

**Metabolite aus marinen und  
terrestrischen Bakterien und Pilzen  
sowie  
Untersuchungen von  
Invertebraten der Tiefsee**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Andrea Schulze**

aus Dessau

Göttingen 2003

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. H. Lackner

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 2003

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Zeeck in der Zeit von Mai 1999 bis März 2003 am Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Aufgabenstellung sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Wenn Du ein Schiff bauen willst, dann rufe nicht die Menschen zusammen,  
um Holz zu sammeln, Aufgaben zu verteilen und Arbeit einzuteilen,  
sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem Meer.

Antoine de Saint-Exupéry

Meinen Eltern

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>A.</b> | <b>THEORETISCHER TEIL</b>  | <b>1</b>  |
| <b>I</b>  | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1.        | <b>Bedeutung der Naturstoffchemie</b>  | <b>1</b>  |
| 2.        | <b>Marine Naturstoffforschung</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1.      | Naturstoffe aus marinen Invertebraten  | 3         |
| 2.1.1.    | Die Bryostatine  | 3         |
| 2.1.2.    | Die Conotoxine   | 5         |
| 2.2.      | Naturstoffe aus Schwämmen  | 6         |
| 2.2.1.    | Der Schwamm <i>Theonella swinhoei</i>  | 6         |
| 2.2.2.    | Avarol ( <b>4</b> )  | 9         |
| 2.3.      | Naturstoffe aus marinen Mikroorganismen  | 10        |
| 2.3.1.    | Maitotoxin ( <b>5</b> )  | 10        |
| 2.3.2.    | <i>Salinospora</i> sp.   | 11        |
| 3.        | <b>Aufgabenstellung</b>  | <b>12</b> |
| <b>II</b> | <b>STREPTOMYCETEN</b>  | <b>14</b> |
| 1.        | <b>Screening von Streptomycceten</b>   | <b>14</b> |
| 1.1.      | Screeningmethoden  | 14        |
| 1.2.      | Chemisches Screening der bearbeiteten Stämme                                     | 15        |
| 1.3.      | Herkunft und Stammauswahl  | 16        |
| 2.        | <b>Streptomycceten mit auffälligem Metabolitenmuster</b>                         | <b>19</b> |
| 2.1.      | Der Stamm Ägy-rot  | 19        |
| 2.1.1.    | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite                            | 19        |
| 2.1.2.    | Charakterisierung der gebildeten Hydroxyanthrachinone                            | 19        |
| 2.2.      | Der Stamm Z9   | 22        |
| 2.2.1.    | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite                            | 22        |
| 2.2.2.    | Charakterisierung der gebildeten Metabolite                                      | 23        |
| 2.3.      | Der Stamm Z12  | 26        |
| 2.3.1.    | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite                            | 26        |
| 2.3.2.    | Charakterisierung der gebildeten Metabolite                                      | 27        |
| 2.4.      | Der Stamm Z3   | 29        |
| 2.4.1.    | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite                            | 29        |
| 2.4.2.    | Charakterisierung der gebildeten Metabolite                                      | 30        |
| 2.5.      | Der Stamm Z6   | 31        |
| 2.5.1.    | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite                            | 31        |
| 2.5.2.    | Charakterisierung des gebildeten Metaboliten <b>19</b> im Vergleich zu <b>18</b> | 32        |
| 2.5.3.    | Derivatisierungen von <b>19</b>  | 35        |
| 2.6.      | Der Stamm Ku2  | 38        |
| 2.6.1.    | Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten                           | 38        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.6.2.     | Charakterisierung des Alkaloids TM-64 ( <u>24</u> )       | 39        |
| <b>3.</b>  | <b>Pyridomycinol (<u>25</u>)</b>                          | <b>40</b> |
| 3.1.       | Stammbeschreibung und Isolierung                          | 40        |
| 3.2.       | Strukturaufklärung von <u>25</u>                          | 40        |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion und Ausblick</b>                            | <b>41</b> |
| <br>       |   |           |
| <b>III</b> | <b>PILZE</b>  | <b>42</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Screening von Pilzen</b>                               | <b>42</b> |
| 1.1.       | Screeningmethoden   | 42        |
| 1.2.       | Chemisches Screening der bearbeiteten Stämme              | 42        |
| 1.3.       | Herkunft und Stammauswahl                                 | 43        |
