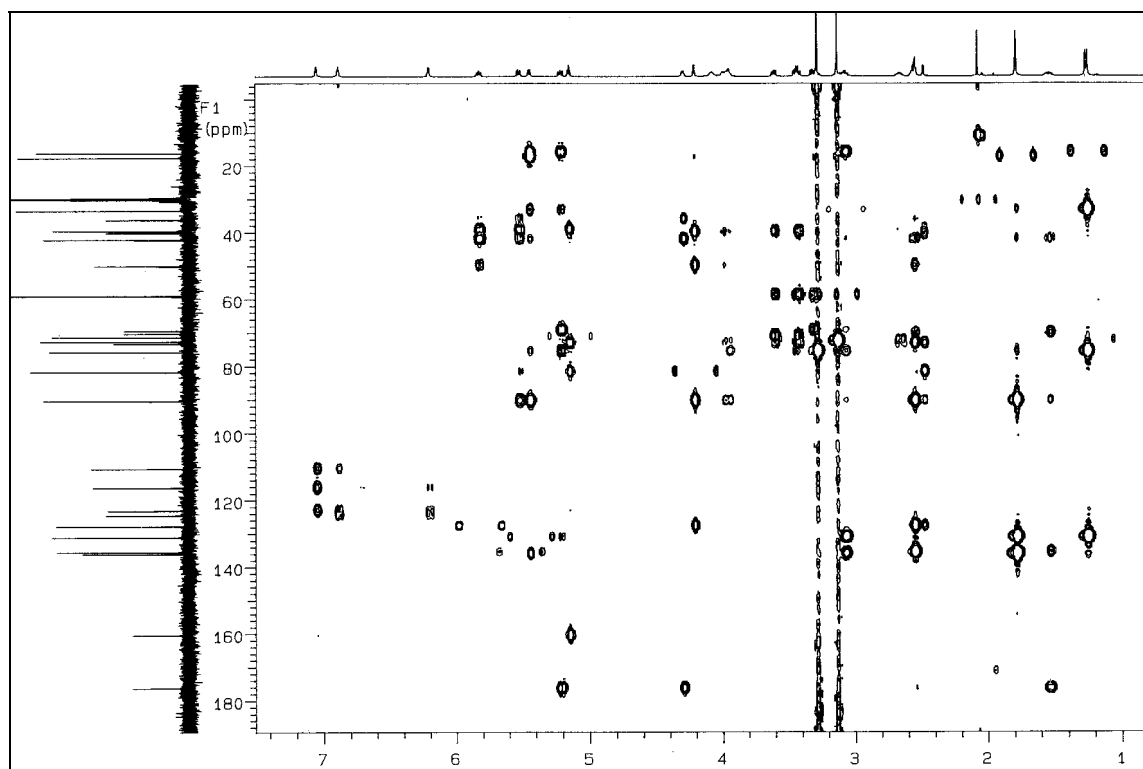
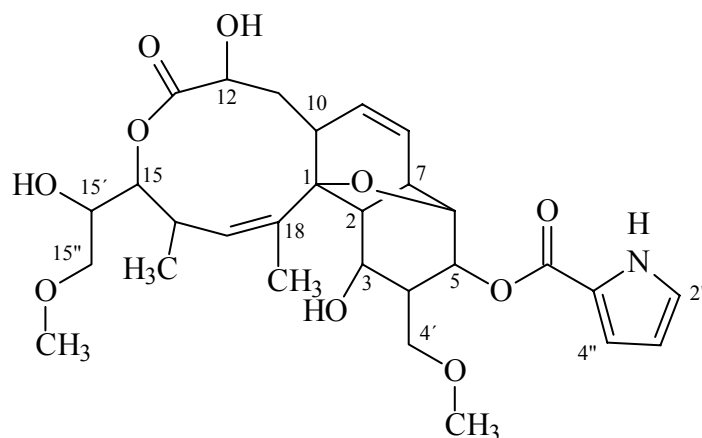


Abbildung 59: HMBC-NMR-Spektrum von Nargenicin B1 (67) in $[\text{D}_6]$ Aceton.

Mit den bisherigen Informationen waren die Konnektivitäten eindeutig geklärt. Um die Stereochemie zu überprüfen, wurden die ^1H -NMR-Kopplungskonstanten des Nargenicin A mit

den experimentell ermittelten verglichen, wobei eine weitgehende Übereinstimmung gefunden wurde (s. Tabelle 4).



67

Tabelle 4: Vergleich der experimentellen ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten mit Literaturdaten des Nargenicin A und mit für Nargenicin B berechneten Werten.

Nr.	$^{13}\text{C}_{\text{exp}}$	$^{13}\text{C}_{\text{Narg. A}}$	$^{13}\text{C}_{\text{theo}}$	Multiplizität*	$^1\text{H}_{\text{exp}}$ ($^{\circ}\text{J}$)	$^1\text{H}_{\text{Narg. A}}$ ($^{\circ}\text{J}$)
13	176.2	172.4	171.0	C_q	-	-
6''	160.3	160.4	160.0	C_q	-	-
18	136.1	134.1	149.8	C_q	-	-
9	135.5	(132.5)**	133.3	CH	5.53 dd (9.0, 2.9)	5.62 dd (9.0, 2.7)
17	131.1	(131.1)	123.5	CH	5.46 dq (7.0, 1.0)	5.60 dq (7.3, 0.6)
8	127.7	127.8	131.8	CH	5.85 ddd (9.0, 6.8, 1.7)	5.91 ddd (9.2, 7.0, 1.4)
2''	124.4	132.5	123.4	CH	7.07 td (4.2, 1.8)	7.03 td (2.7, 1.5)
5''	123.2	121.9	122.9	C_q	-	-
4''	116.2	115.3	115.2	CH	6.90 m	6.93 ddd (3.7, 2.4, 1.5)
3''	110.6	110.0	110.3	CH	6.22 dt (4.2, 1.8)	6.33 dt (3.6, 2.6)
1	90.4	88.9	80.0	C_q	-	-
12	81.7	72.6	72.4	CH	4.30 t (4.4)	3.75*** dd (11.7, 3.7)
15	75.72	78.8	75.2	CH	5.22 dd (8.6, 6.4)	5.20 t (7.0)
15''	75.69	-	71.4	CH_2	3.46/3.31	-
3	73.3	75.7	71.5	CH	3.97 m	3.72 dd (10.8, 2.5)
4'	72.6	-	70.5	CH_2	3.62/3.46	-
5	71.2	73.6	77.5	CH	5.16 t (4.9)	5.18 t (4.6)
6	70.2	81.8	79.0	CH	4.22 d (4.9)	4.28 d (4.9)
15'	69.4	66.1	69.7	CH	3.92	4.17***
4'- OCH_3	59.0	-	58.7	OCH_3	3.31	-
15''- OCH_3	58.8	-	57.9	OCH_3	3.16	-

2	50.0	(38.9)	48.5	CH	2.50 d (2.0)	2.58 d (2.0)
7	42.1	(49.0)	46.2	CH	2.58 m	2.57 d (7.0)
4	40.0	(34.6)	44.4	CH	2.68 m	2.40 ^{***} m
10	39.4	(42.1)	37.2	CH	2.59 m	2.40 dqd (10.8, 6.8, 5.0)
11	36.1	34.3	36.4	CH ₂	2.61/1.55 m/ ddd (16.4, 6.4, 4.4)	2.59/1.47 ddd (15.1, 11.7, 3.7)/ dt (15.1, 3.4)
16	33.4	32.6	32.6	CH	3.10 q (6.8)	3.22 q (7.0)
18-CH ₃	17.5	16.8	19.2	CH ₃	1.81 s	1.84 s
16-CH ₃	16.1	(15.4)	14.2	CH ₃	1.29 d (6.8)	1.31 d (6.8)

* ohne vier austauschbare Protonen

** eingeklammerte ¹³C-NMR-Werte sind nicht eindeutig zugeordnet

*** andere Substitution als in Nargenicin B1

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte bewiesen werden, daß die Stereochemie der isolierten Verbindung der des Nargenicins B1 (**67**) entspricht.

1-(9H-β-Carbolin-1-yl)-3-hydroxy-propan-1-on

Die dritte Fraktion enthielt eine gelbe Substanz, die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure dunkelrot anfärben ließ und nur in sehr geringer Menge isoliert werden konnte. Ihr ¹H-NMR-Spektrum zeigte im aromatischen Bereich ein Signalmuster von sechs Protonen, von denen die beiden stark tieffeldverschobenen Dublettsignale bei $\delta = 8.52$ und 8.18 wahrscheinlich zu zwei benachbarten Protonen gehörten. Die anderen drei Signale bei $\delta = 8.16$, 7.60 und 7.35 deuteten auf einen zweiten 1,2-disubstituierten Ring hin. Im Zusammenhang mit dem austauschbaren Proton bei $\delta = 10.29$ und dem früher isolierten Perlolyrin (**59**) ergab sich der Verdacht, daß es sich um ein weiteres β -Carbolinderivat handeln könnte. Der Vergleich mit einem ¹H-NMR-Spektrum von Flazin (**59b**) ergab eine genaue Übereinstimmung der aromatischen Signale. Außerdem folgt daraus, daß die Verbindung nur eine Substitution in Position 1 haben konnte, die aufgrund der Triplettssignale bei $\delta = 4.10$ und 3.58 eine beidseitig mit tieffeldverschiebenden Substituenten verbundene Ethyleneinheit enthalten mußte.

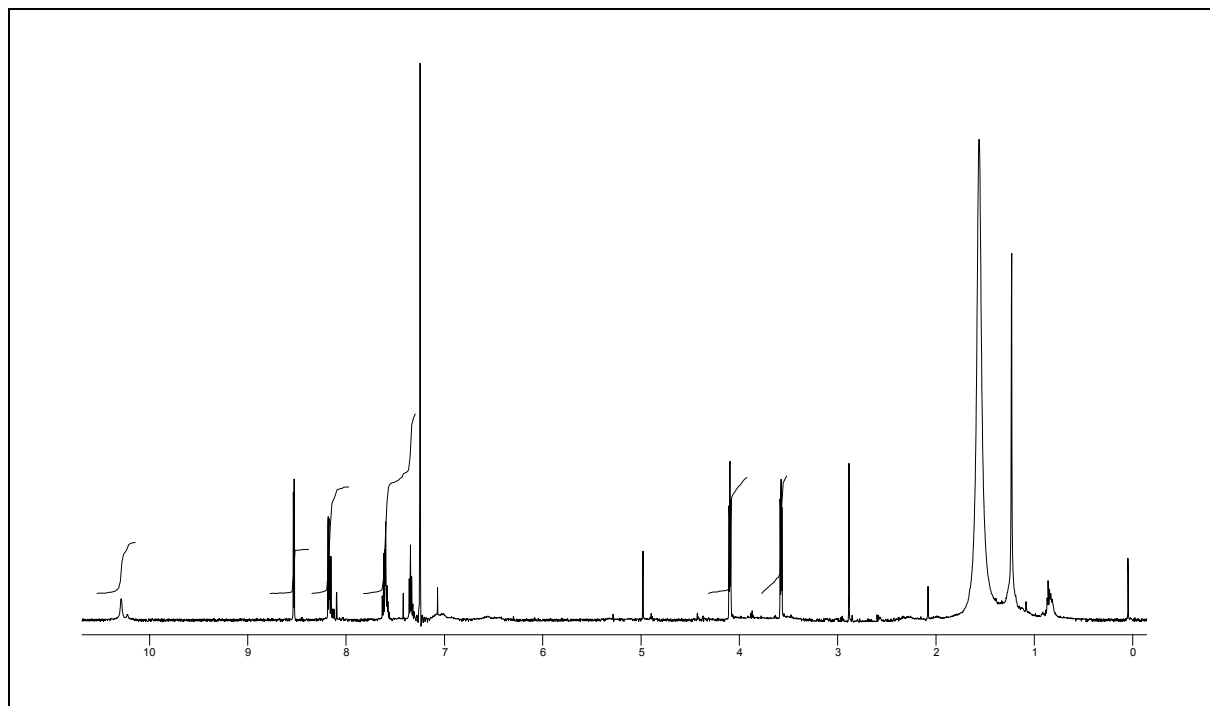
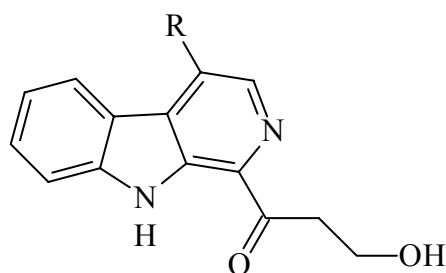


Abbildung 60: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von 1-(9H- β -Carbolin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (**68a**) in CDCl_3

Von der Masse der bisher bestimmten Teilstrukturen zur Molmasse (EI-MS) von 240 Da fehlten noch 45 Da, was einer Carbonyl- und einer Hydroxygruppe entspricht. Wegen der zu geringen isolierten Menge war eine Überprüfung durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie nicht mehr möglich, aber die aus dem oben Beschriebenen abzuleitende Summenformel $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ konnte mit hochauflösender EI-Massenspektrometrie bestätigt werden. Die ^1H -NMR-Daten der Ethyleneinheit konnten mit denen des bekannten Naturstoffs Oxapropalin G (**68b**) verglichen und bestätigt werden.^[103] Demzufolge hat die isolierte Verbindung die Struktur **68a**. Eine Datenbankrecherche in AntiBase, Dictionary of Natural Products[®] und Beilstein blieb erfolglos, d.h. 1-(9H- β -Carbolin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (**68a**) ist als Naturstoff neu.



68a: R = H

68b: R = Me

Zusammenfassung

Der Bedarf an neuartigen Wirkstoffen ist insbesondere für medizinische Anwendungen immer noch ungebrochen, weil zunehmend auftretende multiresistente Infektionskeime mit den heute zur Verfügung stehenden Antibiotika schwer zu bekämpfen sind und das Wissen um biochemische Angriffspunkte zur Behandlung anderer Krankheiten stetig steigt. Als lohnendste Quelle für Verbindungen mit hoher Komplexität und Strukturvielfalt gelten Naturstoffproduzenten, wobei besonders die metabolische Leistungsfähigkeit von Mikroorganismen hervorzuheben ist.

Aufgrund der steigenden Zahl bekannter Naturstoffe wird auch in diesem Bereich das Auffinden neuer Strukturen immer schwieriger. Einer der Auswege aus dieser Situation ist die Untersuchung andersartiger Mikroorganismen, die man in ungewöhnlichen Lebensräumen finden kann. Aus diesem Grunde sollte erstmals systematisch der Sekundärmetabolismus psychrophiler Bakterien aus dem Meereis der Arktis und Antarktis untersucht werden.

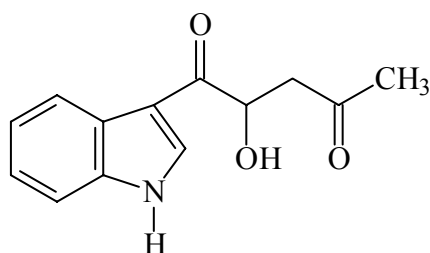
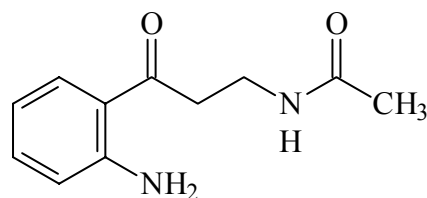
Insgesamt wurden dazu vom Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven 51 Bakterienstämme zur Verfügung gestellt, deren Extrakte für eine erste Bewertung einem mikrobiologischen, chemischen und HPLC-UV-Screening unterzogen wurden. Zusätzlich testete die Firma Oncotest gegen Krebszellen, wobei sechs Extrakte hohe Aktivitäten zeigten.

Um die zu Beginn der Arbeiten sehr geringen Extraktausbeuten zu erhöhen, wurden die Fermentationsbedingungen optimiert und durch die Entwicklung geeigneter Gefäße die Anzuchtkapazitäten verdreifacht. Dadurch erreichte die Ausbeute immerhin ein zufriedenstellendes Maß, welches durch Variation der Nährmedienzusammensetzung noch weiter gesteigert werden sollte. Dazu kultivierte man zwei Stämme mit vier weiteren Nährmedien, jedoch ohne signifikanten Erfolg.

Für die Aufarbeitung der Fermenterkulturen erwies sich die ansonsten routinemäßig durchgeführte Extraktion mit Ethylacetat als wenig geeignet, weil die bearbeiteten Bakterien starke Schleimbildner sind und das Zellmaterial durch Filtration nicht vollständig abtrennbar war. Aus diesen Gründen wurde die Expanded-Bed-Harzextraktion eingeführt und an die Bedürfnisse angepaßt.

Aufgrund der verschiedenen Optimierungen und Fermentationsdauern von drei bis vier Wochen konnten im Rahmen dieser Arbeit nur acht Meereisbakterienstämme intensiver bearbeitet werden. Dabei wurden viele wohlbekannte Naturstoffe, insbesondere einige häufig enthaltene Prolyl-Diketopiperazine, mit einer Molmasse unter 300 Da gefunden. Eine aus dem ark-

tischen Stamm ARK XIII/2 437 isolierte Verbindung ist 4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (**39**), das vorher schon als Pilzmetabolit bekannt war. Ein anderer aus dem antarktischen Stamm ANT V/2 253 isolierter Naturstoff ist N-Acetylkynuramin (**35a**).

**39****35a**

Mit einem HPLC-ESI-Screening von zwei Rohextrakten konnte jedoch gezeigt werden, daß auch Metabolite mit Molmassen größer als 400 Da enthalten sind. Und es wurden einige Substanzen isoliert, die komplexe $^1\text{H-NMR}$ -Spektren lieferten, aber wegen zu kleiner Mengen nicht vollständig aufgeklärt werden konnten.

Einige der Fermenterextrakte zeigten in den mikrobiologischen Hemmtests Aktivitäten, die bei der Auftrennung verloren gingen und auch dann nicht wiedergefunden wurden, wenn aus einer aktiven Fraktion alle Substanzen isoliert wurden, die in ansatzweise ausreichender Menge enthalten waren. Es deutet also alles daraufhin, daß die untersuchten Bakterien durchaus dazu in der Lage sind, komplexere und aktive Sekundärmetabolite zu bilden. Die Ursache für die zu kleinen Mengen, in denen sie isoliert wurden, ist wahrscheinlich der durch die niedrigen Temperaturen verlangsamte Stoffwechsel der Psychrophilen: Während man beispielsweise bei Nordseebakterien aus 20-l-Fermentationen nach viertägiger Anzucht Rohextraktausbeuten von 1 – 2 g erreicht, liegen diese bei den Meereisbakterien nach drei- bis vierwöchiger 60-l-Fermentation durchschnittlich bei 400 – 800 mg. Bei einer Fortführung der Untersuchungen sollten daher noch umfassendere Anzuchtexperimente durchgeführt werden. Besonders interessant wäre dabei zu prüfen, was und wieviel die Bakterien an der für sie existierenden Temperaturobergrenze von 15 °C produzieren.

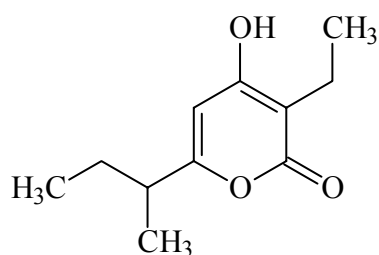
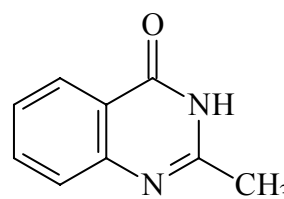
Wegen der langen Fermentationszeiten bei den psychrophilen Bakterien ergaben sich ausreichend Gelegenheiten, die Sekundärmetabolite anderer Mikroorganismen zu untersuchen. Ausgewählt und bearbeitet wurden dafür zunächst vier marine Streptomyceten, deren Extrakte hohe Aktivitäten gegen Tumorzellen zeigten.

Einer dieser Stämme war B 4481, dessen Fermenterextrakt u.a. durch Gegenstrom-Verteilungschromatographie (HSCCC) aufgetrennt wurde. Als bereits aus *Streptomyces viridochromogenes* bekanntem Naturstoff wurde Germicidin (**49**) isoliert, das die Sporulation

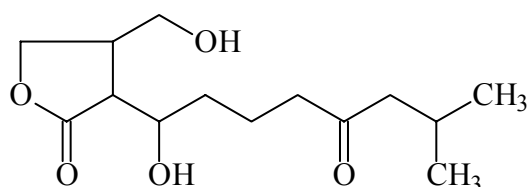
hemmt. Für die Identifizierung mittels AntiBase genügten die $^1\text{H-NMR}$ spektroskopischen Daten. Das Ergebnis wurde massenspektrometrisch bestätigt.

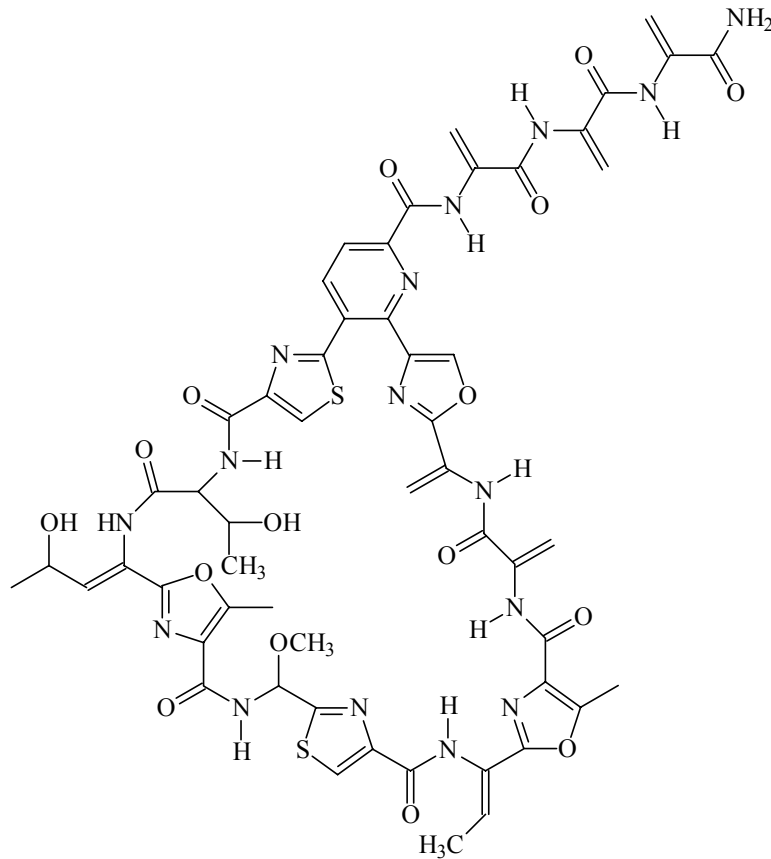
Der Rohextrakt des Stammes B 4710 enthielt eine mittelpolare orangefarbene Substanz, die sich chemisch wie ein Actinomycin verhielt und im bioautographischen Hemmtest antibiotische Wirkung zeigte. Die Verbindung wurde nach der Aufreinigung in einem Schritt als das stark cytotoxisch wirkende Actinomycin D (**50**) identifiziert.

Aus dem Extrakt des Stammes B 7029 konnte 2-Methyl-4(3H)-chinazolinon (**51**) isoliert werden.

**49****51**

Der Extrakt des terrestrischen Streptomyccetenstammes GW 1/1829 zeigte eine hohe Aktivität gegen Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), wofür vermutlich das isolierte Thiopeptid-Antibiotikum Sulfomycin I (**58**) die Ursache ist. Die Identifizierung gelang durch hochauflösende ESI-Massenspektrometrie und den Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren mit den Literaturdaten. Außerdem wurde das neue Butanolid 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) isoliert, das eine große Ähnlichkeit zu Gräfe's Faktor II aufweist. Diese und andere sehr ähnliche Butanolide beeinflussen den Stoffwechsel des Produzenten als Signalstoffe. Als weiterer Sekundärmetabolit wurde das β -Carbolinderivat Perlolyrin (**59**) gefunden.

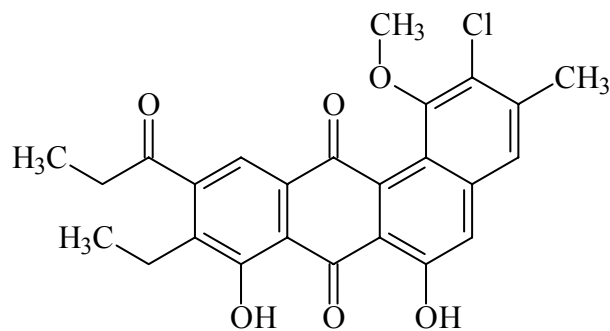
**57**



58

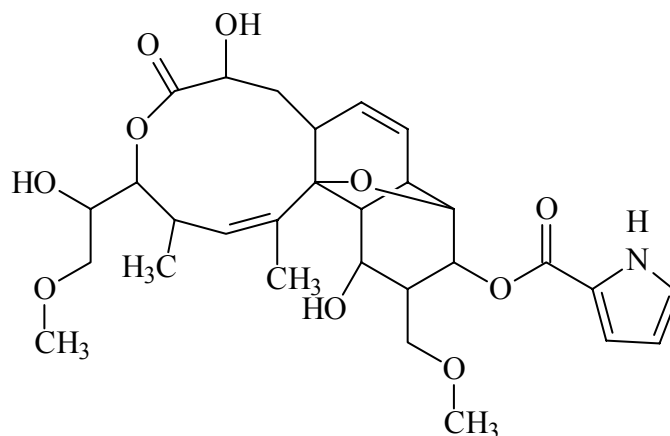
Der Stamm GW 22/1818 bildete ein intensiv blau pigmentiertes Mycel. Nach einigen Versuchen produzierte der Stamm die Farbstoffe auch in ausreichender Menge für die Strukturaufklärung, aber durch die unzureichende Löslichkeit ließen sich die drei aufgereinigten Substanzen nur $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch vermessen. In Verbindung mit den UV-Daten und den Molmassen läßt sich mit einiger Sicherheit sagen, daß es sich um Derivate der erst kürzlich in unserer Gruppe von Maskey isolierten indigoartigen Akashine handelt.

Zusätzlich konnte aus dem Extrakt das rote Hydroxychinon F 1301 (**63a**) isoliert werden, dessen bisher unbekannte Struktur mit 2D-NMR-Spektren aufgeklärt werden konnte.