| <b>2.</b>  | <b>Pilze mit auffälligem Metabolitenmuster</b>            | <b>44</b> |
| 2.1.       | Der Stamm A5  | 44        |
| 2.1.1.     | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite     | 44        |
| 2.1.2.     | Charakterisierung der gebildeten Metabolite               | 45        |
| 2.2.       | Der Stamm A2  | 48        |
| 2.2.1.     | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite     | 48        |
| 2.2.2.     | Charakterisierung der gebildeten Metabolite               | 49        |
| 2.3.       | Der Stamm MH13  | 50        |
| 2.3.1.     | Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite     | 50        |
| 2.3.2.     | Charakterisierung der gebildeten Metabolite               | 52        |
| 2.4.       | Der Stamm MH11  | 55        |
| 2.4.1.     | Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten    | 55        |
| 2.4.2.     | Charakterisierung des gebildeten Metaboliten              | 55        |
| 2.5.       | Der Stamm A4  | 56        |
| 2.5.1.     | Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten    | 56        |
| 2.5.2.     | Charakterisierung des gebildeten Metaboliten              | 56        |
| <b>3.</b>  | <b>Diskussion und Ausblick</b>                            | <b>57</b> |
| <br>       |   |           |
| <b>IV</b>  | <b>TIEFSEEMUSCHELN</b>                                    | <b>58</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Projektbeschreibung</b>                                | <b>58</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Erstellen der Extrakte und Aufarbeitung der Proben</b> | <b>58</b> |
| 2.1.       | <i>Solemya</i> sp.  | 59        |
| 2.2.       | <i>Acharax</i> sp.  | 60        |
| 2.3.       | <i>Calyptogena</i> sp.                                    | 61        |
| <b>3.</b>  | <b>Diskussion und Ausblick</b>                            | <b>61</b> |
| <br>       |   |           |
| <b>V</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>                     | <b>63</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Streptomyceten</b>                                     | <b>63</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Pilze</b>  | <b>65</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Tiefseemuscheeln</b>                                   | <b>66</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>B.</b>  | <b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>            | <b>67</b> |
| <b>I</b>   | <b>ALLGEMEINES</b>                     | <b>67</b> |
| 1.         | Instrumentelle Analytik                | 67        |
| 2.         | Chromatographische Methoden            | 68        |
| 3.         | Mikrobiologische Methoden              | 69        |
| 4.         | Biologische Tests                      | 71        |
| <b>II</b>  | <b>SCREENING VON STREPTOMYCETEN</b>    | <b>72</b> |
| 1.         | Stammhaltung und Langzeitkultivierung  | 72        |
| 2.         | Durchführung des chemischen Screenings | 72        |
| 3.         | Aufarbeitung von Fermentationsansätzen | 73        |
| 4.         | Metabolite aus Ägy-rot                 | 73        |
| 5.         | Metabolite aus Z9                      | 75        |
| 6.         | Metabolite aus Z12                     | 77        |
| 7.         | Metabolite aus Z3                      | 79        |
| 8.         | Metabolite aus Z6                      | 81        |
| 8.1.       | Derivatisierung von <u>19</u>          | 81        |
| 9.         | Metabolite aus Ku2                     | 83        |
| 10.        | Pyridomycinol ( <u>25</u> )            | 84        |
| <b>III</b> | <b>SCREENING VON PILZEN</b>            | <b>85</b> |
| 1.         | Stammhaltung und Langzeitkultivierung  | 85        |
| 2.         | Durchführung des chemischen Screenings | 85        |
| 3.         | Aufarbeitung von Fermentationsansätzen | 86        |
| 4.         | Metabolite aus A5                      | 86        |
| 5.         | Metabolite aus A2                      | 88        |
| 6.         | Metabolite aus MH13                    | 90        |
| 7.         | Metabolite aus MH11                    | 93        |
| 8.         | Metabolite aus A4                      | 95        |
| <b>IV</b>  | <b>SCREENING DER TIEFSEEMUSCHELN</b>   | <b>96</b> |
| 1.         | Metabolite aus <i>Acharax</i> sp.      | 96        |
| 2.         | Metabolite aus <i>Calyptogena</i> sp.  | 96        |
| <b>C.</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>            | <b>97</b> |