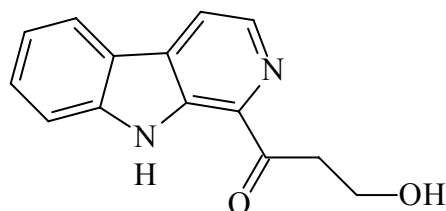


63a

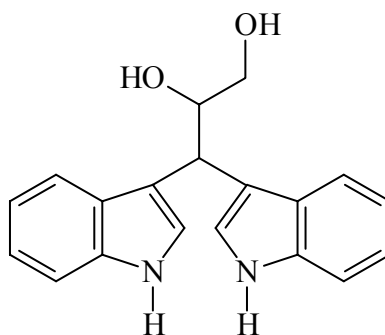
Während der antibiotisch aktive Stamm GW 5/1543 keine interessanten Naturstoffe lieferte, konnte aus GW 39/1573 das Makrolid-Antibiotikum Nargenicin B1 (**67**) isoliert werden. Weil hiervon bisher aber nur wenige Strukturdaten über ein Patent zugänglich sind, wurde zur Bestätigung eine vollständige Charakterisierung mit 2D-NMR-Spektren durchgeführt.

**67**

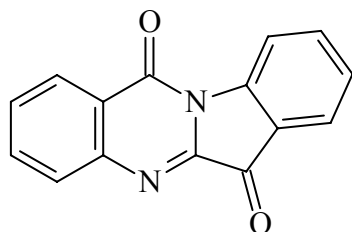
Außerdem wurde noch das bisher unbekannte β-Carbolin 1-(9H-β-Carbolin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (**68**) isoliert. In diesem Fall reichten zur Aufklärung der Struktur die ¹H-NMR- und massenspektrometrischen Daten aus.



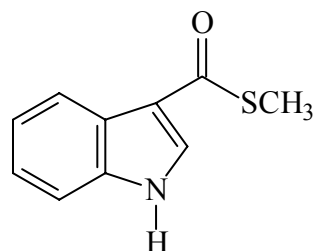
Schließlich wurde noch der in der Nähe von Helgoland von Wagner-Döbler gesammelte Bakterienstamm HEL 45 bearbeitet. Dabei isolierte man aus dem Extrakt der ersten Fermentation (R)-(+)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**), dessen absolute Konfiguration durch die Synthese der Verbindung aufgeklärt wurde.

**46**

Bei einer zweiten Anzucht verwendete man ein bei Dr. Lang (GBF) optimiertes Nährmedium. Aus dem Extrakt konnten das bekannte antibiotisch wirksame Tryptanthrin (**47**) und der neue Naturstoff Indol-3-carbonsäurethiomethylester (**48**) gewonnen werden.



47



48

Die neu entdeckten Naturstoffe aus Streptomyceten bestätigen erneut, daß Organismen dieser Gattung potente Naturstoffproduzenten sind und wie bei F1301 (**63**) auch noch Verbindungen gefunden werden, die sich deutlich von bekannten Strukturen unterscheiden. Häufiger findet man jedoch Substanzen wie das β -Carbolin **68** oder das Butanolid **57**, die sich nur in der Substitution eines Kohlenstoffatoms von bereits publizierten Verbindungen unterscheiden, und somit in der Regel keine wesentlich neuen Erkenntnisse liefern. Das bestätigt den Trend, in diesem Bereich immer mehr Stämme für eine neue interessante Verbindung untersuchen zu müssen. Weil mit steigendem Schwierigkeitsgrad aber auch die analytischen Methoden verfeinert wurden, lohnt sich die Suche zur Zeit noch. Langfristig müssen jedoch andere Quellen erschlossen werden, um neuartige Naturstoffe zu finden. Wie auch aus den hier geschilderten Arbeiten über Polareisbakterien hervorgeht, sind die dabei auftretenden Schwierigkeiten vielfältig: Ungewöhnliche Produzenten findet man an schwer zugänglichen Orten, und um sie kultivieren zu können, bedarf es meistens neuer Techniken und Nährmedien. Wie sich gezeigt hat, ist der Schritt von der Bakterienkultur auf Agarplatte zu einer Anzucht im Fermenter, bei der es zu einer zufriedenstellenden Expression des Sekundärmetabolismus kommt, nicht einfach zu vollziehen. In der Folge auftretende Probleme beim Aufarbeiten der Kulturen oder bei der Strukturaufklärung mit sehr kleinen Substanzmengen vervollständigen den Eindruck, daß noch viel interdisziplinäre Forschungsarbeit auf diesem Gebiet zu leisten ist. Vielversprechende Alternativen dazu sind derzeit allerdings nicht erkennbar.

Materialien und Methoden

Allgemeines

Drehwerte: Polarimeter Modell 241 (Fa. Perkin-Elmer). – **IR-Spektren:** Shimadzu FT-IR; (KBr-Preßlinge und Film). – **UV/VIS-Spektren:** Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrometer. – **¹H-NMR-Spektren:** Varian XL 200 (200 MHz), Varian VXR 200 (200 MHz), Varian VXR 300 (300 MHz), Bruker WM 300 (300 MHz), Bruker Advance DRX 500 (500 MHz), Varian INOVA 500 (500 MHz), Varian VXR 500 (500 MHz). Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit. – **¹³C-NMR-Spektren:** Varian XL 200 (50.3 MHz), Varian VXR 200 (50.3 MHz), Varian VXR 300 (75.5 MHz), Bruker WM 300 (75.5 MHz), Bruker Advance DRX 500 (125.7 MHz), Varian INOVA 500 (125.7 MHz), Varian VXR 500 (125.7 MHz). Abkürzungen : APT (Attached Proton Test): CH/CH₃-Signale stehen nach oben, C/CH₂-Signale nach unten. Chemische Verschiebungen in δ-Werten relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard. – **Massenspektren:** EI-MS mit Varian MAT 731 (70 eV), Varian 311A (70 eV), AMD-402 (70 eV). Hochauflösung: Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz. DCI-MS: Finnigan MAT 95 A, Reaktandgas: NH₃; (+)ESI-MS mit Quattro Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Finnigan TSQ 7000 mit nano-ESI-API-Ionenquelle; ESI-MS LCQ (Finnigan). – **HPLC:** Analytische Anlage: Gerät I) Knauer HPLC-Anlage bestehend aus Spektral-Digital-Photometer A0293, zwei Pumpen Typ 64 A0307 und HPLC-Software V2.22 mit PC-XT Commodore, Mischkammer: A0285, Knauer Injektions-Schaltventil 6/1 A0263 (Typ Rheodyne); Probenschleife 20 µl. Gerät II) Jasco HPLC-Anlage bestehend aus Dioden-Array-Multiplewavelength Detector Jasco MD-910 mit Time acc. 800 ms, Wave acc. 4 nm, zwei Pumpen des Typs Jasco Intelligent Pump PU-987 mit Mischkammer, Rheodyne-Ventil mit 20 µl Probenschleife, Borwin HPLC-Software; Präparative Anlage: analog der analytischen, nur mit I) Knauer präparativer Durchflußküvette (d = 0.5 mm), Probenschleife 500 µl, II) Jasco präparativer Durchflußküvette (d = 1 mm), Probenschleife 500 µl; analytische Säulen: 1) Vertex 4 x 250 mm mit 4 x 4 mm Vorsäule, Stationäre Phase: Eurochrom Eurospher RP 100-C18, 5 µm, 2) Vertex 4.6 x 125 mm, Stationäre Phase: Hypersil RP 120-C18, 5 µm, 3) Vertex 4.6 x 250, Stationäre Phase: Nucleosil NP 100-C18, 5 µm; präparative Säulen: Vertex 16 x 250 mm mit 16 x 30 mm Vorsäule, Stationäre Phase: Eurochrom Eurospher RP 100-C18, 5 µm; Lösungsmittel für HPLC: Alle Eluenten wurden über Membranfilter (Wasser: Celluloseacetat, Porenweite 45 µm, Sartorius, Göttingen; Acetonitril: Filter RC-Vlies verstärkt, Porenweite 45

µm, Sartorius, Göttingen) filtriert und 15 min durch Ultraschall entgast; die Proben wurden durch ein PTFE-Filter (Minisart SRP15, Porenweite 0.20 µm, Sartorius, Göttingen) filtriert. Für die Trennung wurde durch fraktionierte Destillation zurückgewonnenes Acetonitril/Wasser-Azeotrop (83.7 % Acetonitril / 16.3 % Wasser, Siedepunkte: 78.5 °C) eingesetzt. – **Filterpresse:** Schenk Niro 212 B40. – **Gefriertrocknung:** Liomatic 3, Lioma GmbH, Göttingen. – **Harzextraktion:** Eppendorf Schlauchpumpe 5260, Glassäule 3 × 100 cm mit Hülse (NS 29) und Glasfritte (G1), Olive mit Kern (NS 29) und Glasfritte (G1).

Materialien

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co., Düren). R_F -Werte beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das bei der SC angegebene Laufmittel an neutralem Kieselgel. – **Präparative Dickschichtchromatographie (PDC):** Kieselgel P/UV₂₅₄ (55 g/100 ml Wasser, Macherey-Nagel & Co.) goß man auf waagrecht liegende Glasplatten (20 × 40 cm oder 2 je 20 × 20 cm), ließ an der Luft trocken und aktivierte 4 h bei 130 °C. – **Säulenchromatographie (SC):** MN Kieselgel 60: 0.05 - 0.2 mm, 70 - 270 mesh (Macherey-Nagel & Co.); Kieselgel für Flash-Chromatographie: 30 - 60 µm (J. T. Backer); Modifiziertes Kieselgel für Flash-Chromatographie: 40 – 63 µm LiChroPrepDIOL[®] (Merck); Die Säulen wurden naß gefüllt. – **Ausschlußchromatographie:** Sephadex LH-20 (Pharmacia). – **Harzextraktion:** Amberlite[®] XAD-7, 20 – 50 mesh (FLUKA); Amberlite XAD-16, 13 – 80 mesh (Serva); Amberlite XAD-2, 300 – 1000 µm (Serva).

Sprühreagenzien

Anisaldehyd/Schwefelsäure: Zu 100 ml einer Stammlösung aus 85 ml Methanol, 14 ml Essigester und 1 ml Schwefelsäure fügte man 1 ml Anisaldehyd hinzu (universales Sprühreagenz). Die besprühten Chromatogramme werden mit dem Fön bis zur Farbentwicklung erwärmt. – **Ehrlichs Reagenz:** 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung aus 25 ml Salzsäure (36 %) und 75 ml Methanol gelöst. Es färbt Indole beim Erwärmen rot bis violett, andere N-Heterocyclen meist grau auf gelblichem Untergrund an. – **Ninhydrin:** Es werden 0.3 g Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindan-1,3-dion) in 95 ml iso-Propanol gelöst und anschließend mit 5 ml Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin) und 5 ml Essigsäure (96 %) versetzt. Die Reagenz färbt Aminosäuren, Peptide und Polypeptide mit freier Aminogruppe beim Erwärmen blau bis violett an. – **Succinimid-Fluorescein:** Zuerst besprüht man das Chroma-

togramm mit einer Lösung, die 35 mg N-Bromsuccinimid in 100 ml 1,1,1-Trichlorethan enthält, und läßt bei Raumtemp. trocknen. Für das zweite Sprühreagenz werden 330 mg Fluorescein in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst; 3 ml davon füllt man mit EtOH auf 100 ml auf. Mit diesem Reagenz wird das Chromatogramm ein zweites Mal besprüht. Schwefelhaltige Verbindungen sind als grün fluoreszierende Flecken auf rötlichem Grund bei 366 nm zu sehen. – **Iodazid:** Lösung a: Frisch bereitete Sprühreagenz gibt man 3.5 g NaN_3 zu 100 ml einer 0.1 N Iodlösung. Lösung b: Eine Suspension von 1 g Stärke in 100 ml Wasser wird bis zur Klärung erhitzt. Das Chromatogramm besprüht man mit NaN_3/I_2 -Lösung und nach kurzem Antrocknen mit der Stärkelösung. Schwefelhaltige reduzierende Substanzen ergeben durch den gebildeten Iod/Stärke-Komplex violette Färbungen. Trockenes Iodazid ist explosiv! – **Iodplateat:** Die Chromatogramme werden mit einer Lösung aus gleichen Volumina einer 1.1proz. KI-Lösung und einer 0.135proz. $[\text{PtCl}_6]^{2-}$ -Lösung angesprüht. Schwefelhaltige Substanzen sind als braune Flecken erkennbar. – **Chlor/ o-Dianisidin:** Das Reagenz bereitet man aus 100 ml 0.032proz. o-Dianisidin in 1 N Essigsäure, 1.5 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml Wasser, 115 ml Aceton und 450 mg KI. Eine angefeuchtete DC-Folie wird ca. 30 min in eine Chloratmosphäre (0.5 g $\text{KClO}_3 + 2 \text{ ml konz. HCl}$) gebracht, 1 h belüftet und mit der Reagenz-Lösung sättigend besprüht. Durch gelindes Erwärmen kann eine Farbtintensivierung erreicht werden.

Mikrobiologische Materialien

Fermenter: 20-l-Fermenter (Fa. Meredos GmbH, Göttingen) bestehend aus Kulturgefäß, Magnet-Propellerrührer, Kühlschlange mit Thermostat; Steuereinheit mit pH-Regler, Antischaum-Regler, Fa. Meredos GmbH Göttingen. 50-l-Fermenter Typ Beostat U bestehend aus 70-l-Metallgefäß (50 l Arbeitsvolumen), Blattrührer, Kulturgefäßummantelung mit Thermostat für Autoklavierung, Kühlung und Temperierung, Fa. Braun Melsungen. 10-l-Fermenter bestehend aus 10-l-Steilbrustflasche, Magnet-Stabrührer, Schraubdeckel mit Lufteinlaß und –auslaß und Gummiseptum. – **Steuereinheiten:** pH-Regler, Antischaum-Regler und Regelung der Luftzufuhr, Fa. Meredos GmbH Göttingen.. – **Schüttler:** Infors AG (CH 4103 Einbach) Typ ITE. – **Autoklav:** Albert Dargatz Autoklav, Volumen 119 l, Betriebstemperatur 121 °C, Betriebsdruck 1.2 kg/cm^2 . – **Stammhaltung:** Tiefkühlagerung in Dewargefäß, Fa. 1'Air liquid Typ BT 37 A. – **Kapillaren zur Tiefkühlagerung:** Durchmesser 1.75 mm, Länge 80 mm, Fa. Hirschmann Laborgeräte Eberstadt. – **Erde für Erdkultur:** Luvos Heilerde LUVOS JUST GmbH & Co. Friedrichshof (aus dem Reformhaus bezogen). – **Ultraturrax:** Janke & Munkel KG. – **Antibiotika-Testplättchen:** 9 mm Durchmesser, Schleicher & Schüll No. 321

261. – **Nährbodenbestandteile:** Glucose, Hefeextrakt und Malzextrakt (Fa. Merck, Darmstadt), Bacto Agar, (Fa. Difco). – **Antischaum-Lösung:** Niox PPG 2025; Union Carbide Belgium N. V. (Zwijndrecht). – **Petrischalen:** Durchmesser 94 mm, Höhe 16 mm, Fa. Greiner Labortechnik, Nürtingen. – **Sterilfilter:** Midisart 2000, 0.2 µm, PTFE-Filter, Sartorius, Göttingen. – **Salinenkrebseier (*Artemia salina*):** SERA Artemia Salinenkrebseier, SERA Heinsberg. – **Salinenkrebsfutter:** Mikrozell DOHSE Aquaristik KG Bonn (Salinkrebseier und -futter sind über den Aquarien-Fachhandel zu beziehen). – **Mikrotiterplatten:** 4 x 6, Ø 18 mm, h 20 mm, NunclonTM Delta (Nalge Nunc International, Rochester, USA).

Rezepturen

Alle Kultur-Medien wurden bei 1.2 bar und 121 °C autoklaviert. Die Verweildauer im Autoklav betrug für 1-l-Schüttelkulturen 33 min, für Fermenter-Medien in Form eines 2 l-Konzentrats 50 min und für den mit 16 l Wasser gefüllten Fermentationsbehälter 82 min.

Künstliches Seewasser:

Eisencitrat	2 g (vorher zermörsert)
NaCl	389 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	176 g
Na ₂ SO ₄	68.8 g (vorher in 2 l Wasser aufgelöst)
CaCl ₂	36 g
Na ₂ HPO ₄	0.16 g
SiO ₂	0.3 g
Spurenelement-Lösung	20 ml
Stamm-Lösung	200 ml

Mit Leitungswasser auf 20 l auffüllen.

Spurenelement-Lösung (Hoagland 1993):

H ₃ BO ₃	0.611 g
MnCl ₂	0.389 g
CuSO ₄	0.056 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.056 g
Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18H ₂ O	0.056 g
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.056 g

Co(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O	0.056 g
TiO ₂	0.056 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.056 g
LiCl	0.028 g
SnCl ₂	0.028 g
KI	0.028 g

Die Spurenelementsalze wurden in 1 l Leitungswasser gelöst.

Stammlösung:

KCl	110 g
NaHCO ₃	32 g
KBr	16 g
SrCl ₂ · 6H ₂ O	6.8 g (getrennt aufgelöst)
H ₃ BO ₃	4.4 g
NaF	0.48 g
NH ₄ NO ₃	0.32 g

Mit Leitungswasser auf 2 l auffüllen.

Nährmedien:

M₂⁺ ohne Seewasser:

Malz-Extrakt	10 g
Glucose	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

M₂⁺ mit Seewasser:

Malz-Extrakt	10 g
Glucose	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
Künstliches Seewasser	500 ml
Leitungswasser	500 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

Luria-Bertani-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.0-7.2 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

Soja-Mannit-Medium:

Soja (fettarm)	20 g
D(-)-Mannit	20 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

M-Test-Agar:

(für die Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus*, *Mucor miehei* (TÜ 284))

Malz-Extrakt	10 g
Hefe-Extrakt	4 g
Glucose	4 g
Bacto Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.3 eingestellt.

Sabouraud-Agar:

(für den Testkeim *Candida albicans*)

Glucose	40 g
Bacto Pepton	10 g
Bacto Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH = 7.3 eingestellt.

Nährlösung A

Sojamehl entfettet	30 g
Glycerin	30 g
CaCO ₃	2 g
künstliches Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Nährlösung N

Glucose	10 g
Stärke löslich	10 g
NZ-Amine	5 g
Fleischhydrolysat	7.5 g
Bacto-Pepton	7.5 g
Bacto-Yeast-Extrakt	5 g
künstliches Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Nährlösung O

(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KNO ₃	3 g
Sojamehl entfettet	4 g
Maisquellwasser	4 ml
Stärke löslich	6 g
künstliches Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Nährlösung B

Stärke	10 g
NZ-Amine	5 g
Fleischextrakt	7.5 g
Sojamehl	2 g
Hefeextrakt	5 g

KNO ₃	3 g
Algenextrakt	2.5 ml
künstliches Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Stammlösungen und Medien zur Algenkultivierung:

Fe-EDTA

Man löste 0.7 g FeSO₄ · 7H₂O und 0.93 g EDTA (Titriplex III) in 80 ml H₂O unter Erwärmen. Diese Lösung wurde mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Spurenelement-Lösung II:

Lösung A:

MnSO ₄ · H ₂ O	16.9 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	13.0 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	10.0 mg

Diese Salze wurden jeweils in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Die Lösungen wurden dann vereinigt.

Lösung B:

CuSO ₄ · 5H ₂ O	5.0 mg
H ₃ BO ₃	10.0 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10.0 mg

Die Salze wurden zusammengegeben und in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Lösung A und Lösung B wurden vereinigt und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Bold's Basal Medium (BBM):

NaNO ₃	0.250 g
KH ₂ PO ₄	0.175 g
K ₂ HPO ₄	0.075 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075 g
NaCl	0.025 g

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.025 g
Fe-EDTA	1.0 ml
Spurenelement-Lösung II	1.0 ml

Die Salze wurden jeweils in 10 ml Wasser gelöst. Diese Lösungen vereinigte man mit der Fe-EDTA- und der Spurenelement-Lösung II und füllte auf 1000 ml mit demineralisiertem Wasser auf.

Mikrobiologische und analytische Arbeitsmethoden

Stammhaltung und Anzucht der Streptomyceten

Die als Reinkulturen erhaltenen Stämme wurden auf Schrägagar (M₂⁺- für terrestrische bzw. M₂⁺ mit 50 % Seewasser-Medium für marine Streptomyceten) überimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Für die Glycerin-Dauerkultur schwemmte man das Mycel mit der entsprechenden Nährlösung ab. 0.5 ml dieser Suspension wurde in einem 2 ml Schraubdeckelglas mit 0.5 ml Nährlösung und 20 % Glycerin unter sterilen Bedingungen vermischt. Die Suspension wurde in Kapillaren aufgenommen, die mit einer abgeflammt Pinzette in der Mitte gehalten und in das Schraubdeckelgläschen getaucht wurden. Die zu 60 % gefüllten Kapillaren wurden dann in der nicht leuchtenden Flamme eines Bunsenbrenners an beiden Enden zugeschmolzen. Dabei war darauf zu achten, daß die äußerste Spitze der Kapillare nur für möglichst kurze Zeit erhitzt wurde. Man ließ an der Luft etwas abkühlen und gab die Kapillare in eine mit Ethanol gefüllte Petri-Glasschale. Undichte Kapillare saugen Ethanol auf und werden verworfen, die anderen zur Vermeidung weiteren Wachstums sofort auf Eis gelegt. Nachdem die Kapillare 24 h bei -20 °C gelagert wurde, bewahrte man sie in flüssigen Stickstoff auf.

Zum Animpfen wurde die Kapillare bei Raumtemperatur aufgetaut, in Ethanol desinfiziert, kurz durch die Flamme gezogen und mit einer abgeflammt Pinzette an beiden Enden abgebrochen. Man faßte die Kapillare mit Daumen und Zeigefinger mittig und brachte den Inhalt durch Aufstauchen des Handballens auf der Arbeitsplatte auf den Agar auf.

Für die Erdkultur sporenbildender Organismen tropfte man 1 ml der abgeschwemmten Suspension in ein zu 30 % mit sterilisierter Heilerde gefülltes Reagenzglas. Zum Trocknen wurde es mit Kapsenberg-Kappen verschlossen und 2 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt, danach bei 4 °C eingelagert.

Für eine Wiederanzucht von der Erdkultur wurde das Material mit einem Spatel auf eine Agarplatte gegeben, mit einer Impföse verteilt und 72 h bei 28 °C inkubiert. Die gewachsenen Kulturen dienten als Impfmateriale für Schüttelkulturen.

Biologisches und chemisches Screening

Schüttelkulturen

Fünf mit je 200 ml Nährmedium gefüllte und mit einem Baumwolltuch verschlossene 1 l-Schikanekolben (3 Schikanen) wurden 33 min bei 121 °C sterilisiert und mit Agarstückchen von einer 72 h bei 28 °C gewachsenen Plattenagarkultur angeimpft. Die Schikanekolben inkubiert man 72 h bei 28 °C mit ca. 95 Umdrehungen/min (Upm). Die Kulturbrühe wurde auf fünf 1 l-Rundkolben verteilt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde dreimal mit Essigester extrahiert und i. Vak. bei 40 °C eingeengt.

Aktivitätstests

Zur Bestimmung der antibiotischen Aktivität wurden Plattendiffusionstests mit *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Mucor miehei* (TÜ 284), *Candida albicans*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57), *Staphylococcus aureus* sowie *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* und *Scenedesmus subspicatus* durchgeführt. In die in CHCl₃/13 % MeOH (= Azeotrop) gelösten Rohextrakte (Konzentration 100 mg/ml) tauchte man Testblättchen ein, die nach dem Trocknen auf mit den Testkeimen beimpfte Agarplatten gelegt wurden. Nachdem die Kulturen 24 h bei 37 °C gewachsen waren, wurde der Hemmhofdurchmesser bestimmt. Die Algen wuchsen unter künstlicher Beleuchtung im Photoreaktor 72 h bei Raumtemperatur.

Die im chemischen Screening eingesetzten Chromatogramme (4 x 10 cm) wurden mit CHCl₃/5 % MeOH und CHCl₃/10 % MeOH entwickelt und mit Sprühreagenzien angefärbt oder unter Tages- und UV-Licht ausgewertet. Neben der Dokumentation in Vordrucken fotografierte man die DC-Platten.

Toxizitätstest

In einem 500 ml Scheidetrichter gab man zu 400 ml künstlichem Seewasser ca. 100 mg getrocknete *Artemia salina* Eier und ca. 100 mg Futter. Die Suspension wurde 24 bis 48 h bei Raumtemperatur von einem schwachen Luftstrom belüftet. Man ließ die Suspension 1 h ste-

ANT V/2 17	15	14	13	16	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 245	13	15	13	16	0	0	0	0	0	0	0	44
ANT V/2 253	0	18	14	13	0	0	0	0	0	0	0	100
ANT V/2 264	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 267	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	8	100
ANT V/2 268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
ANT V/2 293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
ANT V/2 306	0	16	12	14	0	0	15	0	0	0	9	-
ANT V/2 321	0	16	13	15	0	0	0	11	11	13	4	38
ANT V/2 323	13	14	15	14	11	0	0	0	0	0	0	78
ANT V/2 324	11	15	0	0	0	0	0	0	12	0	13	0
ANT V/2 325	14	0	12	15	-	0	0	0	0	0	4	0
ANT V/2 332	0	14	0	14	0	0	0	0	0	0	2	44
ANT V/2 340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 343	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 345	13	11	0	12	0	0	0	0	0	0	1	44
ANT V/2 358	16	0	12	18	-	0	0	0	0	0	2	-
ANT V/2 359	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 369	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	100	0
ANT V/2 369-A	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 369-N	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 369-O	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 369-SMG	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	-

ANT V/2 373	13	12	11	12	0	0	0	0	0	0	10	0
ANT V/2 375	14	0	0	13	0	0	0	0	0	0	4	44
ANT V/2 381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 399	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 411	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	44
ANT V/2 435	0	15	13	0	0	0	0	11	0	0	3	44
ANT V/2 437	0	16	16	14	0	0	0	13	12	0	0	100
ANT V/2 46	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	7	0
ANT V/2 464	14	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 50	16	14	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 507	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ANT V/2 509	0	14	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 51	16	0	14	20	-	0	0	11	0	0	0	-
ANT V/2 517	0	12	17	0	0	0	0	14	15	14	9	75
ANT V/2 524	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 560	0	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
ANT V/2 63	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	1	0
ANT V/I2 413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
ARK XIII/2 373	20	12	0	19	-	15	26	22	19	23	-	-
ARK XIII/2 374	15	0	0	14	-	0	14	16	15	16	-	-
ARK XIII/2 411	0	0	0	0	-	0	-	-	-	-	-	-
ARK XIII/2 442	0	0	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-

ARK XIII/2 449	0	0	0	0	-	0	-	-	-	-	-	-
----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Stamm ANT V/2 369

Der aus antarktischem Eis isolierte Stamm wird bei Frau Dr. Helmke im Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Auf Agar bildete der Stamm einen milchig-weißen Schleim.