## A. Theoretischer Teil

### I Einleitung

#### 1. Bedeutung der Naturstoffchemie

Die ersten bekannten Aufzeichnungen zur Verwendung von Pflanzen als Heilmittel stammen aus der Zeit ca. 2600 vor Christus. In Mesopotamien wurden hunderte Tontafeln mit der Beschreibung von über 1000 Substanzen gefunden, welche hauptsächlich als Öle angewandt wurden, wie z.B. Zedernöl oder Mohnsaft. Auch in Ägypten oder China existieren Schriften von 1500 bzw. 1100 vor Christus über die medizinische Nutzung pflanzlicher oder auch tierischer Bestandteile.<sup>1</sup>

Bis heute haben natürliche Quellen für die Entwicklung von Medikamenten nicht an Bedeutung verloren. Im Gegenteil, durch die Entwicklung neuer Methoden zur Aufreinigung, Strukturaufklärung und Testung von Naturstoffen sowie durch weitreichende Fortschritte in der Synthese findet die Naturstoffchemie ein weites Feld in Forschung und Anwendung. Dabei werden heute nicht nur Pflanzen und Tiere, sondern vielfach auch Pilze und Bakterien als Lieferanten neuer Substanzen mit biologischer Aktivität untersucht.<sup>2,3,4</sup> So stammt z.B. das Antibiotika Bleomycin<sup>5</sup> aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* und der Lipidsenker Lovastatin<sup>6</sup> aus dem Pilz *Aspergillus terreus*.

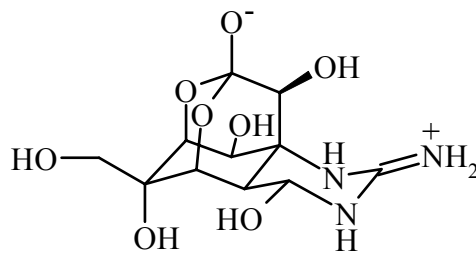
Bei der Suche nach neuen Naturstoffen stößt man immer häufiger auf bekannte Verbindungen.<sup>7</sup> Um dieses Problem zu umgehen, werden verstärkt Organismen aus bisher wenig untersuchten Quellen bearbeitet. Dazu gehören beispielsweise Extremophile aus der Wüste, heißen Quellen oder der Antarktis.<sup>8</sup> Aber auch marine Organismen finden verstärkt Aufmerksamkeit. So hat das Land Niedersachsen einen Forschungsschwerpunkt „Meeresbiotechnologie“ ins Leben gerufen, der ab dem 1. Januar 1998 für fünf Jahre aus Mitteln der VW-Stiftung gefördert wurde.<sup>9</sup>



## 2. Marine Naturstoffforschung

Die Erforschung des marinen Lebensraums als Quelle interessanter Naturstoffe fand ihren ersten Höhepunkt in den 70er Jahren.<sup>1,10</sup> Ein Pionier auf diesem neuen Arbeitsgebiet war P. J. Scheuer, dessen erste "marine" Veröffentlichung über Toxine aus Fischen<sup>11</sup> aus dem Jahr stammt. Die Fischtoxine zählen zweifellos zu den ersten untersuchten marinen Naturstoffen. Eine der letzten Publikationen von P. J. Scheuer<sup>12</sup> aus dem Jahr 2001 berichtet über neue Sterole, die Gellusterole A bis D aus dem Schwamm der *Gellius* sp., die gegen verschiedene Krebszelllinien aktiv sind.