Primärscreening

Aus einer 1-l-Schüttelkultur wurden 50 mg Rohextrakt erhalten, welcher keine Aktivität in den biologischen Tests aufwies. Im chemischen Screening waren zwei mit Anisaldehyd/Schwefelsäure hellbraun anfärbbare Zonen bei $R_f = 0.04$, eine UV-löschende bei $R_f = 0.28$ und eine weitere mit Ehrlich's Reagenz anfärbbare Zone bei $R_f = 0.41$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) detektierbar.

Fermentation und Aufarbeitung

Mit dieser Kultur beimpfte man vier 5-l-Erlenmeyerkolben, die jeweils 5 l des Nährmediums B enthielten, und inkubierte 21 d lang bei 4 °C und Upm. Diese Prozedur wurde wiederholt, so daß insgesamt 40 l Kulturbrühe zur Verfügung standen.

Jeweils 20 l der hellbraun gefärbten Kulturbrühe wurden 5 min mit dem Ultraturax behandelt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen filtrierte man über Celite und engte am Rotationsverdampfer i. Vak. ein. Man erhielt 240 mg RE 1 und 283 mg RE 2 als dunkelbraune Extrakte.

Einen Fermenter im 20-l-Maßstab inkubierte man 14 d lang bei 4 °C unter schwachem Rühren mit Nährmedium B. Beimpft wurde mit einer 1-l-Vorkultur. Jeweils 5 l der Kulturbrühe wurden 10 min mit Ultraschall behandelt, anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer i. Vak. eingengt. Man erhielt 203 mg eines hellgelben Eindampfrückstandes (RE 3).

Isolierung

Die vereinigten Rohextrakte RE 1 und RE 2 löste man in 80 ml MeOH und entfettete durch zweimaliges Ausschütteln mit jeweils 30 ml C_6H_{12} . Der methanolische Extrakt mit einem Gewicht von 284 mg wurde durch SC an Sephadex LH-20 (Säule 3 × 500 mm, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 6:4) in vier Fraktionen getrennt.

Die nach DC vereinigten Fraktionen II+III ergaben nach Trennung durch HPLC (mit $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ -Azeotrop/ $\text{H}_2\text{O} = 20:80$ für 10 min beginnen, Anstieg auf $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ -

Azeotrop/H₂O = 50:50 in 30 min, halten für 5 min; Durchfluß: 10.0 ml/min, Detektion: 195 - 600 nm) 10 Fraktionen (DSG41-DSG410). Fraktion DSG43 ergab 5.1 mg *cyclo*(4-Hyp-Phe) (**25b**, $t_R = 17.0$ min) als weißen Feststoff. Zusätzlich konnten als Fraktion DSG46 6.7 mg *cyclo*(Leu-Pro) (**26**, $t_R = 23.6$ min), als Fraktion DSG49 3.8 mg *cyclo*(Phe-Pro) (**27**, $t_R = 27.8$ min) und als Fraktion DSG410 1.3 mg *cyclo*(Pro-Trp) (**28**, $t_R = 29.5$ min) erhalten werden. Alle drei Verbindungen sind weiße Feststoffe.

Aus Fraktion IV erhielt man nach Trennung durch HPLC (mit CH₃CN/H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, Anstieg auf CH₃CN/H₂O-Azeotrop/H₂O = 40/60 in 15 min, Anstieg auf CH₃CN/H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 10 min, Durchfluß: 10.0 ml/min, Detektion: 195 - 600 nm) 2.2 mg gelbliches kristallines 3-(Hydroxyacetyl-)indol (**29**, $t_R = 27.0$ min).

***cyclo*(4-Hyp-Phe) (25b):** C₁₄H₁₆N₂O₃. - $R_f = 0.71$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - DCI-MS (NH₃): m/z (%) = 295 ([M + NH₃ + NH₄]⁺, 13), 278 ([M + NH₄]⁺, 100), 261 ([M+H]⁺, 10). - ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 7.42-7.18$ (m, 5 H, Ar-H), 5.70 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 4-NH), 4.58 (m, 1 H, 8-H), 4.47 (dd, ³ $J = 10.9$ Hz, ³ $J = 6.3$ Hz, 1 H, 3-H), 4.33 (dd, ³ $J = 10.2$ Hz, ³ $J = 3.2$ Hz, 1 H, 6-H), 3.86-3.48 (m, 3 H, 9-H₂, 10-H_a), 2.79 (dd, ³ $J = 10.9$ Hz, ² $J = 14.6$ Hz, 1 H, 10-H_b), 2.36 (m, 1 H, 7-H_a), 2.04 (m, 1 H, 7-H_b).

***cyclo*(Leu-Pro) (26):** C₁₁H₁₈N₂O₂. - $R_f = 0.65$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - DCI-MS (NH₃): $m/z = 262$ (11), 245 ([M+18+17]⁺, 100), 228 ([M+18]⁺, 37), ([M+H]⁺, 4). - ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 5.84$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 4-NH), 4.09 (m, 2 H, 3-H, 9-H_a), 3.59 (m, 2 H, 6-H, 7-H_b), 2.36, 2.05, 1.65 (3 m, 7 H, 8-H₂, 7-H₂, 10-H₂, 11-H), 1.01 (d, ³ $J = 6.6$ Hz, 3 H, 12-H₃), 0.96 (d, ³ $J = 6.6$ Hz, 3 H, 13-H₃).

***cyclo*(Phe-Pro) (27):** C₁₄H₁₆N₂O₂. - $R_f = 0.66$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - EI-MS (70 eV): m/z (%) = 244 (M⁺, 100), 215 (11), 157 (C₇H₇⁺, 17), 153 (34), 131 (12), 125 (98), 120 (17), 114 (9), 91 (75), 86 (9), 70 (63), 55 (9), 41 (21). - ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 7.31$ (m, 5 H, Ar-H), 5.67 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 4-NH), 4.28 (dd, ³ $J = 8.3$ Hz, ³ $J = 3.0$ Hz, 1 H, 3-H), 4.08 (m, 1 H, 6-H), 3.62 (m, 3 H, 9-H₂, 10-H_a), 2.78 (dd, ² $J = 14.1$ Hz, ³ $J = 8.3$ Hz, 1 H, 10-H_b), 2.36, 2.00 (2 m, 1+3 H, 8-H₂, 7-H₂).

***cyclo*(Pro-Trp) (28):** C₁₆H₁₇N₃O₂. - $R_f = 0.66$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - EI-MS (70 eV): m/z (%) = 283 (M⁺, 13), 154 (14), 130 (100), 70 (7). - ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 8.30$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 1'-NH), 7.59 (d, ³ $J = 7.5$ Hz, 1 H, 4'-H), 7.40 (d, ³ $J = 7.5$ Hz, 1 H,

7'-H), 7.24 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.14 (m, 2 H, 2'-H, 5'-H), 5.84 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 4-NH), 4.39 (d br, $^3J = 10.9$ Hz, 1 H, 3-H), 4.08 (m, 1 H, 6-H), 3.80-3.54 (m, 3 H, 9-H₂, 10-H_a), 2.96 (dd, $^3J = 10.9$ Hz, $^2J = 15$ Hz, 1 H, 10-H_b), 2.36, 2.00, 1.90 (3 m, 1+2+1 H, 8-H₂, 7-H₂). – ^{13}C /APT-NMR (CDCl₃, 125.7 MHz): $\delta = 169.4$ (5-C, C_q), 165.5 (2-C, C_q), 136.7 (7a'-C, C_q), 126.8 (3a'-C, C_q), 123.4 (2'-C, CH), 122.8 (5'-C, CH), 120.0 (6'-C, CH), 118.5 (7'-C, CH), 111.6 (4'-C, CH), 110.0 (3'-C, C_q), 59.2 (6-C, CH), 54.6 (3-C, CH), 45.4 (9-C, CH₂), 28.3 (8-C, CH₂), 26.9 (10-C, CH₂), 22.6 (7-C, CH₂). – HMQC-NMR (inverses CH-COSY, CDCl₃, INVBTP, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

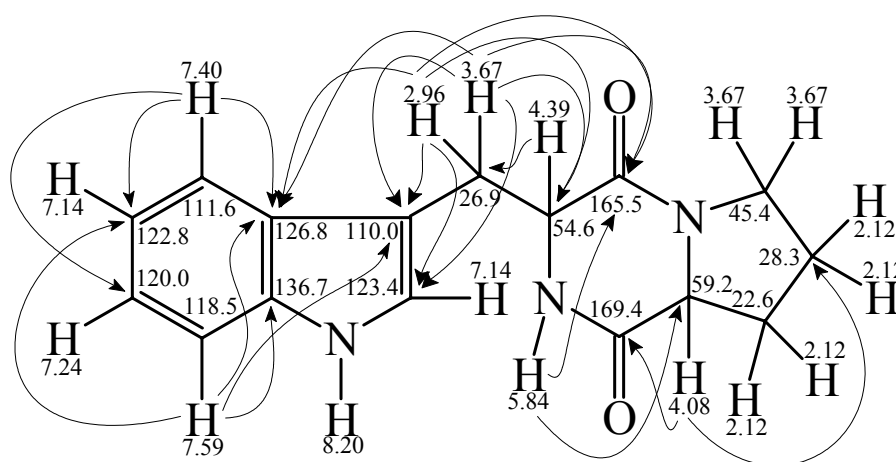


Abbildung 61: HMBC-NMR-Spektrum von *cyclo*(Pro-Trp) (**28**) (inverses COLOC, CDCl₃, INV4LPLRND, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C).

3-(Hydroxyacetyl)indol (29**):** C₁₀H₉NO₂. *R*_f = 0.61 (CHCl₃/MeOH 9:1). – DCI-MS (NH₃): *m/z* (%) = 193 ([M + NH₄]⁺, 100), 176 (M⁺, 75), 160 (11). – ^1H -NMR ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 11.18$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.31 (s, 1 H, 2-H), 8.27 (m, 1 H, 4-H), 7.54 (m, 1 H, 6-H), 7.24 (m, 2 H, 5-H, 7-H), 4.69 (d, $^3J = 5$ Hz, s nach H/D-Austausch, 2 H, 11-H₂), 3.84 (t, H/D-austauschbar, $^3J = 5.3$ Hz, 1 H, OH).

Der Extrakt RE 3 wurde in 50 ml MeOH aufgenommen und zweimal jeweils mit 30 ml C₆H₁₂ entfettet. Durch HPLC-Trennung (beginnen mit CH₃CN/H₂O-Azeotrop/H₂O = 10:90, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 40:60 in 15 min, dann Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100:0 in 10 min; Durchfluß: 10 ml/min, Detektion: 195 – 600 nm) erhielt man als weiße Feststoffe 2.3 mg *cyclo*(Pro-Val) (**31**, *t*_R = 17.8 min) und erneut 2.8 mg *cyclo*(Leu-Pro) (**26**, *t*_R = 18.6 min).

cyclo(Pro-Val) (31): C₁₀H₁₅N₂O₂. - $R_f = 0.66$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - DCI-MS (NH₃): m/z (%) = 393 ([2M+H]⁺, 28), 231 ([M + NH₃ + NH₄]⁺, 16), 214 ([M + NH₄]⁺, 100), 197 ([M+H]⁺, 34). - ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 5.69$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 4.09 (t, ³J = 7.6 Hz, 1 H, 6-H), 3.94 (s br, 1 H, 3-H), 3.70-3.50 (m, 2 H, 9-H₂), 2.65 (m, 1 H, 10-H), 2.38, 2.10-1.85 (2 m, 1+3 H, 8-H₂, 7-H₂), 1.07 (d, ³J = 7.1 Hz, 3 H, 11-H₃), 0.91 (d, ³J = 6.8 Hz, 3 H, 12-H₃).

Anzuchtversuche

Vom Stamm ANT V/2 369 wurden jeweils 1-l-Schüttelkulturen mit den Nährmedien A, N, O und SMG 28 d inkubiert. Das Lyophilisat der Kulturbrühen extrahierte man dreimal mit EtOAc und dampfte i. Vak. ein. Die Rohextrakte unterzog man dem Primärscreening.

Stamm ANT V/2 51

Der Stamm ANT V/2 51 wurde aus antarktischem Meereis isoliert. Bei Frau Dr. Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven wird er in Reinkultur gehalten. Die 16-S-RNA-Analyse ergab eine große Ähnlichkeit zu *Colwellia rossensis*. Der auf Agar gebildete Schleim war milchig-weiß.

Primärscreening

Aus der Kulturbrühe einer 1-l-Schüttelkultur erhielt man 116 mg farblosen Extrakt, der eine antibiotische Aktivität gegen *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 20 mm), *Bacillus subtilis* (Hemmhof-Ø: 16 mm) und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) (Hemmhof-Ø: 14 mm) zeigte. Außerdem hemmte der Extrakt das Wachstum von *Chlorella vulgaris* (Hemmhof-Ø: 11 mm). Im chemischen Screening waren keine interessanten Merkmale feststellbar.

Fermentation und Aufarbeitung

Mit je einem Liter einer 4-l-Schüttelkultur, die in Bremerhaven angefertigt wurde, beimpfte man vier 10-l-Steilbrustflaschen und inkubierte bei 4 °C, schwacher Luftzufuhr und manueller Antischaum-Zugabe im Nährmedium B. Zwei der Fermenter erntete man nach 12 d und die anderen zwei nach 28 d. Die zwei Fermenter mit der kürzeren Wachstumszeit – und getrennt davon ein Fermenter mit langer Inkubationszeit – behandelte man 5 min mit dem Ultraturax, filtrierte mit Celite[®] durch die Filterpresse und extrahierte dreimalig mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen dampfte man am Rotationsverdampfer i. Vak. bis zur Trockne ein.

Der verbliebene Fermenter wurde ebenfalls 5 min mit dem Ultraturax behandelt und durch die Filterpresse mit Celite[®] filtrierte. Danach extrahierte man an Harz (Amberlite[®] XAD-2, 400 g, 300-1000 µm) nach der Expanded-bed-Methode (3 × 100 cm, Durchfluß: 1 l/h) und

spülte abschließend mit 1 l H₂O und ebensoviel MeOH, das man getrennt auffing und i. Vak. eindampfte. Nach Vergleich der Rohextrakte im Dünnschichtchromatogramm vereinigte man alle und erhielt 808 mg eines rotbraunen Eindampfrückstandes.

Isolierung 1

Der Extrakt wurde in 50 ml MeOH und 50 ml C₆H₁₂ gelöst, und nach der Trennung beider Phasen extrahierte man die methanolische noch einmal mit 50 ml C₆H₁₂. Man erhielt durch Eindampfen 454 mg MeOH-Extrakt, der mittels HSCCC (CHCl₃:EtOAc:MeOH:H₂O 1:1:1:1, Säulenvolumen: 320 ml, 980 Upm, 2 h, leichte Phase = mobile Phase) aufgetrennt wurde.

Letztlich konnten nach weiteren chromatographischen Trennungen keine Substanzen in ausreichenden Mengen isoliert werden.

Nährmedienvariation

Am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven züchtete man den Stamm ANT V/2 51 in drei 2-l-Schüttelkulturen mit den Nährmedien A, N und O bei 4 °C und 75 Upm in 18 d an. Die Kulturbrühen wurden getrennt voneinander bei 3300 Upm für 30 min zentrifugiert und der Überstand wurde abgetrennt. Diesen extrahierte man dreimal mit EtOAc. Der Rückstand wurde mit 200 ml EtOAc versetzt und 10 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend filtrierte man über Celite[®] und digerierte dreimal mit EtOAc. Die org. Phasen der jeweiligen Anzucht wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer i. Vak. eingedampft.

Zusätzlich wurden 2-l-Nährlösungen aller drei verwendeten Medien frisch bereitete und im folgenden genauso wie die Überstände aufgearbeitet.

Von allen sechs Extrakten fertigte man Dünnschichtchromatogramme an und testete die Anzuchtextrakte auf algicide Wirkungen (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Algicide Aktivitäten der Nährmedienextrakte A, N, O von Stamm ANT V/2 51

Teststamm/ Nährmedium	Chlorella vulgaris	Chlorella sorokiniana	Scened. subspicatus
A	0	0	10
N	12	26	12
O	0	0	0

Anschließend wurden die Rohextrakte in 50 ml MeOH gelöst und zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ entfettet. Die Eindampfrückstände prüfte man auf antibiotische Aktivität (s. Tab. 1).

Tabelle 6: Antibiotische Aktivität der MeOH- und C₆H₁₂-Extrakte von Stamm ANT V/2 51

Extrakt/ Teststamm	Methanol-Extrakt ANT V/2 51			Cyclohexan-Extrakt ANT V/2 51		
	A	N	O	A	N	O
Nährmedium	A	N	O	A	N	O
<i>Escherichia coli</i>	19	15	16	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	14	13	14	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	0	0	0	0	0
<i>Mucor miehei</i>	0	0	0	13	0	11
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Str. viridochromogenes</i>	0	0	0	14	0	25

In einem weiteren Versuch zur Wachstumsoptimierung beimpfte man mit jeweils 1 l Schüttelkultur, die in Bremerhaven bei 4 °C und 75 Upm und 22 d in Nährmedium A hergestellt worden war, sechs 10-l-Steilbrustflaschen. Zwei der Fermentationsgefäße enthielten den normalen Anteil von 300 g Sojamehl, eines enthielt 30 g und dreien waren jeweils 60 g Sojamehl hinzugefügt worden. Die Fermentationen betrieb man bei 4 °C und schwacher Belüftung 14 d. Die verschiedenen Ansätze wurden getrennt voneinander durch Harzextraktion (XAD-7, 400 g) nach der Expanded-bed-Methode (Glassäule 3 × 100 cm, Durchfluß: 1 l/h) aufgearbeitet. Die Eindampfrückstände verglich man mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Extrakt der 2-l-Schüttelkultur.

In vier 5-l-Erlenmeyerkolben wurde eine 20-l-Schüttelkultur bei 4 °C und 75 Upm 6 Wochen lang inkubiert. Die Extraktion erfolgte an Harz (XAD-7, 400 g) in der oben beschriebenen Weise.

Isolierung 2

Der zuletzt gewonnene Extrakt wurde in 100 ml MeOH gelöst und zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ entfettet. Beide Fraktionen zeigten eine schwache Aktivität gegen *Mucor miehei* (MeOH: Hemmhof-Ø: 12 mm; C₆H₁₂: Hemmhof-Ø: 13 mm). Die 850 mg wiegende MeOH-Fraktion war außerdem noch gering aktiv gegen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* (beide Hemmhof-Ø: 12 mm) und wurde durch Mitteldruck-SC an Kieselgel (Säule 3 × 50 cm) mit einem stufenlosen Gradienten aus CHCl₃ und MeOH (Vorlagegefäß 1: 750 ml CHCl₃, Vorlagegefäß 2: 750 ml CHCl₃/MeOH 87:13) getrennt. Man erhielt vier Fraktionen (I-IV). Fraktion II trennte man durch präp. HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 40:60 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 70:30 in 20 min). Dadurch konnten 3.1 mg Genistein (**32**, t_R = 23.6 min) als weißer Feststoff gewonnen werden.

Genistein (32): C₁₅H₁₀O₅. – $R_f = 0.29$ (CHCl₃/MeOH 95:5). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 13.02$ (s, H/D-austauschbar, 1 H, 5-OH), 9.77 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, OH), 8.51 (s br, H/D-austauschbar,, 1 H, OH), 8.16 (s, 1 H, 2-H), 7.46, 6.90 (2 d, AA'BB', ³J = 9 Hz, 4 H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.42 (d, ⁴J = 2 Hz, 1 H, 8-H), 6.29 (d, ⁴J = 2 Hz, 1 H, 6-H).

Stamm ANT V/2 517

Der Stamm ANT V/2 517 wurde aus antarktischem Meereis isoliert und wird von Frau Dr. Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur gehalten. Auf Agar bilden sich orangefarbene Kolonien.

Primärscreening

Man extrahierte 1 l einer in Bremerhaven hergestellten Schüttelkultur des Stammes dreimal mit EtOAc und erhielt nach dem Eindampfen der org. Phasen 128 mg Extrakt.

Tabelle 7: Hemmtestaktivität des ANT V/2 517-Rohextraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	0
Bacillus subtilis	0
Staphylococcus aureus	12
Candida albicans	0
Mucor miehei	0
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	12
Chlorella vulgaris	14
Chlorella sorokiniana	15
Scenedesmus subspicatus	14

Cytotoxische Wirkung zeigte der Extrakt gegen Nematoden (Mortalitätsrate: 75 %, c = 7.5 µg/ml).

Im Dünnschichtchromatogramm war bei $R_f = 0.23$ (CHCl₃/MeOH 95:5) eine gelbe Zone erkennbar, deren Farbe sich beim Ansprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure oder Ehrlich's Reagenz vertiefte.

Fermentation und Aufarbeitung

Mit einer 4-l-Schüttelkultur beimpfte man vier 10-l-Steilbrustflaschen, die 21 d bei 4 °C und schwacher Belüftung inkubiert wurden. Drei der vier Kulturen behandelte man getrennt voneinander 5 min mit Ultraschall, filtrierte über Celite® und extrahierte dreimal mit EtOAc. Nach dem Eindampfen i. Vak. und einem Vergleich der Extrakte im Dünnschicht-

chromatogramm vereinigte man Extrakt I und II, so daß 523 mg Extrakt I/II und 311 mg Extrakt III erhalten wurden.

Die vierte Kulturbrühe behandelte man 5 min mit Ultraschall, filtrierte über Celite® und extrahierte an Harz (XAD-16, 300g, Säule 3 × 50 cm). Das Harz wurde dann nacheinander mit 500 ml H₂O und 500 ml gespült. Aus der getrennt aufgefangenen MeOH-Phase erhielt man nach Eindampfen i. Vak. 1.63 g Extrakt.

Isolierung

Extrakt IV löste man in 50 ml MeOH und entfettete zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂. Die mikrobiologischen Aktivitäten der verschiedenen Extrakte sind in Tab. 8 dargestellt.

Tabelle 8: Hemmtestaktivitäten der ANT V/2 517-Extrakte

Test-stamm/Fraktion	<i>M. miehei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. sorokiniana.</i>	<i>Scened. subspicatus</i>
Extrakt I/II	15	0	0	15	15	25
Extrakt III	11	0	0	11	12	18
IV-MeOH	11	0	0	0	11	16
IV-C ₆ H ₁₂	0	0	0	0	0	0

Bis auf IV-C₆H₁₂ wurden alle Extrakte vereinigt und durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, CHCl₃/MeOH 6:4) in sieben Fraktionen (I-VII) getrennt.

Durch Chromatographie an LiChroPrepDiol® (3 × 30cm, Stufengradient: CHCl₃/MeOH 98:2 200 ml, CHCl₃/MeOH 95:5 150 ml, CHCl₃/MeOH 9:1 150 ml, MeOH 300 ml) und Trennung der daraus resultierenden Fraktion IIIa durch präp. HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 5:95, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 25:75 in 5 min, halten für 15 min) wurden 6.2 mg *cyclo*(Leu-Pro) (**26**, t_R = 17.9 min) und 5 mg *cyclo*(Phe-Pro) (**27**, t_R = 23.0 min) als weiße Feststoffe gewonnen.

Anzuchtexperiment

Einen 2-l-Fermenter, dem 10 g Harz (XAD-16) zugegeben worden waren, beimpfte man mit einer 0.5 l Schüttelkultur des Stammes ANT V/2 517 und inkubierte für 10 d bei 4 °C und schwacher Belüftung. Dann trennte man das Harz mit einem Sieb (Lochgröße: 0.2 mm) ab und extrahierte es mit 100 ml MeOH. Die Kulturbrühe behandelte man 5 min mit Ultraschall, fügte 5 g Harz hinzu und rührte 30 min. Dann filtrierte man durch ein Sieb und extrahierte den Rückstand mit 100 ml MeOH. Die vereinigten org. Phasen wurden i. Vak. eingedampft. Der Extrakt wurde nach dünnschichtchromatographischer Analyse verworfen.

Stamm ANT V/2 253

Der Stamm wurde aus antarktischem Meereis isoliert und wurde aufgrund der 16S-rRNA-Analyse den α -Proteobakterien zugeordnet. Frau Dr. Helmke hält den Stamm am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur. Der Stamm bildete auf Agar einen milchig-weißen Schleim.

Primärscreening

Im chemischen Screening fiel eine mit Anisaldehyd/Schwefelsäure gelb anfärbare Zone bei $R_f = 0.24$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) und eine zweite bei $R_f = 0.47$ auf, die sich orange anfärben ließ.

Tabelle 9: Hemmtestaktivitäten des ANT V/253-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	13
Bacillus subtilis	0
Staphylococcus aureus	18
Candida albicans	0
Mucor miehei	0
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	14

Fermentation und Aufarbeitung

Mit jeweils 0.5 l der Vorkultur beimpfte man sechs mit jeweils 9.5 l Nährmedium B befüllte 10-l-Steilbrustflaschen und fermentierte bei 4 °C und schwacher Belüftung ohne Rühren. Den ersten Fermenter erntete man nach 26 d und versetzte das Filtrat mit 180 ml MeOH. Dann wurde 5 min mit dem Ultraturax behandelt und mit der Filterpresse über Celite® filtriert. 5 l der Kulturbrühe extrahierte man an XAD-16-Adsorberharz (Harzvolumen in MeOH: 200 ml) und die restlichen 5 l an XAD-7-Adsorberharz (Harzvolumen in MeOH: 200 ml) nach der Expanded-bed-Methode (Durchfluß: 1 l/h). Von den Harzen wurden die adsorbierten Stoffe mit jeweils 400 ml MeOH desorbiert und die erhaltenen Lösungen getrennt voneinander am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft.

Nach 35 d wurden der zweite und dritte Fermenter in gleicher Weise aufgearbeitet. Die Extraktion führte man jedoch ausschließlich an XAD-7-Adsorberharz (Harzvolumen in MeOH: 400 ml) durch. Im Anschluß wurden 800 ml MeOH über die Säule gegeben und danach eingedampft.

Genauso verfuhr man mit den drei letzten Fermentern. Fermenter 4 und 5 wurden nach 41 d und Fermenter 6 nach 45 d geerntet.

Isolierung

Die Extrakte wurden vereinigt, in 50 ml MeOH aufgenommen und zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ entfettet. Man dampfte die methanolische Phase ein, versetzte mit 300 ml H₂O und extrahierte dreimal mit je 100 ml EtOAc. Nach dem Eindampfen der vereinigten organischen Phasen erhielt man 610 mg Extrakt, den man einer Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) unterzog. Es wurden sieben Fraktionen erhalten: Fraktion I 21 mg; Fraktion II 245 mg; Fraktion III 28 mg; Fraktion IV 140 mg; Fraktion V 12 mg; Fraktion VI 4 mg; Fraktion VII 11 mg.

Tabelle 10: Aktivität der Fraktionen des Stammes ANT V/2 253

Teststamm/ Fraktion	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>M. miehei</i>	<i>C. albicans</i>
Fraktion I	16	14	17	0	0	0
Fraktion II	22	25	25	15	0	15
Fraktion III	0	0	11	0	0	0
Fraktion IV	0	0	0	0	0	0
Fraktion V	0	0	0	0	11	0
Fraktion VI	0	0	0	0	0	0
Fraktion VII	0	0	0	0	0	0

Mittels PDC (2 Platten 200 × 200 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) teilte man Fraktion II unter UV-Licht in 4 Fraktionen (IIa-IId). Nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) von IId erhielt man 5.8 mg N-(2-Phenylethyl)acetamid (**37**) als weißen Feststoff.

Aus Fraktion IV konnten nach PDC (2 Platten 200 × 200 mm, CHCl₃/MeOH 9:1) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 3.7 mg N^β-Acetyltryptamin (**34a**) gewonnen werden.

Aus Fraktion III wurden durch PDC (200 × 200 mm, CHCl₃/MeOH 9:1) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 0.5 mg N^β-Acetylkynuramin (**35a**) als weißer Feststoff isoliert.

N-(2-Phenylethyl)acetamid (37): C₁₀H₁₃NO. – $R_f = 0.50$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **DCI-MS** (NH₃): m/z (%) = 344 ([2M+NH₄]⁺, 13), 327 ([2M+H]⁺, 36), 181 ([M + NH₄]⁺, 100), 164 ([M+H]⁺, 26). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 200 MHz): $\delta = 7.33-7.14$ (m, 5 H, Ar-H), 3.40 (q, ³J = 6 Hz, 2 H, 2'-H₂), 2.78 (t, ³J = 6 Hz, 2 H, 1'-H₂), 1.85 (s, 3 H, 5-H₃).

N^β-Acetyltryptamin (34a): C₁₂H₁₄N₂O. – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 202 (M⁺, 30), 143 (100), 130 (84). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 200 MHz): $\delta = 10.18$ (s, H/D-austauschbar, 1 H, Indol-NH), 7.59 (d, ³J = 7.6 Hz, 1 H, 4-H), 7.38 (d, ³J = 7.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.14 (d, ³J =

4.7 Hz, 1 H, 2-H), 7.10-6.95 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 3.51 (dt, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 2 H, 2'-CH₂), 3.19 (s, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 2.94 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2 H, 1'-CH₂), 1.90 (s, 3 H, CH₃).

N^β-Acetylkynuramin (35a): C₁₁H₁₄N₂O₂. – $R_f = 0.78$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 206 (M⁺, 65), 188 (13), 146 (79), 120 (100), 92 (21). – **¹H-NMR** ([D₆]Benzol, 500 MHz): $\delta = 7.31$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 3-H), 6.97 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 4-H), 6.41 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 5-H), 6.14 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H), 5.94 (s br, H/D-austauschbar, 2 H, NH₂), 5.35 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 3.45 (dt, $^2J = 6.1$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2 H, 2'-H₂), 2.83 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2 H, 1'-H₂), 1.42 (s, 3 H, CH₃).

Stamm ANT V/2 381

Der antarktische Meereisstamm wird bei Dr. Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Auf Agar bildete er milchig weiße schleimige Kolonien.

Fermentation und Aufarbeitung

Weil der Stamm Aktivität gegen Hefen in Bremerhaven zeigte, wurde er dort im 20-l-Maßstab angezüchtet. In Göttingen versetzte man die Kulturbrühe mit 1 l MeOH, behandelte 10 min mit dem Ultraturrax und extrahierte mit Harz (Amberlite XAD-7, 400 g) nach der Expanded-bed-Methode (3 × 100 cm, Durchfluß: 1 l/h). Das Harz wurde mit 1 l Wasser und mit 1 l Methanol gespült. Die methanolische Phase engte man bei 40 °C i. Vak. ein und extrahierte dreimal mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen wurden erneut i. Vak. eingengt. Man erhielt 982 mg Rohextrakt, den man in 50 ml MeOH löste und zweimal mit C₆H₁₂ entfettete. Die antibiotischen Aktivitäten der Fraktionen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Aktivität der Fraktionen des Stammes ANT V/2 381

<i>Test-stamm/Fraktion</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	<i>Mucor miehei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
I	11	13	0	0	0	0
II	15	20	12	0	0	0
III	13	18	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0

VI	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0

Den methanolischen Extrakt chromatographierte man an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) und erhielt sieben Fraktionen. Nach der Analyse der Fraktionen durch HPLC/UV-VIS wurden diese nicht weiter bearbeitet.

Stamm ARK XIII/2 373

Der Stamm ARK XIII/2 373 wurde in arktischem Meereis gefunden. Er wird bei Frau Dr. Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Aufgrund der 16S-RNA-Analyse kann der Stamm den Actinomyce-ten/Micrococcinae zugeordnet werden. Man findet eine 98prozentige Übereinstimmung der 16S-rRNA mit *Brachybacteria tyrofermentata*. ARK XIII/2 373 bildet auf Agar einen milchig-weißen Schleim.

Primärscreening

Im chemischen Screening fielen zwei mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-detektierbare Zonen auf: die eine bei $R_f = 0.45$ (CHCl₃/MeOH 9:1) ließ sich schwach-violett und die andere bei $R_f = 0.95$ schwarz-violett anfärben.

Tabelle 12: Hemmtestaktivitäten des ARK XIII/2 373-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	19
Bacillus subtilis	20
Staphylococcus aureus	12
Candida albicans	15
Mucor miehei	26
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	0
Chlorella vulgaris	22
Chlorella sorokiniana	19
Scenedesmus subspicatus	23

Fermentation und Aufarbeitung

Für beide Fermentationen beimpfte man in Bremerhaven vier mit jeweils 4.25 l des Nährmediums B befüllte 5-l-Steilbrustflaschen durch Zugabe von 0.75 l einer in SWNL-Nährmedium angezogenen Vorkultur. Die Fermentationen führte man auf einem Schüttler bei 4 °C und 70 Upm durch. Die erste Fermentation dauerte 21 d und die zweite 28 d. Nach Abschluß der Anzuchten wurden die 20-l-Kulturen mit je 500 ml EtOAc überschichtet und zur Aufarbeitung nach Göttingen verschickt. Hier fügte man 2 l MeOH hinzu, behandelte 10 min mit Ultraschall und extrahierte an Harz (Amberlite® XAD-7, 400 g) nach der Expanded-bed-Methode (3 × 100 cm, Durchfluß: 1l/h). Anschließend spülte man das Harz nacheinander mit 1 l Wasser und 1 l MeOH. Die getrennt aufgefangene methanolische Fraktion dampfte man am Rotationsverdampfer i. Vak. bis zur Trockne ein.

Isolierung

Beide Rohextrakte löste man in 50 ml MeOH, entfettete zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ und erhielt durch Vereinigen der MeOH-Fractionen 832 mg Extrakt. Die Aktivitäten der Extrakte gegen Testkeime sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13: Aktivität der Extrakte des Stammes ARK XIII/2 373

Teststamm/ Fraktion	<i>E. coli</i>	<i>B. subt.</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>M. miehei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Methanol- Extrakt 1	20	0	19	20	0	0
Cyclohexan- Extrakt 1	0	0	12	18	0	0
Rohextrakt 2	14	15	11	14	13	11

Die MeOH-Fraktion trennte man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) in neun Fraktionen (I-IX), die anschließend durch analyt. HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10:90 für 5 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100:0 in 30 min, halten für 5 min, Durchfluß: 1 ml/min, Diodenarray 195 – 600 nm) auf ihre Inhaltsstoffe überprüft wurden. Ihre UV-Spektren und Retentionszeiten wurden mit der Datenbank verglichen.

Aus Fraktion III erhielt man nach PDC (20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1), Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) und präp. HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10:90, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 30:70 in 20 min, Durchfluß: 10 ml/min) 0.6 mg N-Acetyl-β-oxo-tryptamin (**38**) als weißen Feststoff.

N-Acetyl-β-oxotryptamin (38): C₁₂H₁₂N₂O₂. – $R_f = 0.45$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 216 (M⁺, 23), 144 (C₁₀H₁₀N⁺, 100). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 500 MHz): $\delta = 11.24$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.36 (d, ³J = 3.2 Hz, 1 H, 2-H), 8.28 (d, ³J = 8.5 Hz, 1 H, 4-H), 7.53 (d, ³J = 8.5 Hz, 1 H, 7-H), 7.28 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 7.23 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 4.56 (d, ³J = 5.0 Hz, 2 H, CH₂), 1.99 (s, 3 H, CH₃).

Stamm ARK XIII/2 437

Der aus arktischem Meereis isolierte Stamm wird bei Frau Dr. Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven als Reinkultur aufbewahrt. Auf Agar bildete er einen weißen milchigen Schleim.

Primärscreening

Im Dünnschichtchromatogramm waren zwei Zonen bei $R_f = 0.45$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) und bei $R_f = 0.95$ zu sehen, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz schwarz-violett und violett anfärbten.

Tabelle 14: Hemmtestergebnisse des ARK XIII/2 437- Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	19
Bacillus subtilis	20
Staphylococcus aureus	15
Candida albicans	26
Mucor miehei	12
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	0
Chlorella vulgaris	22
Chlorella sorokiniana	19
Scenedesmus subspicatus	23

Fermentation und Aufarbeitung

Man versetzte die in Bremerhaven hergestellte 20-l-Kulturbrühe mit 2 l Methanol und behandelte 10 min mit Ultraschall. Dann ließ man 5 h stehen und extrahierte an Harz (Amberlite® XAD-7, 400 g) nach der Expanded-bed-Methode (3×100 cm, Durchfluß: 1l/h). Anschließend wurde das Harz nacheinander mit 1 l Wasser und 1 l Methanol gespült, wobei man die mit Methanol angereicherte Fraktion gesondert auffing und am Rotationsverdampfer einengte. Der Eindampfrückstand wurde dreimal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen engte man ein und erhielt 1.28 g Rohextrakt.

Isolierung

Durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3×50 cm, Methanol) teilte man den Extrakt nach DC-Kontrolle ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, Sprühreagenz Anisaldehyd/Schwefelsäure) in vier Fraktionen. Fraktion I: 837 mg; Fraktion II: 65 mg; Fraktion III: 40 mg; Fraktion IV: 233 mg.

Tabelle 15: Aktivitäten der Fraktionen von Stamm ARK XIII/2 437

Teststamm/ Fraktion	<i>S. aureus</i>	<i>M. miehei</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>E. coli</i>
Fraktion I	20	16	25	20
Fraktion II	0	0	0	13
Fraktion III	0	0	0	15
Fraktion IV	0	0	0	15

Fraktion II enthielt eine mit Anisaldehyd/Schwefelsäure rötlich anfärbbare Substanz. Man chromatographierte an einer präparativen Dickschichtplatte (20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) und erhielt drei Fraktionen (IIa-c). Fraktion IIb ergab nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 40 cm, Methanol) 7.3 mg 4-Hydroxybenzaldehyd (**40a**).

Fraktion IV wurde durch HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 18:82 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 40:60 in 20 min, Durchfluß: 10 ml/min) in vier Fraktionen (IVa-d) getrennt. Fraktion IVa enthielt 5.3 mg 4-Hydroxybenzoesäure (**40b**). Fraktion IVb trennte man durch PDC (1 Platte 10 × 10 cm (Merck), CHCl₃/MeOH 9:1) und anschließende Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 40 cm, Methanol) in zwei Substanzen (N4211-2). N4211 enthielt 0.41 mg 4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (**39**) als weißen Feststoff.

4-Hydroxybenzaldehyd (40a): C₇H₆O₂. – $R_f = 0.55$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 122 (M⁺, 94), 121 (100), 93 (25), 65 (22). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton, 200 MHz): $\delta = 9.86$ (s, 1 H, 7-H), 7.80 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, 2-H, 6-H), 7.01 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, 3-H, 5-H).

4-Hydroxybenzoesäure (40b): C₇H₆O₃. – $R_f = 0.36$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 138 (M⁺, 84), 121 (100), 93 (20), 69 (15), 46 (11), 45 (17). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton, 200 MHz): $\delta = 7.91$ (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, 2-H, 6-H), 6.92 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, 3-H, 5-H).

4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (39): C₁₃H₁₃NO₃. – $R_f = 0.35$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 231 (M⁺, 13), 145 (11), 144 (C₁₀H₁₀N⁺, 100), 116 (17), 89 (14), 43 (7). – ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 11.2$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.41 (s, 1 H, 2-H), 8.35 (d, ³J = 8.0 Hz, 1 H, 4-H), 7.56 (d, ³J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.23 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 5.21 (dd, ³J = 3.8 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 10-H), 4.44 (d br, H/D-austauschbar, ³J = 2 Hz, 1 H, 10-OH), 3.01 (dd, ²J = 15.9 Hz, ³J = 3.8 Hz, 1 H, 9-H_a), 2.80 (dd, ²J = 15.9 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 9-H_b), 2.20 (s, 3 H, 12-H₃). – ¹³C/APT-NMR ([D₆]Aceton, 125.7 MHz):

$\delta = 206.1$ (11-C, C_q)¹⁰⁴, 195.9 (8-C, C_q), 137.6 (7a-C, C_q), 134.7 (2-C, CH), 127.2 (3a-C, C_q), 124.1 (5-C, CH), 123.0 (6-C, CH), 122.7 (4-C, CH), 114.2 (3-C, CH), 112.9 (7-C, CH), 71.8 (10-C, CH), 50.1 (9-C, CH₂), 30.7 (12-C, CH₃). – HMQC-NMR (inverses CH-COSY, [D₆]Aceton, INVBTP, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

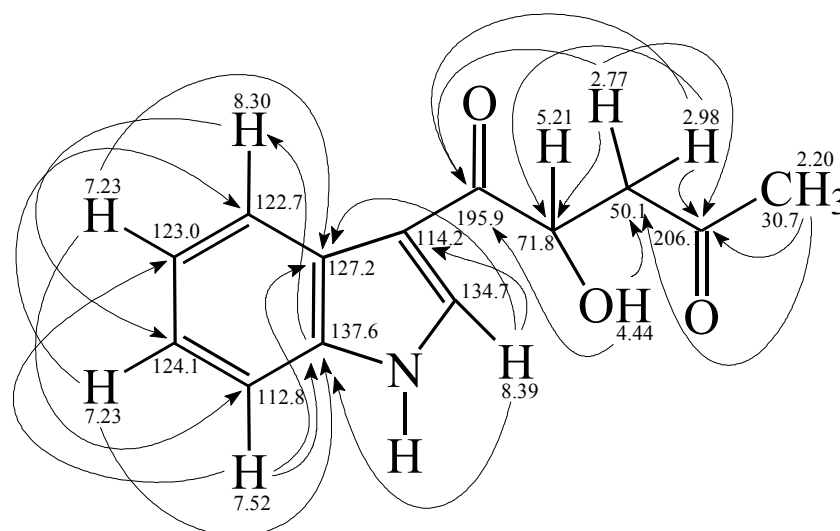


Abbildung 63 : HMBC-NMR-Spektrum von 4-Hydroxy-5-(indol-3-yl)-5-oxo-pentan-2-on (**39**) (inverses COLOC, [D₆]Aceton, INV4LPLRND, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C).

Stamm ARK XIII/2 442

Der aus arktischem Meereis isolierte Stamm wird bei Frau Dr.Helmke am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Laut 16S-rRNA-Analyse ist der Organismus den γ -Proteobakterien zuzuordnen und weist eine hohe Ähnlichkeit zu *Shewanella frigidimarina* auf. Auf Agar bildet der Stamm einen beigen Schleim.

Primärscreening

In Bremerhavener Hemmtests zeigte der Stamm eine hohe Aktivität gegen Hefen.

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm wurde in Bremerhaven im 20-l-Maßstab als Schüttelkultur angezüchtet. Dazu beimpfte man mit jeweils 0.75 l einer Schüttelkultur in SWNL-Medium vier 5-l-Steilbrustflaschen, die mit je 4.25 l Nährmedium B gefüllt waren. Nach vier Wochen wurde die Fermentation beendet und der Kulturbrühe 500 ml EtOAc zugefügt, der sich fast vollständig löste. Für die Aufarbeitung in Göttingen homogenisierte man die Kulturbrühe 5 min mit dem Ultraturrax und filtrierte mit der Filterpresse. Anschließend adsorbierte man an Harz (Amberlite® XAD-7, 400 g) nach der Expanded-bed-Methode (3 × 100 cm, Durchfluß: 1l/h). Nacheinander spülte man das Harz mit 1 l Wasser und 800 ml MeOH. Die getrennt aufgefangene methanolische Fraktion wurde i. Vak. bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten org. Phasen ergaben nach dem Einengen 383 mg Rohextrakt.

Isolierung

Den nicht entfetteten Extrakt trennte man durch präparative HPLC (mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10:90 für 7 min beginnen, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 60:40 in 28 min, Durchfluß: 10.0 ml/min, Detektion: 195 – 600 nm) in sieben Fraktionen. Fraktion I enthielt 4.5 mg *cyclo*(Pro-Tyr) (**42**) ($t_R = 15.9$ min) als farbloses Öl. Fraktion II ($t_R = 20.6$ min) wurde durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) weiter aufgereinigt, wobei man 5.3 mg 4-Hydroxybenzaldehyd (**40a**) als weißen Feststoff erhielt. Durch PDC (1 · 10 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 93:7) erhielt man aus Fraktion IV ($t_R = 24.6$ min) 3.1 mg *cyclo*(Phe-Pro) (**27**) als schwach gelblichen Feststoff. Fraktion V ($t_R = 27.2$ min) enthielt 1.5 mg 3-Indolcarbaldehyd (**43**) als gelblichen Feststoff. Als Fraktion VI konnten 2.8 mg eines weißen Feststoffes isoliert werden, den man als Daidzein (**44**) identifizierte. Fraktion VII beinhaltete 2.1 mg Genistein (**32**) als weißen Feststoff.

***cyclo*(Pro-Tyr) (42):** C₁₄H₁₆N₂O₃. – $R_f = 0.58$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 803 ([3M+Na]⁺, 44), 543 ([2M+Na]⁺, 100), 283 ([M+Na]⁺, 26). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 7.14, 6.76$ (2 d, AA'BB', ³J = 8 Hz, 4 H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.54 (s br, 1 H, NH), 4.32 (t, ³J = 5 Hz, 1 H, 3-H), 4.08 (t, ³J = 6 Hz, 1 H, 6-H), 3.52, 3.38 (2 m, 2 H, 9-H₂), 3.22 (dd, ²J = 14 Hz, ³J = 5 Hz, 1 H, 10-H_a), 2.88 (dd, ²J = 14 Hz, ³J = 6 Hz, 1 H, 10-H_b), 2.10, 1.84, 1.68 (3 m, 1+2+1 H, 8-H₂, 7-H₂).

3-Indolcarbaldehyd (43): C_9H_7NO . – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 145 (M^+ , 84), 144 (100), 130 (20), 116 (23), 89 (21). – **1H -NMR** ($[D_6]$ Aceton, 500 MHz): δ = 11.19 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 10.01 (s, 1 H, CHO), 8.22 (d, 3J = 8 Hz, 1 H, 4-H), 8.17 (d, 3J = 3 Hz, 1 H, 2-H), 7.54 (d, 3J = 8 Hz, 1 H, 7-H), 7.23 (m, 2 H, 5-H, 6-H).

Daidzein (44): $C_{15}H_{10}O_4$. – R_f = 0.36 ($CHCl_3/MeOH$ 9:1). **(+)-ESI-MS**: m/z (%) = 531 ($[2M+Na]^+$, 82), 255 ($[M+H]^+$, 100). **UV/Vis** ($MeCN-H_2O$ -Azeotrop/65 % H_2O): λ_{max} = 211 nm, 251, 299.

Stamm HEL 45

Der Stamm HEL 45 wird von Wagner-Doebler bei der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig in Reinkultur aufbewahrt. Er wurde aus einer Freiwasserprobe an der Küste von Helgoland isoliert und gehört nach der 16S-rRNA-Genclusteranalyse zur Gattung *Sulfitobacter*.^[105]

Fermentation und Aufarbeitung I

Der Stamm wurde in einer 40-l-Fermentation 44 h bei 30 °C, einer Rührgeschwindigkeit von 250 Upm und 0.25 v/vm in LB-Medium und künstlichem Seewasser inkubiert. Mycel und Überstand wurden filtriert und der Überstand mit EtOAc extrahiert. Das Mycel überschichtete man mit einem EtOAc/Aceton-Gemisch (8:2), rührte 24 h und extrahierte dreimal mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen des Mycels und des Überstandes wurden getrennt i. Vak. eingedampft. Man erhielt 0.8 g Mycel- und 2.1 g Überstand-Extrakt.

Isolierung I

Der Überstand-Rohextrakt der ersten Fermentation wurde in 50 ml MeOH und ebensoviel C_6H_{12} gelöst und über eine Glasfritte (G3) filtriert. Dann trennte man die Phasen und extrahierte die methanolische Phase noch einmal mit 25 ml C_6H_{12} . Nach dem Eindampfen erhielt man 1.85 g MeOH- und 297 mg C_6H_{12} -Extrakt.

Im chemischen Screening wurde im MeOH-Extrakt eine UV-löschende Zone bei $R = 0.95$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1) detektiert, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure orange und mit Ehrlich's Reagenz blau anfärbbar war. Bei $R_f = 0.28$ verfärbte sich eine Zone mit Anisaldehyd/Schwefelsäure über grau zu braun und mit Ehrlich's Reagenz ergab sich eine hellviolette Färbung. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Tests sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Aktivität der MeOH- und C₆H₁₂-Fraktion des Stammes HEL 45

Test-stamm/Fraktion	<i>E. coli</i>	<i>B. subt.</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>M. miehei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
MeOH-Extrakt	20	15	0	0	15	0
C ₆ H ₁₂ -Extrakt	15	-	0	31	-	0

Nach Chromatographie des MeOH-Extraktes an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) erhielt man neun Fraktionen, von denen nur die vierte eine Aktivität gegen *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 20 mm) und *Bacillus subtilis* (Hemmhof-Ø: 15 mm) zeigte. Durch PDC (2 · 40 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) ließ sich Fraktion IV in drei weitere Fraktionen (IVa-c) teilen. Aus der gegen *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 20 mm) wirksamen Fraktion IVb wurden nach HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 15:85 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 20:80 in 15 min, Durchfluß: 10 ml/min) 4.3 mg *cyclo*(Pro-Tyr) (**42**, t_R = 12.1 – 13.7 min) als weißer Feststoff isoliert.

Fraktion IVc ergab nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) und HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 20:80, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 30:70 in 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 40:60 in 15 min) 1.7 mg *cyclo*(Phe-Pro) (**27**, t_R = 22.1 – 24.5 min) als weißen Feststoff.

Aus Fraktion V konnten nach PDC (1 Platte 20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 95:5) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 13.7 mg Indol (**45**) gewonnen werden.

Durch PDC (1 Platte 20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 90:10) und anschließende Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) wurden aus Fraktion VII 9.7 mg 3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**) als gelbliches Öl isoliert.

Der Extrakt aus dem Zellmaterial zeigte im Dünnschichtchromatogramm keine neuen interessanten Zonen.

***cyclo*(Pro-Tyr) (42):** C₁₄H₁₆N₂O₃. - R_f = 0.82 (CHCl₃/MeOH 9:1). - **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 260 (M⁺, 21), 154 (100), 107 (41), 70 (14). - **¹H-NMR** ([D₆]DMSO, 200 MHz): δ = 9.10 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, OH), 7.74 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 7.05 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 6.64 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H), 4.23 (t, ³J = 5.1 Hz, 1 H, 3-H), 4.05 (dd, ³J = 6.9 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1 H, 6-H), 3.50-3.18 (m, 2 H, 9-H₂), 2.93 (dd, ²J = 14.2 Hz,

$^3J = 5.1$ Hz, 1 H, 10-H_b), 2.00, 1.72, 1.45 (3 m, 1+2+1 H, 7-H₂, 8-H₂). – $^{13}\text{C/APT-NMR}$ ([D₆]Aceton, 75.5 MHz): $\delta = 168.8$ (5-C, C_q), 165.0 (2-C, C_q), 155.8 (1'-C, C_q), 130.7 (2'-C, 6'-C, 2 CH), 126.9 (4'-C, C_q), 114.6 (3'-C, 5'-C, 2 CH), 58.3 (3-C, CH), 55.9 (6-C, CH), 44.4 (9-C, CH₂), 34.6 (10-C, CH₂), 27.7 (8-C, CH₂), 21.8 (7-C, CH₂).

Indol (45): C₈H₇N. – $R_f = 0.96$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 117 (M⁺, 100), 90 (–HCN, 37), 63 (15), 59 (12). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 8.12$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 7.65 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 0.9$ Hz, 1 H, 4-H), 7.39 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 0.9$ Hz, 1 H, 7-H), 7.24–7.06 (m, 3 H, 2-H, 5-H, 6-H), 6.56 (m, 1 H, 3-H).