Im Zentrum des ersten Artikels von P. J. Scheuer aus dem Jahr 1964 steht Tetrodotoxin (**1**), welches aus den Ovarien von Puffer-, Koffer- oder Kugelfischen isoliert wird und 1964<sup>13</sup> in seiner Struktur aufgeklärt werden konnte.



**1**

Außer in Fischen wurde Tetrodotoxin (**1**) später auch in verschiedenen Salamanderarten, Fröschen, australischen Tintenfischen und in der japanischen Elfenbeinschnecke gefunden.<sup>14</sup> Das legt den Schluss nahe, dass **1** nicht von den Tieren selbst, sondern von Symbionten produziert wird. 1986/87 konnte aus Kulturen der Spezies *Pseudomonas*<sup>15</sup>, *Alteromonas*<sup>16</sup> und *Vibrio*<sup>17</sup> Tetrodotoxin (**1**) isoliert werden, und von der Haut des Pufferfisches *Fugu poecilonotus* wurde ein Bakterium des Typs *Pseudomonas*<sup>15</sup> isoliert.

Damit wird ein Problem der marinen Naturstoffforschung deutlich. Im Allgemeinen werden Makroorganismen wie Schwämme, Tunikate oder Korallen untersucht, ohne dass eine genaue Aussage getroffen werden kann, ob die isolierte Substanz wirklich von dem Makroorganismus oder von assoziierten bzw. symbiontischen Mikroorganismen produziert wird. Diese sind meist schwer

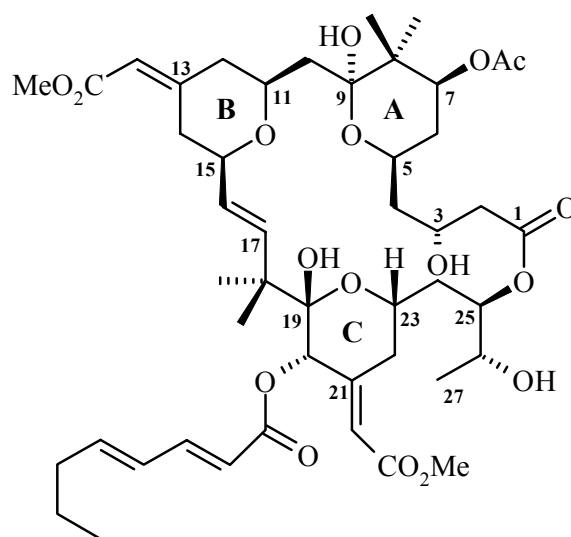
zu kultivieren, so dass genaue Aussagen nur mit Hilfe der Gentechnik möglich werden. Bei den kultivierbaren Mikroorganismen stellt sich dagegen oft die Frage, ob es sich um rein marine oder ins Wasser gelangte terrestrische Bakterien oder Pilze handelt.<sup>18</sup>

Im Folgenden soll genauer auf einige Beispiele mariner Naturstoffe eingegangen werden, wobei eine Einteilung in Substanzen aus Invertebraten, Schwämmen und Mikroorganismen erfolgt.

## 2.1. Naturstoffe aus marinen Invertebraten

### 2.1.1. Die Bryostatine

Seit 1968 ist die antineoplastische Wirkung von Komponenten der Bryozoe *Bugula neritina* bekannt. Das erste Polyketid Bryostatin 1 (**2**) wurde 1981 von der Arbeitsgruppe Pettit isoliert.<sup>19</sup> Bis heute sind 20 Bryostatine aus den Invertebraten *Bugula neritina* und *Amathia convulata* bekannt.<sup>20</sup> Alle Bryostatine bestehen aus einem 20-gliedrigen Macrolacton, in welches drei Pyranringe integriert sind. An C-8 und C-18 befinden sich jeweils geminale Dimethylgruppen, und vom A- und C-Ring gehen immer zwei C<sub>4</sub>-Seitenketten aus, die über eine Lactonbindung verknüpft sind. Am B- und C-Ring verfügen die Bryostatine über exocyclische Methylenoate. Die Hauptunterschiede sind in den Substituenten an C-7 und C-20 zu sehen. Die Hydroxygruppe an C-7 von **2** ist bei Bryostatin 3 z.B. acetyliert und die Seitenkette an C-20 fehlt bei den Bryostatinen 10, 11, 13, 16, 17 und 18.