3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (46): C₁₉H₁₈N₂O₂. – gelbliches Öl, $R_f = 0.43$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – $[\alpha]_D^{20} = 38^\circ$ (c = 0.036 in MeOH). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 306 (M⁺, 11), 245 (100). – $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]Aceton, 200 MHz): $\delta = 10.01$ (2s br, H/D-austauschbar, 2 H, 1'-NH, 1''-NH), 7.64 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 4'-H, 4''-H), 7.43 (d, $^3J = 2.2$ Hz, 1 H, 2'-H), 7.34 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, 7' H, 7''-H), 7.29 (d, $^3J = 2.2$ Hz, 1 H, 2''-H), 7.08–6.86 (m, 4 H, 5'-H, 6'-H, 5''-H, 6''-H), 4.79 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, 3-H), 4.49 (m, 1 H, 2-H), 3.56 (m, 4 H, davon 2 H/D-austauschbar, 1-H₂, 1-OH, 2-OH). – $^{13}\text{C/APT-NMR}$ ([D₆]Aceton, 75.5 MHz): $\delta = 137.6$ (9'-C, C_q), 137.4 (9''-C, C_q), 129.1 (8'-C, C_q), 128.2 (8''-C, C_q), 124.2 (2'-C, CH), 123.8 (2''-C, CH), 121.8 (6'-C, CH), 121.6 (6''-C, CH), 120.1 (7'-C, CH), 119.9 (7''-C, CH), 119.13 (5'-C, CH), 119.07 (5''-C, CH), 118.3 (3'-C, C_q), 116.4 (3''-C, C_q), 112.0 (4'-C, CH), 111.9 (4''-C, CH), 75.7 (2-C, CH), 66.0 (1-C, CH₂), 37.4 (3-C, CH). – **HMQC-NMR** (inverses CH-COSY, [D₆]Aceton, INVBTP, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

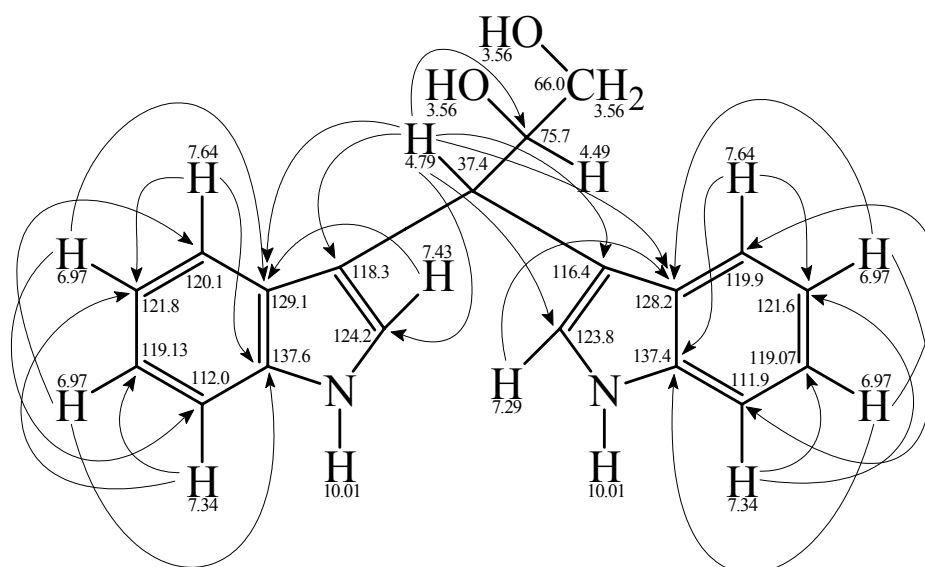


Abbildung 64: HMBC-NMR-Spektrum von 3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**) (inverses COLOC, $[D_6]$ Aceton, INV4LPLRND, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) ($H \rightarrow C$).

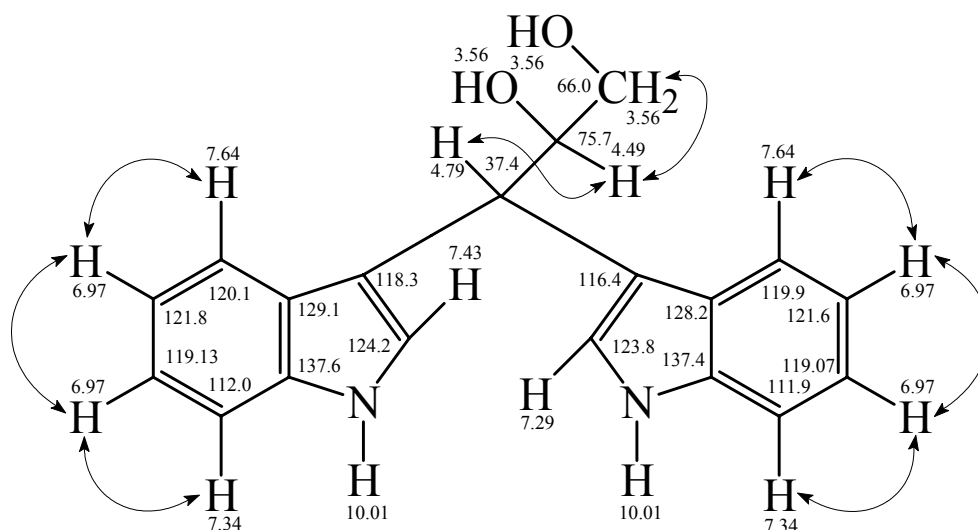


Abbildung 65: H,H -COSY-NMR-Spektrum von (R)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**) ($[D_6]$ Aceton, 500 MHz) ($H \rightarrow H$).

Synthese von (R)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (46**)**

Man löste 382 mg Indol (3.27 mmol) in 10 ml 95proz. Ethanol und fügte es unter Rühren zu einer Lösung von 118.4 mg D-(+)-Glyceraldehyd (1.63 mmol), 3 ml 0.1 N HCl und 7 ml 95proz. Ethanol tropfenweise in 3 min hinzu. Man ließ 1.5 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemp. stehen und stellte mit 2proz. ammoniakalischem Ethanol den pH-Wert auf 8 – 9 ein. Nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) erhielt man 114 mg (23 %) (R)-3-(3,3-Diindolyl)propan-1,2-diol (**46**) als gelbliches Öl, das den gleichen R_f -Wert wie der Naturstoff aufwies.

Fermentation und Aufarbeitung II

In der Arbeitsgruppe Lang führte man Nährmedienvariationen in 100-ml-Schüttelkulturen durch. Dabei verwendete man Minimalmedien, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen Cerelose, Sucrose, $NaNO_3$, NH_4Cl , Vitamin- und Aminosäurelösung enthielten. Außerdem testete man Nährmedien mit unterschiedlichen Anteilen an Trypton, Bacto Pepton, Hefeextrakt und L-Tryptophan. Schließlich inkubierte man den Stamm im 40-l-Maßstab mit 2 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 0.8 g/l L-Tryptophan in künstlichem Seewasser über 46 h. Die

Fermentation erfolgte bei 27 °C, einer Begasung von 0.25 v/vm und einer Rührgeschwindigkeit von 200 Upm. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Isolierung II

Der Rohextrakt wurde in 50 ml MeOH gelöst und zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ extrahiert, wobei man als Eindampfrückstand 920 mg aus der MeOH- und 210 mg aus der C₆H₁₂-Phase erhielt.

Die MeOH-Fraktion teilte man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) in 17 Fraktionen. Gegen die Alge *Chlorella sorokiniana* waren die Fraktionen I (Hemmhof-Ø: 15 mm) und VIII (Hemmhof-Ø: 10 mm) aktiv. Fraktion VIII wirkte außerdem gegen *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 15 mm).

Fraktion I enthielt 20 mg Polypropylenglykol aus dem Fermenter-Antischaummittel als farbloses Öl.

Durch PDC von Fraktion III wurde *cyclo*(Leu-Pro) (**26**) 5.8 mg als weißer Feststoff isoliert.

Von der in CHCl₃/MeOH 9:1 gelösten Fraktion VI filtrierte man unlösliche Komponenten ab und trennte durch PDC (20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) in zwei Fraktionen, wovon die erste nach Reinigung an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 1.3 mg 3-Indolcarbaldehyd (**43**) als weißen Feststoff lieferte.

Man löste Fraktion VIII in CHCl₃/MeOH 9:1 und filtrierte unlösliche Bestandteile ab, bevor man das Filtrat durch PDC (2 · 20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) in zwei Fraktionen trennte. Nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) von Fraktion VIIIb erhielt man 6.8 mg Tryptanthrin (**47**) als zitronengelben Feststoff.

Mit einem kleinen Teil der Fraktion IX wurde eine PDC (8 × 4 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) durchgeführt und die Hauptkomponente der Fraktion bei *R* = 0.45 abgetrennt. Diese identifizierte man mittels EI-MS als 3-Indolcarbonsäure (**54**).

Fraktion X trennte man durch Präparative Dickschichtchromatographie (1 · 20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 98:2) in zwei Fraktionen. Die erste enthielt 3.2 mg Indol-3-carbonsäurethiomethylester (**48**) als weißen Feststoff.

Tryptanthrin (47): C₁₅H₈N₂O₂. – *R*_f = 0.95 (CHCl₃/MeOH 9:1). – DCI-MS (NH₃): *m/z* (%) = 283 ([M + NH₃ + NH₄]⁺, 71), 266 ([M + NH₄]⁺, 100), 249 ([M+H]⁺, 60). – ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 8.60 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1 H, 11-H), 8.41 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1 H, 5-H), 8.01

(d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, 2-H), 7.94 – 7.71 (m, 3 H, 8-H, 4-H, 3-H), 7.61 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 10-H), 7.40 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 9-H).

Indol-3-carbonsäurethiomethylester (48): C₁₀H₉NOS. – $R_f = 0.88$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3245$ cm⁻¹, 2362, 1684, 1614, 1515, 1436, 1359, 1312, 1239, 1127, 1091, 882, 848, 750, 663, 574, 421. – **DCI-MS** (NH₃): m/z (%) = 400 ([2M+NH₄]⁺, 18), 226 ([M + NH₃ + NH₄]⁺, 34), 209 ([M + NH₄]⁺, 100), 192 ([M+H]⁺, 10). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 11.23$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.17, 8,16 (dd + s, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 2 H, 2-H, 4-H), 7.50 (dd, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1 H, 7-H), 7.22 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 2.41 (s, 3 H, SCH₃). – **¹³C/APT-NMR** ([D₆]Aceton, 75.5 MHz): $\delta = 185.0$ (10-C, C_q), 137.7 (9-C, C_q), 132.0 (2-C, CH), 131.8 (8-C, C_q), 125.7 (3-C, C_q), 123.9 (5-C, CH), 122.8 (6-C, CH), 121.9 (7-C, CH), 113.0 (4-C, CH), 10.5 (SCH₃, CH₃).

C₁₀H₉NOS Ber.: 191.0405 Gef.: 191.0406

Stamm B 4481

Der Stamm B 4481 ist ein mariner Streptomyces, der in der Sammlung mariner Actinomyceten des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt wird. Der Mikroorganismus bildet auf Agar ein leicht schleimiges weißes Mycel.

Primärscreening

Drei Agarplatten wurden mit einer M₂⁺/50 % Seewasser-Schrägagarkultur des Stammes beimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen beimpfte man fünf mit je 200 ml des gleichen Nährmediums gefüllte Schikanekolben und züchtete 72 h bei 28 °C mit 95 Upm an. Nach der Extraktion mit EtOAc erhielt man 80 mg eines blaßgelben Eindampfrückstandes, der bei der Firma Oncotest (Freiburg i. Br.) eine deutliche Wirkung gegen humane Tumor Xenografts im Kolonieassay bei einer Konzentration von 1.0 µg/ml zeigte.

Tabelle 18: Hemmtestaktivitäten des B 4481-Rohextraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	30
Bacillus subtilis	35
Staphylococcus aureus	21
Candida albicans	40

Mucor miehei	20
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	26
Chlorella vulgaris	20
Chlorella sorokiniana	26
Scenedesmus subspicatus	0

Fermentation und Aufarbeitung

Mit 2 l einer 84 h bei 28 °C und 95 Upm inkubierten Schüttelkultur (10 Schikanekolben á 200 ml) beimpfte man einen 20-l-Fermenter. Die Anzucht erfolgte in M_2^+ /50 % Seewasser bei 28 °C, einem Belüftungsvordruck von 0.5 atm, 200 Upm innerhalb von 99 h. Man behandelte die Kulturbrühe 5 min mit dem Ultraturrax und trennte über Celite[®] mit der Filterpresse das Mycel vom Überstand. Letzteren extrahierte man fünfmal mit EtOAc. Das Mycel versetzte man mit EtOAc, filtrierte erneut über Celite[®] und digerierte dreimal mit EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen ergaben nach dem Eindampfen i. Vak. 670 mg Rohextrakt.

In einer zweiten Anzucht wurde auf gleiche Weise eine Schüttelkultur 96 h inkubiert, wovon 2 l als Impfmateriale für eine 69 h andauernde 20-l-Fermentation unter den oben genannten Bedingungen dienten. Nach der Aufarbeitung mit EtOAc erhielt man 1.58 g Rohextrakt.

Isolierung

Die vereinigten Rohextrakte wurden in 50 ml MeOH gelöst und zweimal mit je 50 ml C₆H₁₂ entfettet. Den in 10 ml gelösten methanolischen Extrakt (1.62 g) testete man gegen *Staphylococcus aureus* (Hemmhof-Ø: 15 mm), *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 21 mm) und *Bacillus subtilis* (Hemmhof-Ø: 17 mm), wohingegen das Wachstum von *Mucor miehei* nicht beeinträchtigt wurde.

Man trennte 1.3 g des MeOH-Extraktes durch HSCCC (C₆H₁₂:EtOAc:MeOH:H₂O 3:2:2:3, Säulenvolumen: 320 ml, Probenschleife: 10 ml, Laufzeit: 3 h bei 915 Upm) in vier Fraktionen. Das aufzutrennende Material löste man zuvor, indem man 4 ml jeder Phase des verwendeten Gemisches zugab.

Aus Fraktion I wurden durch HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 40:60 für 5 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 50:50 in 20 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 60:40 in 10 min) 7.1 mg Germicidin (**49**, $t_R = 30.1 - 35.5$ min) als weißer Feststoff erhalten.

Germicidin (49): C₁₁H₁₆O₃. - $R_f = 0.13$ (CHCl₃/MeOH 9:1). - **DCI-MS** (NH₃): m/z (%) = 231 ([M + NH₃ + NH₄]⁺, 10), 214 ([M + NH₄]⁺, 100), 197 ([M+H]⁺, 15). - **¹H-NMR** (CDCl₃, 200 MHz): $\delta = 5.98$ (s, 1 H, 4-H), 2.48 (m, 3 H, 6-H₂, 8-H), 1.76-1.42 (m, 2 H, 10-H₂), 1.18 (d, ³J = 6.8 Hz, 3 H, 9-H₃), 1.11 (t, ³J = 7.3 Hz, 3 H, 7-H₃), 0.87 (t, ³J = 7.3 Hz, 3 H, 11-H₃). -

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 200 MHz): $\delta = 5.98$ (s, 1 H, 4-H), 2.42 (m, 3 H, 6-H₂, 8-H), 1.76-1.45 (m, 2 H, 10-H₂), 1.20 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 3 H, 9-H₃), 1.03 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3 H, 7-H₃), 0.89 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 3 H, 11-H₃). – $^{13}\text{C/APT-NMR}$ (CDCl_3 , 125.7 MHz): $\delta = 168.3$ (C-1, C_q), 167.8 (C-3, C_q), 166.9 (C-5, C_q), 104.4 (C-2, C_q), 100.3 (C-4, CH), 39.6 (C-8, CH), 27.3 (C-10, CH₃), 17.7 (C-9, CH₃), 16.4 (C-6, CH₂), 12.5 (C-7, CH₃), 11.5 (C-11, CH₃).

Stamm B 4710

Der marine Streptomycceten-Stamm B 4710 wird in der Sammlung mariner Actinomyceten des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Nach drei Tagen Inkubationszeit bildete der Stamm auf Agar ein weißes Luftmycel.

Primärscreening

Mit einer M_2^+ /50 % Seewasser-Schrägagarkultur des Stammes beimpfte man drei Agarplatten und inkubierte 72 h bei 28 °C. Mit diesen Kulturen wurden fünf mit je 200 ml des gleichen Nährmediums gefüllte Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm angezüchtet. In der dunkelbraunen Nährlösung bildeten sich weiße Pellets.

Der Extrakt wurde bei der Firma Oncotest (Freiburg i. Br.) untersucht und zeigte dort im Kolonieassay an humanen Tumor Xenografts eine starke *in vitro* Aktivität bei einer Konzentration von 0.1 µg/ml.

Fermentation und Aufarbeitung

Man fermentierte im 50-l-Maßstab mit M_2^+ /50 % Seewasser-Nährmedium. Beimpft wurde mit 4.5 l einer 72 h bei 28 °C inkubierten Schüttelkultur. Die Fermentation führte man bei 28 °C, 33 l Luft/min, pH 6.9 ± 1.2 (2 N NaOH, Citronensäure zur pH-Regulierung) und einer Rührgeschwindigkeit von 200 Upm durch. Schaumbildung wurde durch vorherige Zugabe von 3.5 g Niax verhindert. Das Aussehen der Kultur entsprach dem im Primärscreening.

Die Kulturbrühe wurde 5 min mit dem Ultraturrax behandelt und mit der Filterpresse über Celite[®] filtriert. Man extrahierte den Überstand und digerierte das Mycel jeweils viermal mit EtOAc. Nach dem Eindampfen der vereinigten org. Phasen erhielt man einen orangegelben Rohextrakt.

Isolierung

Man löste den Extrakt in 150 ml MeOH, entfettete zweimal mit je 100 ml C_6H_{12} und erhielt aus der methanolischen Phase durch Eindampfen i. Vak. 2.98 g Extrakt.

Tabelle 19: Aktivität der MeOH- und C₆H₁₂-Fraktionen des Stammes B 4710

Test-stamm/Fraktion	<i>E. coli</i>	<i>B. subt.</i>	<i>Str. viridochr.</i>	<i>M. miehei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Methanol-Extrakt	27	30	28	13	24	13
Cyclohexan-Extrakt	20	20	24	0	15	0

Eine Bioautographie entwickelter Dünnschichtchromatogramme (CHCl₃/MeOH 9:1) der MeOH-Fraktion mit den Testkeimen *Escherichia coli*, *Mucor miehei* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) zeigte ausschließlich Aktivität bei $R_f = 0.36$. Aus 1 g der MeOH-Fraktion erhielt man nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, CHCl₃/MeOH 6:4) 180.1 mg orangefarbenes Actinomycin D (**50**).

Actinomycin D (50): C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆ (1255.4). – orangefarbenes Pulver, $R_f = 0.36$ (CHCl₃/MeOH 95:5). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1278 ([M+Na]⁺, 100), 1257 ([M+H]⁺, 10). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 8.13$ (d br, ³J = 6 Hz, 1 H, NH-Val_α)^[106], 7.97 (d br, ³J = 6.4 Hz, 1 H, NH-Val_β)^[106], 7.80 (d br, ³J = 6.4 Hz, 1 H, NH-Thr_β), 7.65 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, 8-H), 7.37 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.20 (d br, ³J = 6.4 Hz, 1 H, NH-Thr_α), 6.03 (d, ³J = 9 Hz, 1 H, 2-H Pro_α) 5.96 (d, ³J = 9 Hz, 1 H, 2-H Pro_β), 5.25-5.15 (m, 2 H, 3-H Thr_{α,β}), 4.78 (d, ³J = 18.1 Hz, 1 H, 2-H_a Sar_α) 4.73 (d, ³J = 18.8 Hz, 1 H, 2-H_a Sar_β), 4.61 (dd, ³J = 6.4 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1 H, 2-H Thr_α) 4.49 (dd, ³J = 6.4 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1 H, 2-H Thr_β), 4.03-3.31 (m, 8 H, 2-H_b Sar_{α,β}, 2-H Val_{α,β}, 5-H₂ Pro_{α,β}), 2.93, 2.90, 2.88 (3s, 3 + 3 + 6 H, N-CH₃ MeVal_{α,β}, NCH₃ Sar_{α,β}), 2.65, 2.57 (m + s, 6 + 3 H, 3-H_a Pro_{α,β}, 2-H-, 3-H MeVal_{α,β}, 6-CH₃), 2.38-1.76 + 2.23 (m + s, 8 + 3 H, 3-H_b-, 4-H₂ Pro_{α,β}, 3-H Val_{α,β}, 4-CH₃), 1.28 (m, 6 H, CH₃ Thr_{α,β}), 1.17-1.07 (m, 6 H, CH₃ Val_{α,β}), 0.99-0.85 (m, 12 H, CH₃ Val_{α,β}, CH₃ MeVal_{α,β}), 0.75 (d, ³J = 4.9 Hz, 6 H, CH₃ MeVal_{α,β}).

Stamm B 7029

Der marine Streptomyceten-Stamm B 7029 wird in der Sammlung mariner Actinomyceten des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt. Das auf Agar gebildete Mycel ist schleimig und beigefarben.

Primärscreening

Mit einer M_2^+ /50 % Seewasser-Schrägagarkultur des Stammes wurden drei Agarplatten beimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen beimpfte man fünf mit je 200 ml des gleichen Nährmediums gefüllte Schikanekolben und züchtete 72 h bei 28 °C mit 95 Upm an. Der Extrakt wirkte auf die Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Mortalitätsrate: 94 % bei 7.5 µg/ml) stark toxisch und zeigte ebenfalls eine erhöhte Toxizität im Test gegen *Artemia salina* (Mortalitätsrate: 62 % bei 100 µg/ml). In den antibiotischen Hemmtests konnte lediglich eine schwache Aktivität gegen *Candida albicans* (Hemmhof-Ø: 12 mm) festgestellt werden.

Fermentation und Aufarbeitung

Als Animpfkultur inkubierte man 10 mit je 200 ml M_2^+ /50 % Seewasser gefüllte 1-l-Schikanekolben 72 h bei 28 °C und 95 Upm. Hiermit wurde dann ein 20-l-Fermenter beimpft, der bei 28 °C und einem Belüftungsvordruck von 0.5 atm in einem pH-Bereich von 6.50 ± 1.25 mit 200 Upm gerührt wurde. Nach 70stündiger Inkubation erntete man und filtrierte die 5 min mit dem Ultraturrax behandelte Kulturbrühe mit der Filterpresse über Celite[®]. Der Überstand wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, und das Mycel digerierte man nach Filtration über Celite[®] ebenfalls dreimal mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen dampfte man am Rotationsverdampfer i. Vak. ein.

Isolierung

Den Rohextrakt löste man in 50 ml MeOH, entfettete zweimal mit je 50 ml C_6H_{12} und erhielt 1.52 g methanolischen Extrakt. Die Toxizität gegen *Caenorhabditis elegans* und *Artemia salina* konnte im MeOH- als auch im C_6H_{12} -Extrakt nicht mehr nachgewiesen werden. Dagegen zeigte der MeOH-Extrakt neue antibiotische Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* (Hemmhof-Ø: 13 mm), *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 20 mm) und *Bacillus subtilis* (Hemmhof-Ø: 19 mm). Gegen *Candida albicans* war er nicht wirksam.

Man trennte den methanolischen Extrakt durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, $CHCl_3$ /MeOH 6:4) in vier Fraktionen.

Durch HPLC (beginnen mit CH_3CN - H_2O -Azeotrop/ H_2O = 15:85, Anstieg auf 35:65 in 25 min, Durchfluß: 10 ml/min) und zusätzliche Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) erhielt man aus Fraktion II 6.5 mg 2-Methyl-4(3*H*)-chinazolinon (**51**, t_R = 17 min).

Fraktion III wurde durch PDC weiter aufgeteilt (3 Platten 20 × 40 cm, $CHCl_3$ /MeOH 9:1) in zwei Fraktionen, von denen man die erste durch HPLC (beginnen mit CH_3CN - H_2O -

Azeotrop/H₂O = 10:90, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 20:80 in 20 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 35:65 in 15 min) in weitere drei Fraktionen aufteilte. Die erste Fraktion enthielt 2.8 mg Phenylacetamid (**53**, $t_R = 7.8$ min) als weißen Feststoff.

Fraktion IV wurde durch HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10:90, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100:0 in 30 min, Durchfluß: 10 ml/min) in drei Fraktionen getrennt. Fraktion Vb enthielt 6 mg 3-Indolcarbonsäure (**54**, $t_R = 21.2$ min) als weißen Feststoff.

2-Methyl-4(3H)-chinazolinon (51): C₉H₈N₂O. – $R_f = 0.32$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 160 (M⁺, 100), 145 (10), 120 (8), 119 (15), 92 (10), 91 (7), 90 (10). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 11.04$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.13 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 1.1$ Hz, 1 H, 5-H), 7.75 (td, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1 H, 7-H), 7.58 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 8-H), 7.43 (td, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 1.1$ Hz, 1 H, 6-H), 2.43 (s, 3 H, 2-Me).

Phenylacetamid (53): C₈H₉NO. – $R_f = 0.24$ (CHCl₃/MeOH 95:5). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 135 (M⁺, 32), 92 (100), 65 (18), 44 (9). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 7.35$ -7.19 (m, 5 H, Ar-H), 6.83 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, CONH_{2,a}), 6.30 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, CONH_{2,b}), 3.49 (s, 2 H, CH₂).

Indol-3-carbonsäure (54): C₉H₇NO₂. – $R_f = 0.53$ (CHCl₃/MeOH 95:5). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 161 (M⁺, 100), 144 (77). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 300 MHz): $\delta = 10.96$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.15 (m, 1 H, 4-H), 8.04 (d, $^3J = 0.5$ Hz, 1 H, 2-H), 7.51 (m, 1 H, 7-H), 7.21 (m, 2 H, 5-H, 6-H).

Stamm B 6003

Der Streptomyceten-Stamm B 6003 wird in der Sammlung mariner Actinomyceten des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in Reinkultur aufbewahrt.

Primärscreening

Mit einer M₂⁺/50 % Seewasser-Schrägagarkultur des Stammes wurden drei Agarplatten beimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen beimpfte man fünf mit je 200 ml des gleichen Nährmediums gefüllte Schikanekolben und züchtete 72 h bei 28 °C mit 95 Upm an. Der Stamm fiel bei der Firma Oncotest (Freiburg i. Br.) durch eine selektive Aktivität gegen vier Krebszelllinien auf.

Tabelle 20: Hemmtestaktivitäten des B 6003-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	-
Bacillus subtilis	11
Staphylococcus aureus	0
Candida albicans	22
Mucor miehei	26
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	14
Chlorella vulgaris	25
Chlorella sorokiniana	60
Scenedesmus subspicatus	30

Anzucht und Fermentation

Mit einer Stickstoffkultur beimpfte man drei Agarplatten, die als Nährmedium M_2^+ /50 % Seewasser enthielten, und inkubierte 72 h bei 28 °C. Mit diesem Material wurden 15 mit je 200 ml des gleichen Nährmediums befüllte Schikanekolben beimpft, die man bei 28 °C und 95 Upm für 72 h inkubierte. 2 l der Kulturbrühe dienten als Animpfmaterial für einen 20-l-Fermenter, der 72 h bei 28 °C, 200 Upm und 0.5 atm Belüftungsvordruck betrieben wurde.

Bei einer zweiten analogen Fermentation fügte man dem Nährmedium vor dem Beimpfen 600 ml DMSO hinzu.

Die Kulturbrühe wurde mit der Filterpresse über Celite[®] filtriert. Den Überstand extrahierte man viermal mit EtOAc. Den Rückstand überschichtete man mit EtOAc, ließ 3 h stehen, filtrierte über Celite[®] und digerierte dreimal mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen der ersten Extraktion dampfte man am Rotationsverdampfer i. Vak. ein. Die org. Phasen des Rück- und Überstandes aus dem zweiten Ansatz wurden getrennt auf entsprechende Weise aufgearbeitet.

Isolierung

Der Überstand-Extrakt der zweiten Fermentation wurde in 50 ml MeOH gelöst und zweimal mit je 50 ml C_6H_{12} entfettet. Durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) wurde er in vier Fraktionen aufgetrennt. Die erste Fraktion chromatographierte man an präparativen Dickschichtplatten (3 · 20 × 20 cm, $CHCl_3$) und erhielt 6.8 mg 2-Aminobenzoessäuremethylester (**55a**) als farbloses und 11.3 mg Pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**56**) als gelbes Öl.

2-Aminobenzoesäuremethylester (55a): $C_8H_9NO_2$. – $R_f = 0.83$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 151 (M^+ , 79), 119 (100), 92 (42), 65 (18). – **1H -NMR** ($CDCl_3$, 200 MHz): $\delta = 7.87$ (dd, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1 H, 3-H), 7.28 (dt, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1 H, 4-H), 6.69 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 4.90 (s br, H/D-austauschbar, 2 H, NH_2), 3.88 (s, 3 H, CH_3).

Pyrrrol-2-carbonsäuremethylester (56): $C_6H_7NO_2$. – $R_f = 0.72$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 125 (M^+ , 59), 94 (100), 93 (41), 84 (26), 66 (30), 49 (29), 47 (82). – **1H -NMR** ($CDCl_3$, 200 MHz): $\delta = 6.93$ (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.26 (dd, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, 1 H, 4-H), 3.84 (s, 3 H, OCH_3).

Stamm GW 1/1829

Bei dem Stamm GW 1/1829 handelt es sich um einen terrestrischen Streptomyeten, der bei der Firma bioLeads (Heidelberg) in Reinkultur gehalten wird. Auf Agar, der sich nach 2 d schwarz färbt, bildet der Stamm ein weißes Luftmycel.

Primärscreening

Der Stamm wurde auf M_2^+ -Schrägagar und anschließend auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C inkubiert. Fünf mit je 200 ml gefüllte 1-l-Schikanekolben beimpfte man mit den Agarkulturen und inkubierte 72 h bei 28 °C und 95 Upm. Durch Extraktion der Schüttelkultur mit EtOAc wurden 551 mg Rohextrakt erhalten.

Tabelle 21: Hemmtestaktivitäten des GW 1/1829-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	28
Bacillus subtilis	0
Staphylococcus aureus	25
Candida albicans	0
Mucor miehei	0
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	30
Chlorella vulgaris	15
Chlorella sorokiniana	32
Scenedesmus subspicatus	30

Im Test gegen *Caenorhabditis elegans* wurden alle Nematoden abgetötet ($c = 7.5$ µg Extrakt/ml).

Im Dünnschichtchromatogramm waren fünf teilweise UV-löschende Zonen zu erkennen, die mit Anisaldehyd/Schwefelsäure und Ehrlich's Reagenz rotbraun anfärbbar waren.

Fermentation und Aufarbeitung

Mit 2 l von einer 72 h bei 28 °C und 95 Upm inkubierten Schüttelkultur beimpfte man einen mit M_2^+ -Nährmedium befüllten 20-l-Fermenter, der 70 h bei 200 Upm, 0.5 atm Belüftungs-vordruck und 28 °C inkubiert wurde. Die Kulturbrühe filtrierte man über Celite[®] mit der Filterpresse, überschichtete den Filterkuchen mit Aceton und ließ 3 h stehen. Anschließend wurde filtriert und dreimal mit EtOAc digeriert. Den Überstand extrahierte man dreimal mit EtOAc. Die org. Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer i. Vak. eingedampft

Isolierung

Den Extrakt löste man in 50 ml MeOH und 50 ml C_6H_{12} , filtrierte über eine Glasfritte (G3) und trennte die Phasen voneinander. Die MeOH-Phase wurde noch einmal mit 50 ml C_6H_{12} extrahiert. Man erhielt nach Entfernen der Lösungsmittel 1.24 g MeOH- und 0.23 g C_6H_{12} -Eindampfrückstand. Den MeOH-Extrakt teilte man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) in sieben Fraktionen (I-VII), deren antibiotische Aktivität in Tabelle Tab. 22 dargestellt ist.

Tabelle 22: Aktivität der MeOH-Fraktionen des Stammes GW 1/1829

Test-stamm/Fraktion	<i>E. coli</i>	<i>B. subt.</i>	<i>Str. viri-dochr.</i>	<i>M. miehei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
I	21	28	26	0	24	0
II	21	29	24	0	24	0
III	21	25	20	0	23	0
IV	20	24	20	0	22	0
V	18	22	15	0	20	0
VI	17	20	12	0	19	0
VII	15	22	0	0	20	0

Aus Fraktion I wurde durch PDC (3 · 20 × 20 cm, $CHCl_3/MeOH$ 9:1) und anschließende Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 1.2 mg 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) als weißer Feststoff isoliert.

Aus Fraktion II wurde durch HPLC (beginnen mit CH_3CN-H_2O -Azeotrop/ H_2O = 50:50, Anstieg auf 60:40 in 15 min, für 10 min halten, Durchfluß: 10 ml/min) eine Unterfraktion (t_R = 13.2 – 16.6 min) erhalten, aus der man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 5.2 mg Sulfomycin I (**58**) als weißen Feststoff gewann.

Aus Fraktion VI erhielt man durch PDC (1 Platte 20 × 20 cm, $CHCl_3/MeOH$ 9:1) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) 3.8 mg Perlolyrin (**59**) als gelbes Öl.

4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (57):

$C_{14}H_{24}O_5$. – $R_f = 0.12$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3418$ (br) cm⁻¹, 2956, 2362, 1762, 1708, 1462, 1382, 1180, 1027. – **(+)-ESI-MS**: m/z (%) = 567 ([2M+Na]⁺, 100), 295 ([M+Na]⁺, 15). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 500 MHz): $\delta = 4.35$ (dd, ³ $J = 9$ Hz, ³ $J = 9$ Hz, 1 H, 5-H_a), 4.02 (dd, ³ $J = 9$ Hz, ³ $J = 9$ Hz, 1 H, 5-H_b), 3.89 (m, 1 H, 6-H), 3.66 (d, ³ $J = 7$ Hz, 2 H, 4-CH₂), 2.74 (m, 1 H, 4-H), 2.58 (dd, ³ $J = 6$ Hz, ³ $J = 3$ Hz, 1 H, 3-H), 2.44 (t, ³ $J = 7$ Hz, 2 H, 9-H), 2.29 (d, ³ $J = 6$ Hz, 2 H, 11-H₂), 2.07 (m, 1 H, 12-H), 1.71, 1.55 (2 m, 4 H, 7-H₂, 8-H₂), 0.88 (d, ³ $J = 7$ Hz, 6 H, 13-H₃, 14-H₃). – **¹³C/APT-NMR** ([D₆]Aceton, 150.8 MHz): $\delta = 210.2$ (10-C, C_q), 177.5 (2-C, C_q), 71.5 (6-C, C_q), 69.6 (5-C, CH₂), 63.2 (15-C, CH₂), 51.9 (11-C, CH₂), 49.0 (3-C, CH), 43.2 (9-C, CH₂), 41.5 (4-C, CH), 34.2 (7-C, CH₂), 25.0 (12-C, CH), 22.8 (13-C, 14-C, 2 CH₃), 21.0 (8-C, CH₂). – **HMQC-NMR** (inverses CH-COSY, [D₆]Aceton, INVBTP, F1 150.8 MHz, F2 599.9 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

 $C_{14}H_{22}O_4$ (M-H₂O)

Ber.: 254.1508

Gef.: 254.1508

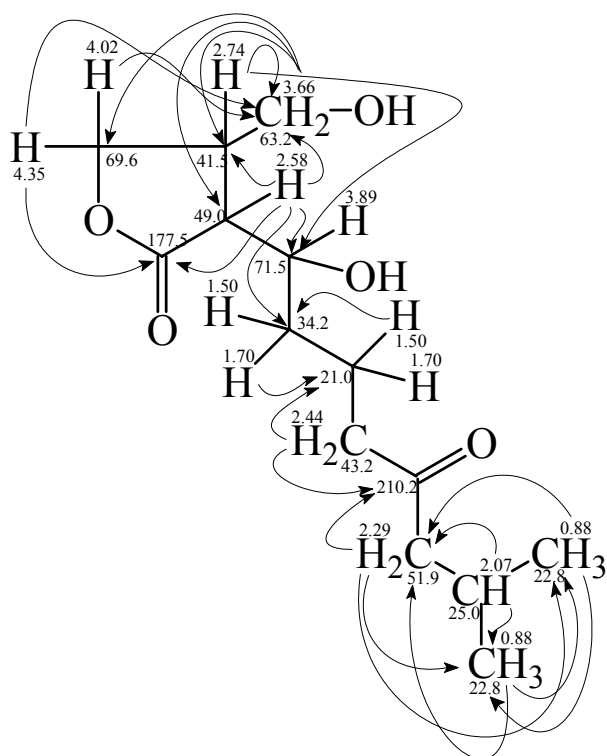


Abbildung 66: HMBC-NMR-Spektrum von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) (inverses COLOC, $[D_6]$ Aceton, IN4VLPLRND, F1 150.8 MHz, F2 599.7 MHz) (H \rightarrow C).

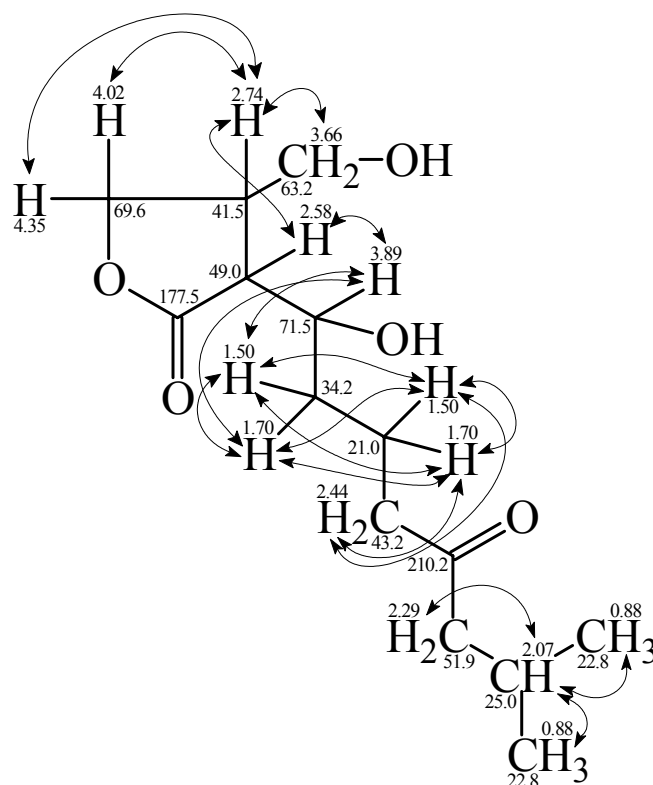


Abbildung 67: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxo-octyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) ($[\text{D}_6]$ Aceton, 600 MHz) ($\text{H} \leftrightarrow \text{H}$).

Sulfomycin I (58): $\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}_2$. – $R_f = 0.55$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1268 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 1245 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 7). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 300 MHz): $\delta = 10.41$ (s, H/D-austauschbar, 1 H, 10-H), 10.03 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 7-H), 9.99 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 23-H), 9.93 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 33-H), 9.33 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 47-H), 9.16 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 26-H), 9.07 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 4-H), 8.72 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 16-H), 8.63 (s, 1 H, 21-H), 8.52 (s, 1 H, 55-H), 8.45 (s, 1 H, 38-H), 8.35 (d, $^3J = 9.5$ Hz, 1 H, 40-H), 8.30 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 17-H), 8.18 (d, H/D-austauschbar, $^3J = 8.00$ Hz, 1 H, 50-H), 7.94 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 1- H_a), 7.52 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, 1- H_b), 6.58 (s, 1 H, 9'- H_a)¹⁰⁷, 6.50 (m, 1 H, 32'-H), 6.42 (m, 1 H, 39-H), 6.40 (s, 1 H, 25'- H_a), 6.28 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 46'-H), 6.13 (s, 1 H, 3'- H_a), 5.95 (s, 1 H, 9'- H_b), 5.76 (m, 2 H, 6'- H_2), 5.81 (m, 1 H, 22'- H_a), 5.75 (m, 1 H, 25'- H_b), 5.70 (m, 1 H, 22'- H_b), 5.67 (m, 1 H, 3'-H), 5.23 (d, H/D-austauschbar, $^3J = 5.5$ Hz, 1 H, 49'-OH), 4.94 (d, H/D-austauschbar, $^3J = 4.60$ Hz, 1 H, 46''-OH), 4.49 (m, 1 H, 46''-H), 4.36 (m, 1 H, 49-H), 4.16 (m, 1 H, 49'-H), 3.25 (s, 3 H, OCH_3), 2.58 (s, 3 H, 45'- H_3), 2.54 (s, 3 H, 31'- H_3), 1.77 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 32''- H_3), 1.21 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3 H, 46'''- H_3), 1.11 (d,

$^3J = 6.4$ Hz, 3 H, 49^{c} -H₃). – $^{13}\text{C/APT-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 150.8 MHz): $\delta = 169.6$ (C-48, C_q), 167.4 (C-37, C_q), 164.9 (C-2, C_q), 162.8 (C-24, C_q), 162.6 (8-C, C_q), 162.2 (C-54, C_q), 162.1 (C-5, C_q), 161.3 (C-11, C_q), 161.2 (C-41, C_q), 160.5 (C-51, C_q), 159.7 (C-27, C_q), 159.0 (C-34, C_q), 158.2 (C-20, C_q), 156.8 (C-30, C_q), 156.2 (C-44, C_q), 154.0 (C-31, C_q), 153.4 (C-45, C_q), 148.9 (C-12, C_q), 148.8 (C-35, C-52, 2 C_q), 146.7 (C-14, C_q), 140.1 (C-16, C-21, 2 CH), 138.6 (C-18, C_q), 136.8 (C-6, C_q), 136.6 (C-46^c, CH), 134.5 (C-3, C_q), 133.8 (C-9, C_q), 133.4 (C-25, C_q), 130.7 (C-15, C_q), 129.5 (C-32^c, CH₂), 129.1 (C-42, C_q), 128.6 (C-28, C_q), 127.4 (C-55, CH), 126.8 (C-38, CH), 123.4 (C-32, C_q), 121.8 (C-17, CH), 120.6 (C-46, C_q), 112.8 (C-22^c, CH₂), 111.6 (C-6^c, CH₂), 105.6 (C-9^c, CH₂), 105.0 (C-25^c, CH₂), 104.1 (C-3^c, CH₂), 77.1 (C-39, CH), 66.1 (C-49^c, CH), 62.4 (C-46^{cc}, CH₃), 20.0 (C-49^c, CH₃), 13.6 (C-32^{cc}, CH₃), 11.4 (C-45^c, CH₃).

Perlolysin (59): C₁₆H₁₂N₂O₂. – gelbes Öl, $R_f = 0.72$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 264 (M⁺, 100), 247 (51), 246 (25), 235 (7), 205 (17), 167 (14). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ Aceton, 300 MHz): $\delta = 10.96$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.38 (d, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, 3-H), 8.24 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 5-H), 8.02 (d, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, 4-H), 7.70 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 5-H), 7.56 (td, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 1.2$ Hz, 1 H, 7-H), 7.26 (td, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 1.2$ Hz, 1 H, 6-H), 7.22 (d, $^3J = 3.4$ Hz, 1 H, 3^c-H), 6.54 (d, $^3J = 3.4$ Hz, 1 H, 4^c-H), 4.72 (s, 2 H, OCH₂). – $^{13}\text{C/APT-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ Aceton, 150.8 MHz): $\delta = 157.4$ (2^c-C, C_q), 154.7 (5^c-C, C_q), 142.1 (8a-C, C_q), 139.4 (3-C, CH), 134.5 (1-C, C_q), 131.9 (4b-C, C_q), 130.8 (4a-C, C_q), 129.1 (7-C, CH), 122.3 (5-C, CH), 121.9 (9a-C, C_q), 120.6 (6-C, CH), 114.2 (4-C, CH), 113.1 (8-C, CH), 110.1 (4^c-C, CH), 110.0 (3^c-C, CH), 57.4 (CH₂OH, CH₂). – **HMQC-NMR** (inverses CH-COSY, $[\text{D}_6]$ Aceton, INVBTP, F1 150.8 MHz, F2 599.7 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

C₁₆H₁₂N₂O₂

Ber.: 264.0898 Da

Gef.: 264.0898

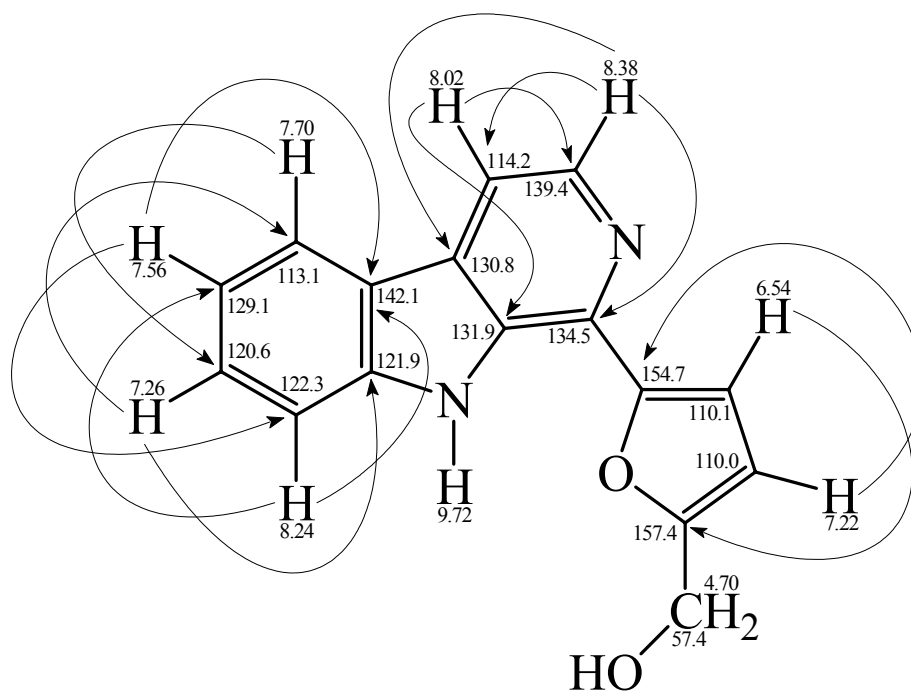


Abbildung 67: HMBC-NMR-Spektrum von Perlolyrin (**59**) (inverses COLOC, $[D_6]$ Aceton, INV4LPLRND, F1 150.8 MHz, F2 599.7 MHz) (H \rightarrow C).

Stamm GW 22/1818

Der Streptomyceten-Stamm GW 22/1818 wurde einem terrestrischen Habitat entnommen und wird bei der Firma bioLeads (Heidelberg) in Reinkultur gehalten. Auf Agar bildete er ein blau gefärbtes Mycel.

Primärscreening

Man inkubierte den Stamm erst auf M_2^+ -Schrägagar und anschließend auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C. Mit den Agarkulturen wurden fünf mit je 200 ml gefüllte 1-l-Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C und 95 Upm inkubiert. Die Schüttelkultur wurde mit EtOAc extrahiert.

Im Dünnschichtchromatogramm waren bei Tageslicht eine marineblaue ($R_f = 0.31 - 0.42$, $CHCl_3/MeOH$ 9:1) und eine rote Zone ($R_f = 0.98$) zu sehen.

In Agarplattendiffusionstests zeigte der Extrakt nur schwache Aktivitäten (s.Tab. 23).

Tabelle 23: Hemmtestaktivitäten des GW 22/1818-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	12
Bacillus subtilis	0
Staphylococcus aureus	0
Candida albicans	0
Mucor miehei	0
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	11
Chlorella vulgaris	15
Chlorella sorokiniana	14
Scenedesmus subspicatus	13

Fermentation und Aufarbeitung

Man beimpfte von 72 h bei 28 °C inkubierten Agarplatten-Kulturen elf 1-l-Schikanekolben mit je 200 ml Nährlösung. Jeweils zwei Kolben enthielten $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ der normalen M_2^+ -Konzentration. Zwei weitere Kolben mit M_2^+ -Nährmedium ummantelte man vollständig mit Aluminiumfolie. Alle Kolben wurden 7 d bei 28 °C und 95 Upm inkubiert und zweimal pro Tag auf Blaufärbungen kontrolliert. Die restlichen drei Kolben ließ man bei Raumtemp. 6 d stehen.

In einer zweiten Versuchsreihe variierte man den pH-Wert der Nährlösungen, indem man vor dem Autoklavieren von 10 mit je 50 ml gefüllten 250-ml-Schikanekolben bei jeweils zwei der Kolben den pH-Wert mit 2 N NaOH auf 6.8, 7.3, 7.8, 8.3 und 8.8 einstellte. Die Kolben beimpfte man mit den schon vorher verwendeten Agarplatten-Kulturen und inkubierte bei 30 °C und 220 Upm. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24: Ergebnisse der Nährmedienvariation von Stamm GW 22/1818

pH-Wert	Wachstum	Blaufärbung
6.8	Gut	-
7.3	Sehr gut	Mäßig
7.8	Sehr gut	Gut
8.3	Sehr gut	Gut
8.8	Sehr gut	Sehr gut

Auf sechs Agarplatten subkultivierte man die oben verwendeten Kulturen, inkubierte sie für 72 h bei 28 °C und beimpfte 96 1-l-Erlenmeyerkolben, die mit jeweils 165 ml M_2^+ -Nährmedium befüllt waren. Diese wurden unter gleichen Bedingungen auf Parrallelschüttlern inkubiert. Die Kulturbrühe behandelte man 5 min mit dem Ultraturrax, filtrierte den Überstand ab und digerierte das Mycel nach Filtration über Celite[®] sechsmal mit EtOAc. Die vereinigten org. Phasen dampfte man am Rotationsverdampfer i. Vak. ein.

Isolierung

Den Rohextrakt löste man in 50 ml MeOH und 50 ml C₆H₁₂, trennte beide Phasen und extrahierte die MeOH-Phase nochmals mit 50 ml C₆H₁₂. Die vereinigten C₆H₁₂-Phasen wurden mit 25 ml MeOH erneut extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels aus der schwarzen MeOH-Phase erhielt man 720 mg Extrakt.

Man unterzog den MeOH-Extrakt einer Chromatographie an modifiziertem Kieselgel (Merck LiChroPrepDIOL[®], 3 × 25 cm, Gradient: 200 ml CHCl₃, 150 ml CHCl₃/MeOH 95:5, 150 ml CHCl₃/MeOH 9:1, 200 ml MeOH) und erhielt sechs Fraktionen. Fraktion I wurde durch PDC (3 · 40 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) in drei Unterfraktionen (Ia-c) getrennt. Aus der Unterfraktion Ib erhielt man durch HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 35:65 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100:0 in 15 min) 4.6 mg β-Phenylethylisobutyramid (**62a**, t_R = 20 min) und 5.9 mg β-Phenylethylisovalerylamid (**62b**, t_R = 22 min) als weiße Feststoffe. Aus Fraktion Ic fiel beim Lösen in CHCl₃/MeOH 6:4 ein roter Farbstoff aus, der abfiltriert wurde. Durch PDC (10 × 20 cm, CHCl₃) erhielt man 0.5 mg F 1301 (**63a**) als karminroten Feststoff.

Drei blaue Farbstoffe konnten aus den Fraktionen IV-VI zwar isoliert werden, lösten sich aber nicht ausreichend gut, um auswertbare ¹³C-Spektren zu erhalten.

β-Phenylethylisobutyramid (62a): C₁₂H₁₇NO. – R_f = 0.58 (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 191 (M⁺, 74), 104 (C₆H₅-CH=CH₂⁺, 100), 71 (50), 43 (C₃H₇⁺, 40). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 200 MHz): δ = 7.37-7.14 (m, 5 H, Ar-H), 5.42 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 3.52 (dt, ³J = 5 Hz, ³J = 5 Hz, 2 H, 8-H₂), 2.82 (t, ³J = 5 Hz, 2 H, 7-H₂), 2.30 (m, 1 H, 11-H), 1.11 (d, ³J = 6.5 Hz, 6 H, 12-, 13-H₃). – **¹³C/APT-NMR** (CDCl₃, 125.7 MHz): δ = 177.0 (C-10, C_q), 138.9 (C-1, C_q), 128.8 (C-2, C-6, 2 CH), 128.6 (C-3, C-5, 2 CH), 126.5 (C-4, CH), 40.5 (C-8, CH₂), 35.7 (C-7, CH₂), 35.7 (C-11, CH), 19.6 (C-12, C-13, 2 CH₃).