Bryostatin 1 (**2**)

Bryostatin 1 (**2**) zeigt eine bemerkenswerte *in vitro* und *in vivo* Anti-Krebs-Aktivität u.a. gegen Leukämie, Eierstock- und Brustkrebs. Es wirkt dabei immunstimulierend, blutbildend, antineoplastisch und inhibiert das Wachstum von Tumorzellen. Jedoch existieren auch Nebenwirkungen, wie z.B. Muskelschmerz, Anämie und Appetitlosigkeit. Zur Zeit befindet sich **2** in mehr als 43 klinischen Studien der Phase 1 und 2. Bisher ist eine völlige Heilung einer an Nicht-Hodgkin-Lymphom im vierten Stadium erkrankten Patientin bekannt. Die Behandlung umfasste acht vierzehntägige Zyklen, wobei jeweils über 72 h eine intravenöse Infusion mit einer Dosis von 120 mg/m<sup>3</sup> erfolgte. In vielen klinischen Studien wird **2** jedoch in Verbindung mit anderen Krebs-Therapeutika, wie z.B. Vincristin oder Cisplatin untersucht.<sup>21</sup>

Erste Untersuchungen zur Biosynthese begannen 1996. Dabei ist es mittels radiomarkierten Fütterungsversuchen gelungen, Acetat, S-Adenosylmethionin (SAM) und Glycerin als Hauptbausteine von **2** zu bestimmen. Propionat, n-Butyrat, n-Succinat und Isobutytrat konnten als Komponenten ausgeschlossen werden. Die geminalen Dimethylgruppen stammen aus SAM-Methylierungen von eingebauten Acetateinheiten, wie es auch bei der Biosynthese von Lankacidin und Aplasmomycin der Fall ist. Durch Addition von Acetaten an die Polyketidkette und anschließende Dehydratation sind wahrscheinlich die exocyclischen Olefine entstanden.<sup>22</sup>

Der für Bakterien typische Polyketid-Biosyntheseweg läßt den Schluss zu, dass Bryostatin 1 (**2**) von Symbionten der Bryozoe gebildet wird. Die Arbeitsgruppe um M. G. Haygood untersucht derzeit vor allem die Larven von *Bugula neritina* auf vorhandene Symbionten. Dabei enthalten alle Bryostatin-Produzenten das unkultivierbare Gamma-Proteobakterium "*Candidatus Endobugula sertula*". Das für die Biosynthese von **2** unerläßliche Keto-Synthase-Gen wurde im Genom des Symbionten *E. sertula* gefunden. Damit könnten in Zukunft Bryostatin-Gene in heterologen Wirtsbakterien expremiert werden und somit eine Produktion von **2** in großen Mengen ermöglichen.<sup>23,24</sup>

Das Problem der Mengenbeschaffung für eine breite therapeutische Anwendung von Bryostatin 1 (**2**) ist den Forschern seit langem bewusst. Aus diesem Grund finden umfangreiche Forschungen zur Kultivierbarkeit der Bryozoe *B. neritina* statt. Erste Erfolge erzielte die Arbeitsgruppe D. Mendola

mit der Kultivierung von Larven in 5000 L-Seewassertanks. Jedoch war die Ausbeute an **2** wesentlich geringer als aus natürlich gewachsenen Bryozoen. Die Umstellung auf "in-sea" Aquakulturen brachte den gewünschten Erfolg. Die so kultivierten Invertebraten erzeugen annähernd soviel **2** wie die unter natürlichen Bedingungen gewachsenen. Damit ist es möglich, die für die Pharmaindustrie benötigte Menge zu produzieren und Bryostatin 1 (**2**) als Krebsmedikament in den Handel zu bringen.<sup>25</sup>

### 2.1.2. Die Conotoxine