β-Phenylethylisovalerylamid (62b): C₁₃H₁₉NO. – R_f = 0.62 (CHCl₃/MeOH 9:1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 205 (M⁺, 56), 104 (C₆H₅-CH=CH₂⁺, 100), 91 (19), 85 (48), 57 (49), 41 (12). – **¹H-NMR** ([D₆]Aceton, 200 MHz): δ = 7.38-7.14 (m, 5 H, Ar-H), 5.41 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 3.54 (dt, ³J = 5 Hz, ³J = 5 Hz, 2 H, 8-H₂), 2.82 (t, ³J = 5 Hz, 2 H, 7-H₂), 2.35 (m, 1 H, 12-H), 2.00 (t, ³J = 6 Hz, 2 H, 11-H₂), 0.91 (d, ³J = 6 Hz, 6 H, 13-H₃, 14-H₃).

F 1301 (63a): C₂₄H₁₉O₇Cl. – *R_f* = 0.95 (CHCl₃/MeOH 98:2). – (+)-ESI-MS: *m/z* (%) = 931.1 ([2M+Na]⁺, 100), 477.6 ([M+Na]⁺, 7), 455.8 ([M+H]⁺, 2). – ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 12.08 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 8-OH), 11.48 (s, H/D-austauschbar, 1 H, 6-OH), 7.96 (s, 1 H, 11-H), 7.41 (s, 1 H, 5-H), 7.34 (s, 1 H, 4-H), 3.96 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 3.02 (q, ³*J* = 7.5 Hz, 2 H, 9'-H₂), 2.51 (s, 3 H, 3'-H), 1.25 (t, ³*J* = 7.5 Hz, 9''-H₃). – ¹³C/APT-NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ = 193.2 (7-C, C_q), 183.8 (12-C, C_q), 166.7 (10'-C, C_q), 160.6 (8-C, C_q), 156.6 (6-C, C_q), 154.0 (1-C, C_q), 141.4 (3-C, C_q), 140.8 (9-C, C_q), 138.9 (4a-C, C_q), 138.1 (10-C, C_q), 137.2 (11a-C, C_q), 133.5 (12a-C, C_q), 127.0 (2-C, C_q), 123.0 (4-C, CH), 119.6 (12b-C, C_{quart}), 119.5 (6a-C, C_{quart}), 119.2 (11-C, CH), 117.9 (5-C, CH), 115.7 (7a-C, C_{quart}), 61.5 (OCH₃, CH₃), 52.7 (10''-C, CH₃), 21.3 (3'-C, CH₃), 20.5 (9'-C, CH₂), 13.9 (9''-C, CH₃). – **HMQC-NMR** (inverses CH-COSY, [D₆]Aceton, INVBTP, F1 150.8 MHz, F2 599.7 MHz) (H → C): Alle C-H-Konnektivitäten wurden durch Kopplungen bestätigt.

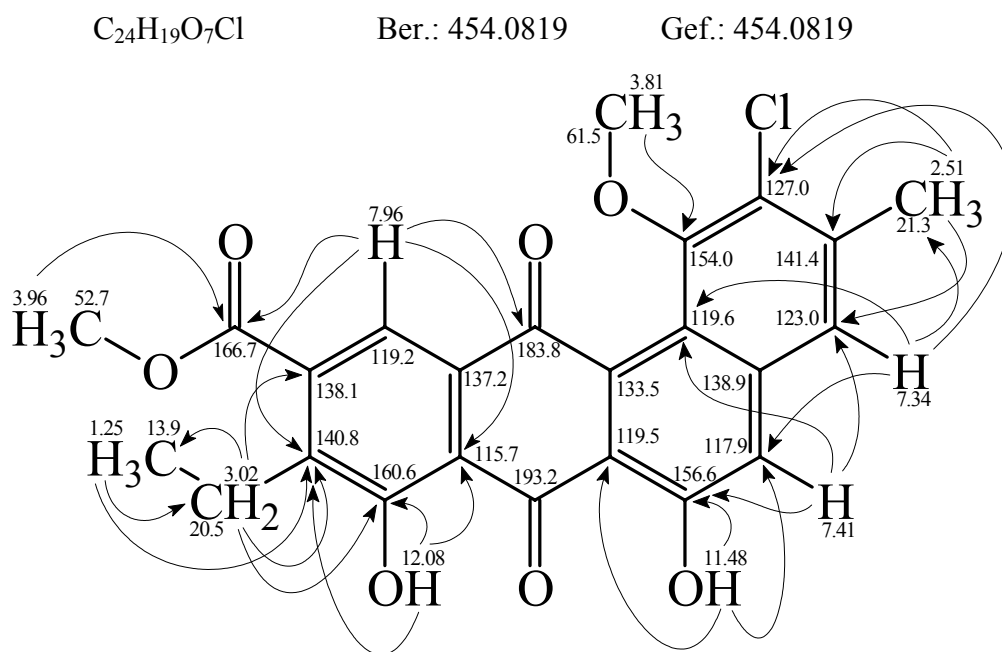


Abbildung 68: HMBC-NMR-Spektrum von F1301 (**63a**) (inverses COLOC, CDCl₃, INV4LPLRND, F1 125.7 MHz, F2 499.9 MHz) (H → C).

DSF3: – *R_f* = 0.28 (CHCl₃/MeOH 9:1). – UV/Vis (c = 0.2, MeOH): λ_{max} = 248 nm, 291, 619.

Akashin A (61): – *R_f* = 0.28 (CHCl₃/MeOH 9:1). — UV/Vis (c = 0.2, MeOH): λ_{max} = 240 nm, 291, 620.

Stamm GW 5/1543

Der zu den terrestrischen Streptomyceten zählende Stamm GW 5/1543 wird von der Firma bioLeads (Heidelberg) in Reinkultur gehalten.

Primärscreening

Der Stamm wurde zunächst auf M_2^+ -Schrägagar und anschließend auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C inkubiert. Fünf mit je 200 ml gefüllte 1-l-Schikanekolben beimpfte man mit den Agarkulturen und inkubierte 72 h bei 28 °C und 95 Upm. Durch Extraktion der Schüttelkultur mit EtOAc wurden 240 mg Rohextrakt erhalten.

Tabelle 25: Hemmtestaktivitäten des GW 5/1543-Extraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	20
Bacillus subtilis	20
Staphylococcus aureus	20
Candida albicans	0
Mucor miehei	0
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	20

Der Extrakt wirkte selektiv gegen verschiedene Krebszelllinien. Das Dünnschichtchromatogramm enthielt eine Zone bei $R_f = 0.05$ ($CHCl_3/MeOH$ 9:1), die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure hellbraun anfärben ließ.

Fermentation und Aufarbeitung

Mit der im Primärscreening angefertigten M_2^+ -Schrägagarkultur beimpfte man sechs Agarplatten und inkubierte diese 72 h bei 28 °C. Mit diesen Kulturen wurden 96 mit jeweils 250 ml M_2^+ -Nährlösung befüllte 1-l-Erlenmeyerkolben beimpft und 71 h bei 28 °C auf einem Parrallelschüttler inkubiert. Die vereinigte Kulturbrühe behandelte man 5 min mit dem Ultraturrax und trennte mit der Filterpresse über Celite[®] das Mycel vom Überstand ab. Das Mycel überschichtete man mit EtOAc und ließ ca. 3 h stehen. Dann filtrierte man über Celite[®] und digerierte viermal mit EtOAc. Der Überstand wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Aus den vereinigten org. Phasen entfernte man das Lösungsmittel i. Vak. am Rotationsverdampfer.

Isolierung

Den Rohextrakt löste man in 50 ml MeOH und entfettete zweimalig mit je 50 ml C_6H_{12} . Die 1.24 g des MeOH-Extraktes trennte man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3×50 cm, MeOH) in sieben Fraktionen, deren antibiotische Aktivitäten in Tabelle 26 zusammengefaßt sind.

Tabelle 26: Aktivitäten der Fraktionen des Stammes GW 5/1543

Teststamm/Fraktion	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	<i>Mucor miehei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
I	0	11	0	0	0	0
II	12	13	11	11	22	verst. Wachstum
III	0	0	0	0	20	0
IV	0	0	0	0	15	0
V	0	0	0	0	12	0
VI	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	-	11	0

Aus Fraktion II isolierte man durch präp. HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 20:80 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 50:50 in 20 min, Durchfluß: 10 ml/min) 8.6 mg N-Acetyltyramin (**65**, 11.0 min) als gelben Feststoff und 7.1 mg N_β-(2-Phenylethyl)acetamid (**37**, 27.0 min) als schwachgelber Feststoff.

N-Acetyltyramin (65): C₁₀H₁₃NO₂. – *R_f* = 0.17 (CHCl₃/MeOH 9:1). – ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 7.12 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, OH), 6.97, 6.72 (2 d, AA'BB', ³J = 8.5 Hz, 4 H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H), 5.52 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 3.41 (dt, ³J = 6.4 Hz, ³J = 6.4 Hz, 2 H, 8-H₂), 2.66 (t, ³J = 6.4 Hz, 2 H, 7-H₂), 1.88 (s, 3 H, CH₃).

Stamm GW 39/1573

Der terrestrische Streptomycetenstamm wird bei der Firma bioLeads (Heidelberg) in Reinkultur gehalten. Auf Agar bildete er ein weißes Mycel.

Primärscreening

Man inkubierte den Stamm erst auf M₂⁺-Schrägagar und anschließend auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C. Mit den Agarkulturen wurden fünf mit je 200 ml gefüllte 1-l-Schikanekolben

beimpft und 72 h bei 28 °C und 95 Upm inkubiert. Die Schüttelkultur wurde mit EtOAc extrahiert.

Die Ergebnisse des mikrobiologischen Screenings sind in Tabelle 27 zusammengefaßt.

Tabelle 27: Hemmtestaktivitäten des GW 39/1573-Rohextraktes

Testorganismus	Hemmhof-Ø in mm
Escherichia coli	20
Bacillus subtilis	20
Staphylococcus aureus	16
Candida albicans	12
Mucor miehei	14
Streptomyces viridochromogenes (Tü 57)	34
Chlorella vulgaris	11
Chlorella sorokiniana	11
Scenedesmus subspicatus	33

Besonders auffällig unter mehreren mit Anisaldehyd/Schwefelsäure anfärbaren Zonen waren eine blaue bei $R_f = 0.07$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) und eine orangefarbene bei $R_f = 0.27$.

Fermentation und Aufarbeitung

Zum Beimpfen eines 20-l-Fermenters dienten 2 l einer für 74 h bei 28 °C und 95 Upm inkubierten Schüttelkultur. Die Fermentation wurde bei 28 °C, 200 Upm und 0.5 atm Belüftungsvordruck durchgeführt. Die Kulturbrühe filtrierte man über Celite[®] mit der Filterpresse und extrahierte den Überstand viermal mit EtOAc. Das Mycel überschichtete man mit Aceton und ließ ca. 3 h stehen. Dann filtrierte man über Celite[®] und digerierte viermal mit EtOAc. Die org. Phasen wurden vereinigt und i. Vak. am Rotationsverdampfer eingedampft.

Isolierung

Der braunschwarze Eindampfrückstand wurde in 50 ml MeOH und 50 ml C_6H_{12} gelöst und filtriert. Nach der Trennung der beiden Phasen extrahierte man die MeOH-Phase erneut mit 50 ml C_6H_{12} . Zum methanolischen Eindampfrückstand fügte man 50 ml Aceton hinzu, filtrierte über eine Glasfritte (G3) und spülte zweimal mit je 20 ml Aceton. Der Rückstand wurde mit MeOH aus dem Filter gewaschen. Man erhielt als Eindampfrückstand 270 mg aus der

MeOH- und 382 mg aus der Aceton-Phase. Letztere zeigte antibiotische Aktivität gegen *Escherichia coli* (Hemmhof-Ø: 18 mm), *Staphylococcus aureus* (Hemmhof-Ø: 23 cm) und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) (Hemmhof-Ø: 30cm), gegen den die C₆H₁₂- (Hemmhof-Ø: 23 cm) und MeOH-Extrakte (Hemmhof-Ø: 19 mm) auch aktiv waren.

Den Aceton-Extrakt trennte man durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (3 × 50 cm, MeOH) in vier Fraktionen.

Aus Fraktion I wurden durch HPLC (beginnen mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 25:75 für 10 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 45:55 in 15 min, halten für 7 min, Durchfluß: 10 ml/min) *cyclo*(Ile-Pro) (**66**, t_R = 13.9 min, 3.1 mg) als farbloses Öl, *cyclo*(Leu-Pro) (**26**, t_R = 15,4 min, 5.6 mg) und *cyclo*(Phe-Pro) (**27**, t_R = 19.6 min, 3.8 mg) als weißer Feststoff und Nargenicin B (**67**, t_R = 30.8 min, 151 mg) als gelbes Öl isoliert.

Fraktion III enthielt eine gelbe Verbindung, die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure dunkelrot anfärben ließ. Durch PDC (20 × 20 cm, CHCl₃/MeOH 9:1) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (1.5 × 30 cm, MeOH) wurden 0.7 mg 1-(9H-β-Carbolin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (**68a**) als gelbes Öl isoliert.

***cyclo*(Ile-Pro) (66):** C₁₁H₁₈N₂O₂. – R_f = 0.63 (CHCl₃/MeOH 9:1). – ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 5.83 (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 4.08 (t, ³J = 8.8 Hz, 1 H, 6-H), 3.97 (s, 1 H, 3-H), 3.58 (m, 2 H, 9-H₂), 2.36, 2.00 (2 m, 5 H, 7-H₂, 8-H₂, 10-H), 1.42, 1.20 (2 m, 2 H, 11-H₂), 1.05 (d, ³J = 7.3 Hz, 3 H, 10-CH₃), 0.93 (t, ³J = 7.3 Hz, 3 H, 12-H₃).

Nargenicin B (67): C₂₉H₃₉NO₁₀. – R_f = 0.22 (CHCl₃/MeOH 9:1). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1145.3 ([2 M+Na]⁺, 100), 584.7 ([M+Na]⁺, 84). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton, 200 MHz): δ = 10.01 (s br, 1 H, H/D-austauschbar, NH), 7.07 (td, ³J = 4.2 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, 2^{''}-H), 6.90 (m, 1 H, 4^{''}-H), 6.22 (dt, ³J = 4.2 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, 3^{''}-H), 5.85 (ddd, ³J = 9.0 Hz, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, 8-H), 5.53 (dd, ³J = 9.0 Hz, ³J = 2.9 Hz, 1 H, 9-H), 5.46 (dq, ³J = 7.0, ⁴J = 1.0 Hz, 1 H, 17-H), 5.22 (dd, ³J = 8.6 Hz, ³J = 6.4 Hz, 1 H, 15-H), 5.16 (t, ³J = 4.9 Hz, 1 H, 5-H), 4.30 (t, ³J = 4.4 Hz, 1 H, 12-H), 4.22 (d, ³J = 4.9 Hz, 1 H, 6-H), 3.97 (m, 3 H, davon 1 H/D-austauschbar, 3-H, 15'-H), 3.62 (dd, ²J = 9.0 Hz, ³J = 6.1 Hz, 1 H, 4'-H_a), 3.46 (m, 4 H, davon 2 H/D-austauschbar, 4'-H_b, 15^{''}-H_a), 3.31 (s+dd, ²J = 9.8 Hz, ³J = 7.1 Hz, 4 H, 4'-OCH₃, 15^{''}-H_b), 3.16 (s, 3 H, 15^{''}-OCH₃), 3.10 (q, ³J = 6.8 Hz, 1 H, 16-H), 2.70 - 2.54 (m, 4 H, 4-H, 7-H, 10-H, 11-H_a), 2.50 (d, ³J = 2.0 Hz, 1 H, 2-H), 1.81 (s, 3 H, 18-H₃), 1.55 (ddd, ²J = 16.4 Hz, ³J = 6.4 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1 H, 11-H_b), 1.29 (d, ³J = 6.8 Hz, 3 H, 16-CH₃). – ¹³C/APT-NMR ([D₆]Aceton, 150.8 MHz): δ = 176.2 (13-C, C_q), 160.3 (6^{''}-C, C_q), 136.1

(18-C, C_q), 135.5 (9-C, CH), 131.1 (17-C, CH), 127.7 (8-C, CH), 124.4 (2''-C, CH), 123.2 (5''-C, C_q), 116.2 (4''-C, CH), 110.6 (3''-C, CH), 90.4 (1-C, C_q), 81.7 (12-C, CH), 75.72 (15-C, CH), 75.69 (15''C, CH₂), 73.3 (3-C, CH), 72.6 (4'-C, CH₂), 71.2 (5-C, CH), 70.2 (6-C, CH), 69.4 (15'C, CH), 59.0 (4'-OCH₃, CH₃), 58.8 (15''-OCH₃, CH₃), 50.0 (2-C, CH), 42.1 (7-C, CH), 40.0 (4-C, CH), 39.4 (10-C, CH), 36.1 (11-C, CH₂), 33.4 (16-C, CH), 17.5 (18-CH₃, CH₃), 16.1 (16-CH₃, CH₃).

C₂₉H₃₉NO₁₀

Ber.: 561.2566

Gef.: 561.2565

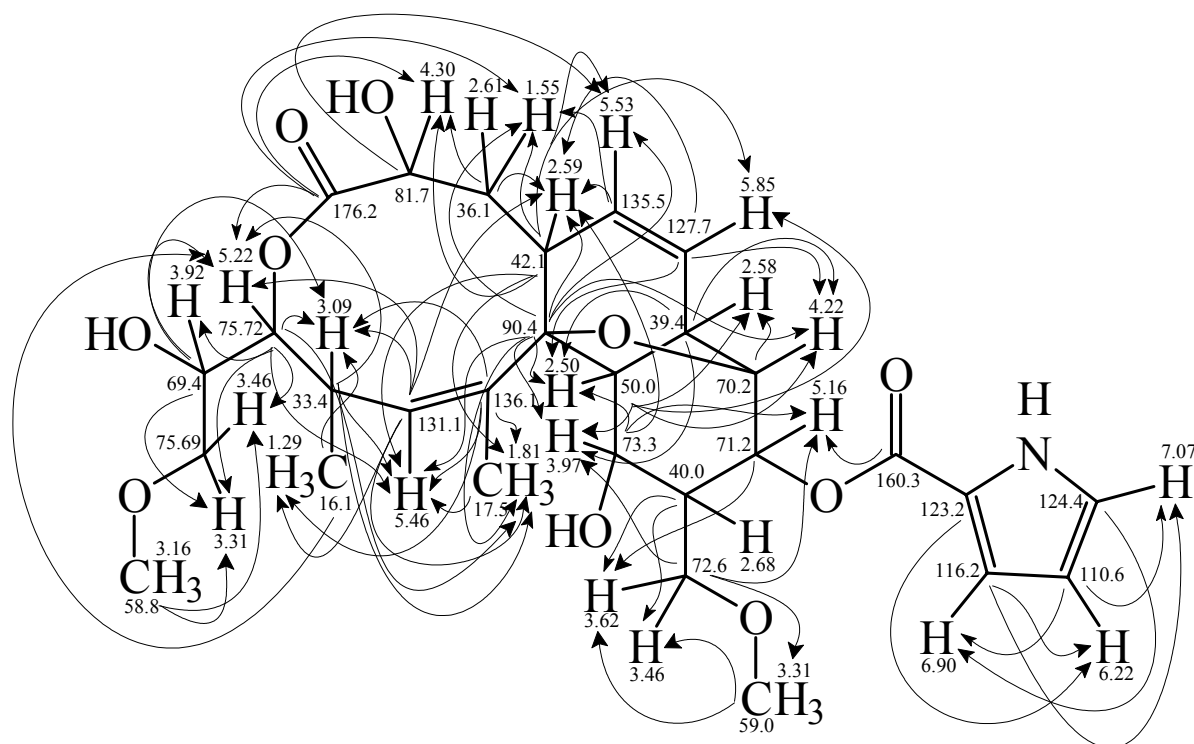


Abbildung 69: HMBC-NMR von Nargenicin B1 (67) (inverses COLOC, [D₆]Aceton, IN4VLPLRND, F1 150.8 MHz, F2 599.7 MHz) (H → C).

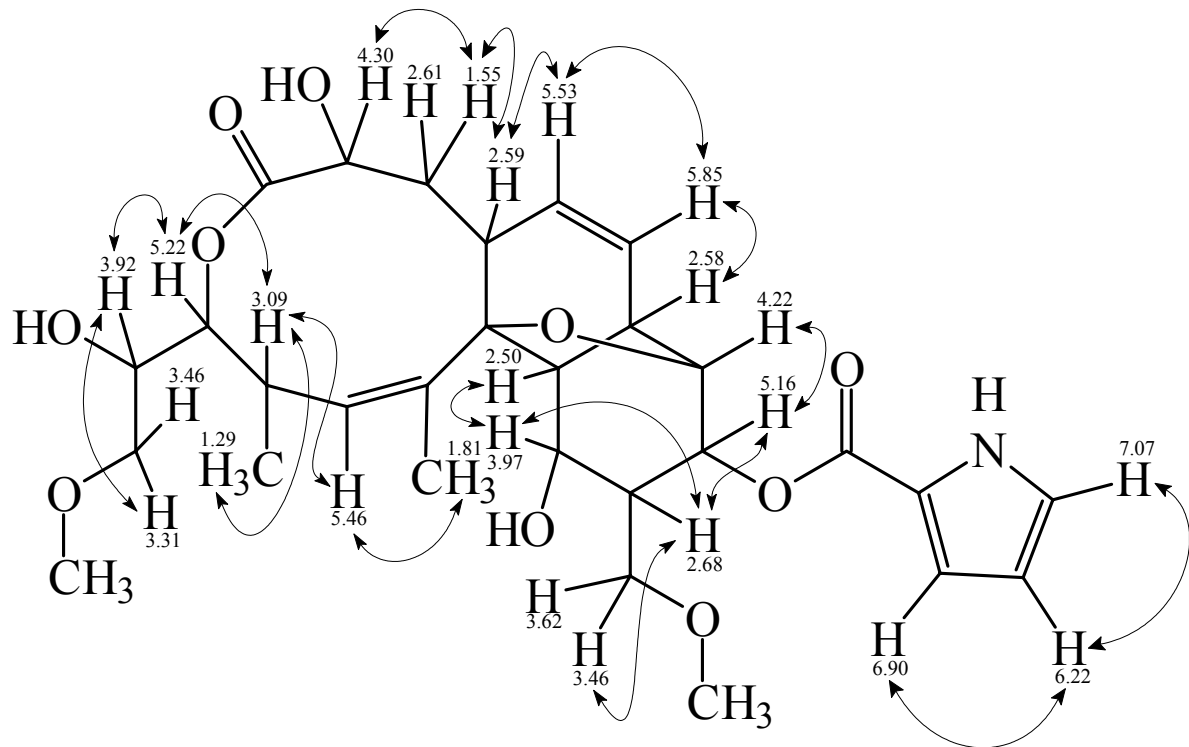


Abbildung 70: H,H-COSY-NMR von Nargenicin B1 (**67**) ($[D_6]$ Aceton, 500 MHz) (H \rightarrow H).

1-(9H- β -Carboline-1-yl)-3-hydroxy-propan-1-on (68a**):** $C_{14}H_{12}N_2O_2$. – $R_f = 0.76$ (CHCl₃/MeOH 9:1). – **IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3425$ (br) cm⁻¹, 2925, 2362, 1626, 1383. – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 240 (M⁺, 56), 211 (100), 168 (56). – **¹H-NMR** (CDCl₃, 600 MHz): $\delta = 10.29$ (s br, H/D-austauschbar, 1 H, NH), 8.52 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 1 H, 3-H), 8.18 (d, 4.9 Hz, 1 H, 4-H), 8.16 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1 H, 5-H), 7.60 (m, 2 H, 7-H, 8-H), 7.35 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 1 H, 6-H), 4.10 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, 12-H), 3.58 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, 11-H).

$C_{14}H_{12}N_2O_2$

Ber.: 240.0899

Gef.: 240.0899

Anhang

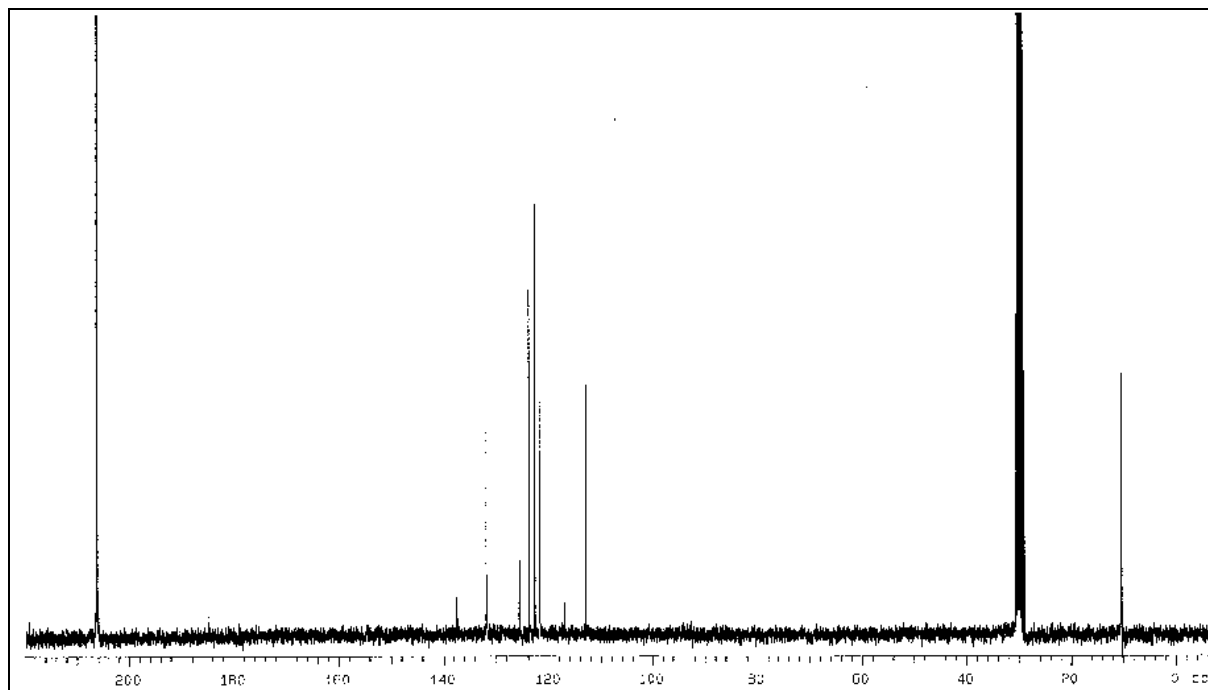


Abbildung 71: ^{13}C -NMR-Spektrum von Indol-3-carbonsäurethiomethylester (**48**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

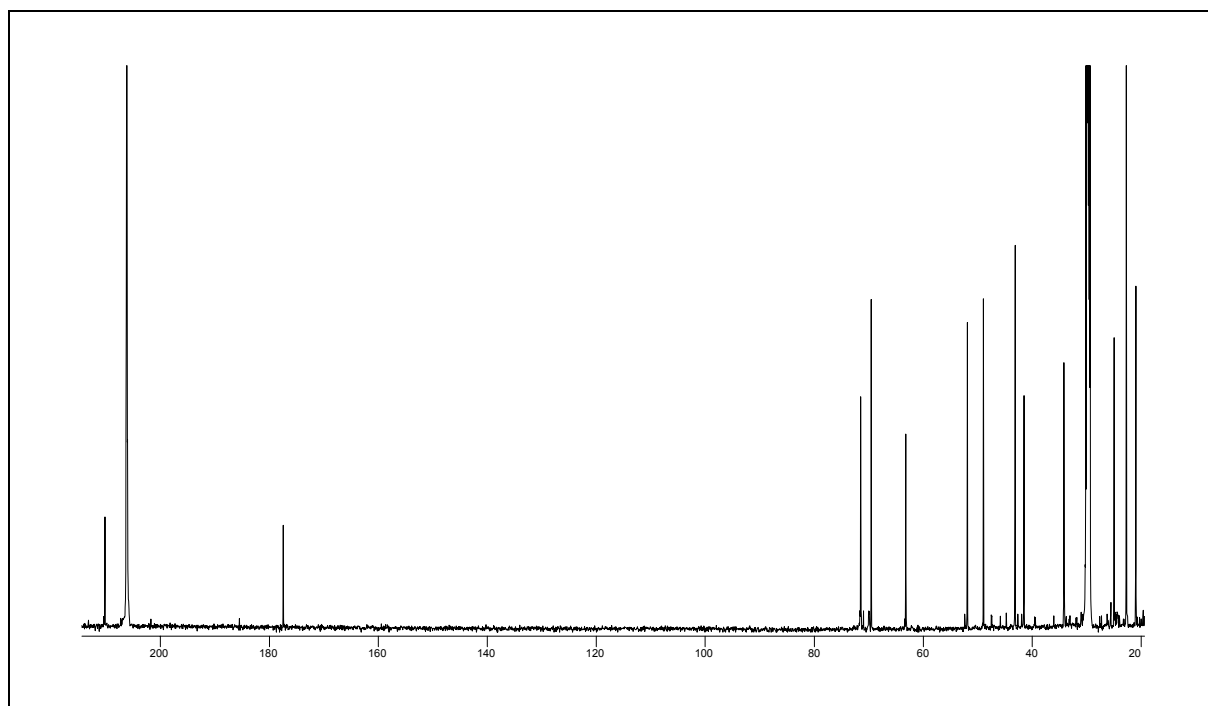


Abbildung 72: ^{13}C -NMR-Spektrum von 4-Hydroxymethyl-3-(1-hydroxy-7-methyl-5-oxooctyl)-dihydro-furan-2-on (**57**) in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$

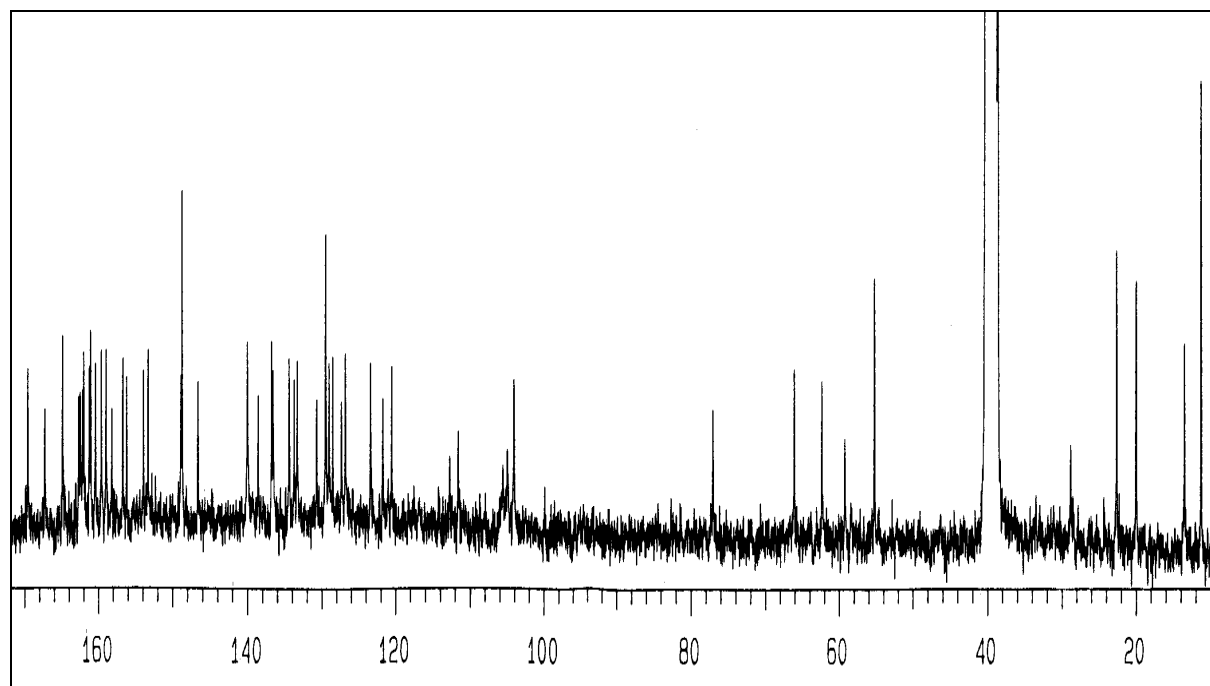


Abbildung 73: ^{13}C -NMR-Spektrum von Sulfomycin (58) in $[\text{D}_6]$ Aceton

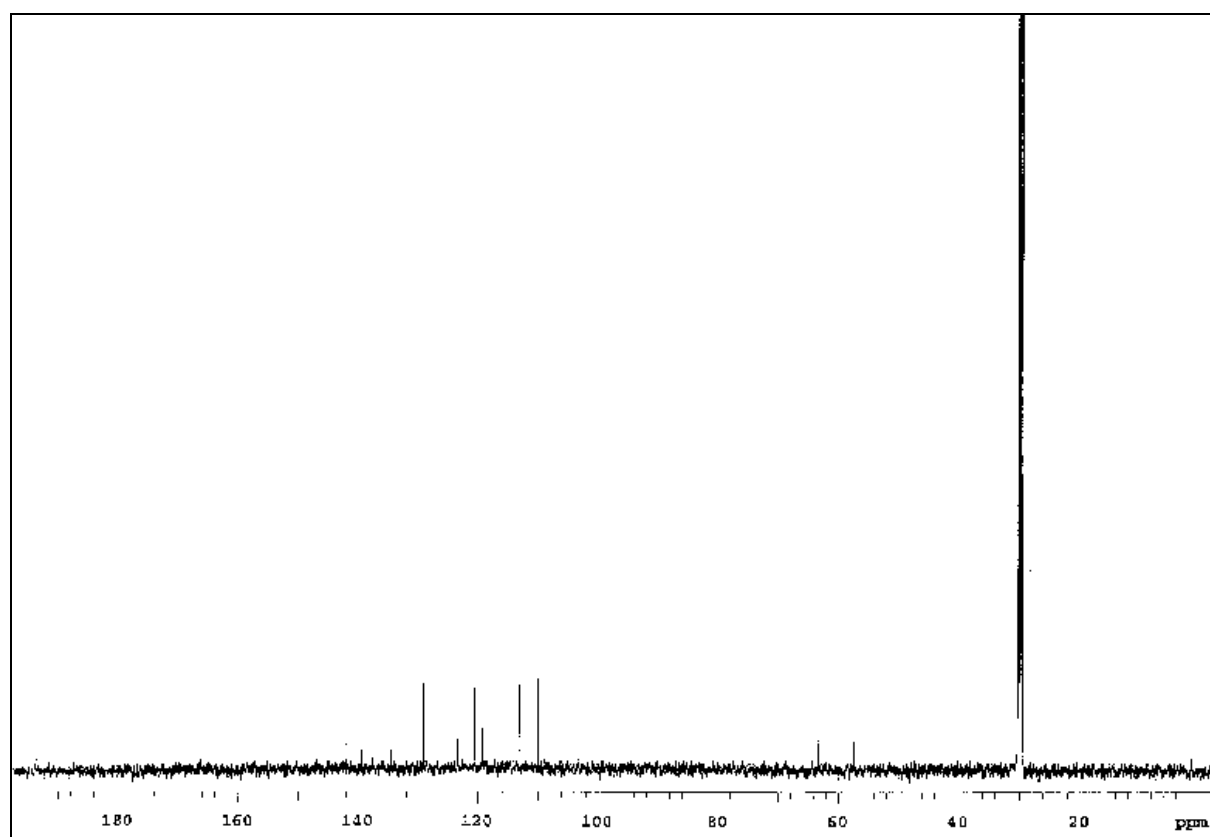


Abbildung 74: ^{13}C -NMR-Spektrum von Perlolyrin (59) in $[\text{D}_6]$ Aceton

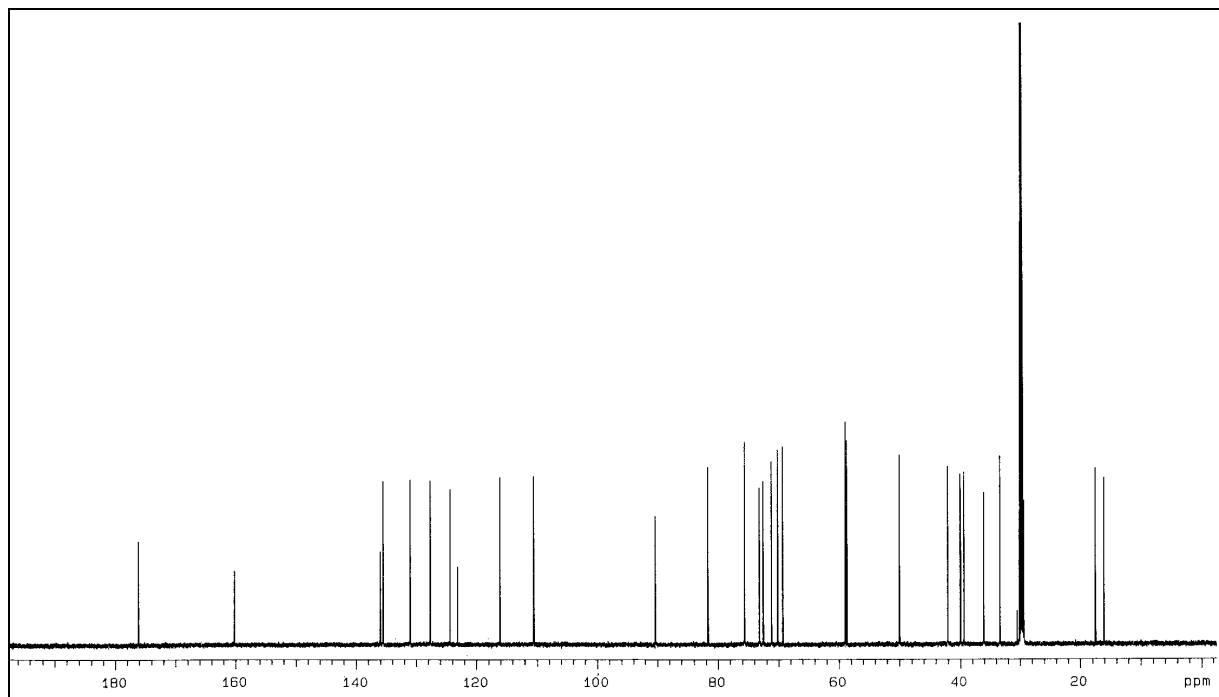


Abbildung 75: ^{13}C -NMR-Spektrum von Nargenicin B1 (67) in $[\text{D}_6]$ Aceton

Literatur und Anmerkungen

- [1] K. Nakanishi, *An Historical Perspective of Natural Products Chemistry*, In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, D. Barton, K. Nakanishi (Hrsg.), Pergamon Press, Amsterdam, **1998**.
- [2] G. Habermehl, P. Hammann, *Naturstoffchemie*, Springer Akad. Verlag, Berlin/New York/Heidelberg, **1992**.
- [3] Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053-1071.
- [4] M. B. van Hensbroek, E. Onyiorah, S. Jaffar, G. Schneider, A. Palmer, J. Frenkel, G. Enwere, S. Forck, A. Nusmeijer, S. Bennett, B. Greenwood, D. Kwiatkowski, *New Eng. J. Med.* **1996**, *335*, 69-75.
- [5] A. Fleming, *Brit. J. Exptl. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- [6] A. Adremont, D. Corpet, P. Courvalin, *Spektrum der Wissenschaft* **1997** (7), 50-57.
- [7] E. P. Abraham, *History of β -Lactam Antibiotics*. In: A. L. Demain und N. A. Solomen (Hrsg.), *Antibiotics Containing β -Lactam Structure*, Springer Verlag, New York/Heidelberg/Berlin/Tokyo **1983**, Bd. 1, 1-14.
- [8] S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305-307.
- [9] U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg/Berlin/New York, **1992**.
- [10] S. A. Carlson, T. S. Frana, R. W. Griffith, *Appl. Environment. Microbiol.* **2001**, *67*, 3763-3766.
- [11] T. B. Hyde, K. Gay, D. S. Stephens, D. J. Vugia, M. Pass, S. Johnson, N. L. Barrett, W. Schaffner, P. R. Cieslak, P. S. Maupin, E. R. Zell, J. H. Jorgensen, R. R. Facklam, C. G. Whitney, *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *286*, 1857-1862.
- [12] M. H. McCormick, W. M. Stark, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger und J. M. McGuire, *Antibiot. Annu.* **1955**, 606-611.
- [13] S. B. Levy, *Sci. Am.* **1998**, *3*, 46-53.
- [14] M. I. Crisóstomo, H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, H. de Lencastre, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 9865-9870.
- [15] D. Clemett, A. Markham, *Drugs* **2000**, *59*, 815-827.
- [16] V. Angelakou, M. Bitsori, E. Galanakis, A.-L. Ponsonby, A. Kemp, *Brit. Med. J.* **2001**, *323*, 164-168.
- [17] S. Borman, *Chem. Eng. News* **1991**, *Sept 2*, 11-18.

- [18] R.-L. Gu, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3283-3290.
- [19] J. Mann, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 417-430.
- [20] K. Foster, Annual Meeting of the British Association for Advancement of Science, Sept. **2001**, Glasgow.
- [21] T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688-691.
- [22] S. Sakuda, S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira und Y. Yamada, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 2309-2315.
- [23] H. Zähler, T. Anke, *Evolution and secondary pathways*. In: Differentiation and secondary metabolism in fungi. J. W. Bennet, E. Ciegler, M. Dekker, New York **1983**, 153-171.
- [24] J. D. Bu'Lock, *Annu. Rev. Appl. Microbiol.* **1961**, *3*, 293-342.
- [25] Ball, In: Antibiotics and other secondary metabolites, Hütter (Hrsg.), London, Academic Press, **1978**, 165-176.
- [26] M. H. M. Sharraf, *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *33*, 789-797.
- [27] C. E. Hadden, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 238-240.
- [28] M. Erhard, H. von Doehren, P. R. Jungblut, *BIOspektrum* **1998**, *4*, 42-46.
- [29] J. Fuchser, A. Zeeck, *Liebigs Ann.* **1997**, 87-95.
- [30] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth und H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671-1673.
- [31] K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik und H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 560-563.
- [32] P.F. Mühlradt, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3344-3346.
- [33] A. Qureshi, D. J. Faulkner, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8323-8325.
- [34] S. J. Wratten, D. J. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7367-7370.
- [35] P. R. Burkholder, R. M. Pfister, F. P. Leitz, *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 649-653.
- [36] H. Laatsch, H. Pudleiner, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *9*, 863-881.
- [37] G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, E. Arnold, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846-6848.
- [38] G. R. Pettit, Y. Kamano, C. L. Herald, A. A. Tuinman, F. E. Boettner, H. Kizu, J. M. Schmidt, L. Baczynskyj, K. B. Tomer, R. Bontems, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885.
- [39] S. A. Look, W. Fenical, G. K. Matsumoto, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5140-5145.
- [40] Z. D. Jiang, P. R. Jensen, W. Fenical, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 203-206.
- [41] X. C. Cheng, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 608-612.

- [42] M. Groß, *Exzentriker des Lebens*, 1. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg /Berlin/Oxford, **1997**.
- [43] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **1981**, 429.
- [44] R. Margesin, F. Schinner, *Biotechnological applications of cold-adapted organisms*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, **1999**.
- [45] M. Spindler, G. S. Dieckmann, *Spektrum der Wissenschaft* **1991**, 2, 48-57.
- [46] C. Gerday, M. Aittaleb, J. L. Arpigny, E. Baise, J.-P. Chessa, G. Garsoux, I. Petrescu, G. Feller, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1342, 119-131.
- [47] A. Galkin, L. Kulakova, H. Ashida, Y. Sawa, N. Esaki, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4014-4020.
- [48] M. K. Ray, G. S. Kumar, K. Janiyani, K. Kannan, P. Jagtap, M. K. Basu, S. Shivaji, *J. Biosci.* **1998**, 23, 423-435.
- [49] N. J. Russell, *Extremophiles* **2000**, 4, 83-90.
- [50] <http://europa.eu.int/comm/research/biotech/press-de.pdf>.
- [51] S. Ohgiya, T. Hoshino, H. Okuyama, S. Tahaka, K. Ishizaki, *Biotechnological applications of cold-adapted organisms*, R. Margesin, F. Schinner (Eds.), 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, **1999**, 17-34.
- [52] D. B. Nedwell, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, 130, 101-111.
- [53] H. Sobek, *Biotechnological applications of cold-adapted organisms*, R. Margesin, F. Schinner (Eds.), 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, **1999**, 76-85.
- [54] V. Ivanova, M. Oriol, M.-J. Montes, A. Garcia, J. Guinea, *Z. Naturforsch. C* **2001**, 56, 1-5.
- [55] D. S. Nichols, P. D. Nichols, T. A. McMeekin, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 125, 281-286.
- [56] C. Hahm, M. P. Singh, J. E. Janso, J. Grimwade, A. Leonard, W. Maiese, B. J. Baker, 10th International Symposium on Marine Natural Products, Okinawa, Japan, **2001**.
- [57] J.-M. Meyer, A. Stintzi, V. Coulanges, S. Shivaji, J. A. Voss, K. Taraz, H. Budzikiewicz, *Microbiol.* **1998**, 144, 3119-3126.
- [58] J. Voss, K. Taraz, H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch. C* **1999**, 54, 156-162.
- [59] J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.), *Römpp Chemie Lexikon*, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **1990**.
- [60] E. Helmke, Projektabschlußbericht, **2001**.

- [61] H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*, Chemical Concepts, Weinheim (1999).
- [62] H. Shigemori, M. Tenma, K. Shimazaki, J. Kobayashi, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 696-698.
- [63] K. Ienaga, K. Nakamura, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1285-1286.
- [64] B. Böhlendorf, E. Forche, N. Bedorf, K. Gerth, H. Irschik, R. Jansen, B. Kunze, W. Trovitzsch-Kienast, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, *49* – 53.
- [65] O. S. Kwon, S. H. Park, B. S. Yun, Y. R. Pyun, C. J. Kim, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 179-181.
- [66] E. Helmke, persönliche Mitteilung.
- [67] M. Fukutake, M. Takahashi, K. Ishida, H. Kawamura, T. Sugimura, and K. Wakabayashi, *Food Chem. Toxicol.*, **1996**, *34*, 457-461.
- [68] M.C. Pagliacci, M. Smacchia, G. Migliorati, F. Grignani, C. Riccardi, I. Nicoletti, *Eur. J. Cancer* **1994**, *30A*, 1675-1679.
- [69] V. E. Steele, G. J. Kelloff, M. A. Pereira, C. C. Sigman, *J. Nutr.* **1995**, *125*, 713-716.
- [70] M. Metzler, S. Vieths, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1998**, *46*, 319-320.
- [71] T. T. Y. Wang, N. Sathyamoorthy, J. M. Phang, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 271-275.
- [72] H. Wei, R. Bowen, Q. Cai, S. Barnes, Y. Wang, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, *208*, 124-130.
- [73] <http://www.sabinsa.com>.
- [74] J. H. Cardellina, D. Nigh, B. C. Van Wagenen, *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1065-1067.
- [75] A. C. Stierle, J. H. Cardellina II, G. A. Strobel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 8008-8011.
- [76] J. K. Porter, C. W. Bacon, J. D. Robbins, D. S. Himmelsbach, H. C. Higman, *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 88-93.
- [77] G. Habermehl, P. Hammann, *Naturstoffchemie*, 1. Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, **1992**.
- [78] E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, 7. Auflage, Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., **1996**
- [79] M. Barbero, S. Cadamuro, I. Degani, F. Iacopo, R. Fochi, A. Gatti, V. Regondi, *Synthesis* **1988**, *4*, 300-302.
- [80] F. Petersen, H. Zähler, J. W. Metzger, S. Freund, R.-P. Hummel, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1126-1138.
- [81] <http://www.mddepot.com>.
- [82] Sicherheitsdatenblatt, Univ. Würzburg, http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/misc/betr_ein/uw-c501.html.

- [83] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage, Heidelberg/Berlin/New York, Spektrum Verlag, **1996**.
- [84] AWMF: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 025/006, **1999**.
- [85] *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Chapman & Hall Chemical Database, **1994**.
- [86] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
- [87] M. Speitling, Dissertation, Universität Göttingen, **1998**.
- [88] G. Chen, G.-Y.-S. Wang, X. Li, B. Waters, J. Davies, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1145-1153.
- [89] Y. Yamada, K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto, H. Okada, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 496-504.
- [90] S. Sakuda, S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira, Y. Yamada, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1993**, 2309-2315.
- [91] G. D. Fate, C. P. Brenner, S. H. Grode, T. J. Gilbertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11363-11368.
- [92] Y. Egawa, K. Umino, Y. Tamura, M. Shimizu, K. Kaneko, M. Sakurazawa, S. Awataguchi, T. Okuda, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 12-18.
- [93] E. Cundliffe, J. Thompson, *J. Gen. Microbiol.* **1981**, *126*, 185-192.
- [94] F. Bracher, D. Hildebrand, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 1315-1319.
- [95] M. Shaaban, persönliche Mitteilung, Universität Göttingen, **2001**.
- [96] R. P. Maskey, Dissertation, Universität Göttingen, **2001**.
- [97] R. Asolkar, Institut für Organische Chemie, Tammannstr. 2, 37077 Göttingen.
- [98] R. Asolkar, persönliche Mitteilung, Universität Göttingen, **2001**.
- [99] Advanced Chemistry Development Inc., Toronto *ACD/C-NMR*, Version 3.00, **1998**.
- [100] J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103-137.
- [101] USP 4,224,314, **1980**.
- [102] W. D. Celmer, G. N. Chmurny, C. E. Moppett, R. S. Ware, P. C. Watts, E. B. Whipple, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4203-4209.
- [103] N. Abe, N. Enoki, Y. Nakakita, H. Uchida, T. Nakamura, M. Munekata, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1678-1686.

[104] Unter Acetonsignal.

[105] I. Kampen, persönliche Mitteilung, TU Braunschweig, **2001**.

[106] α bezeichnet die an C-9 gebundene und β die an C-1 gebundene Hälfte des Peptidringes.

[107] $9' = \text{CH}_2$ an C-9.

Danksagung

Für die Durchführung der spektroskopischen Messungen bedanke ich mich bei Frau C. ..., Frau A. Godawa, Frau C. Zolke, Herrn U. Leonhardt und Herrn Dipl.-Chem. R. Machinek (NMR) sowie bei Frau G. Udvarnoki, Herrn Dr. G. Remberg und Herrn Dr. H. Frauendorf (Massenspektrometrie).

Für die Bereitstellung der Bakterienstämme danke ich Frau Dr. E. Helmke (Psychrophile und marine Streptomycceten), der Firma bioLeads (terrestrische Streptomycceten), Frau Dr. I. Wagner-Döbler (Nordseebakterium) und Frau Lackner (Testkeime).

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Laatsch bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die vielen fruchtbaren Diskussionen. Weiterhin danke ich Frau Dipl.-Geol. F. Lissy für die Unterstützung bei den mikrobiologischen Arbeiten und für das sorgfältige Korrekturlesen. Bei Frau K. Vogel, Herrn D. Fechner Herrn Dipl.-Chem. P. Grzeganeck und Herrn Dr. T. Schrapel bedanke ich mich für die technische Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. F. Huth und Dr. R. P. Maskey für die Analytik und Strukturaufklärung betreffende Anregungen.

Schließlich danke ich noch meiner Freundin für ihre moralische Unterstützung und meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Am 22.02.1970 wurde ich, Dirk Schröder, als Sohn von Aloisius Heinrich Schröder und seiner Ehefrau Roswitha Schröder, geb. Bolde, in Uelzen geboren.

Von 1976 bis 1980 besuchte ich die Grundschule Grätzelstrasse und anschließend von 1980 bis 1982 die Orientierungsstufe der Bonifatiuschule in Göttingen. Danach wechselte ich zum Otto-Hahn-Gymnasium, wo ich von 1982 bis zur Reifeprüfung im Juni 1989 blieb.

Von Juli 1989 bis September 1990 leistete ich meinen Zivildienst im Universitätsklinikum Göttingen.

Zum Wintersemester 1990 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität in Göttingen im Studienfach Chemie, in dem ich am 09.02.1995 die Diplomvorprüfung bestand. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Laatsch fertigte ich von Dezember 1996 bis September 1997 meine Diplomarbeit mit dem Thema „Sekundärmetabolite mariner Streptomyceten – Einsatz von chemischem Screening und dem *Artemia-salina*-Toxizitätstest“ an und bestand meine Diplomprüfung am 30.10.1997.

Von Dezember 1997 bis Dezember 2001 fertigte ich die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. H. Laatsch im Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität in Göttingen an.

Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft.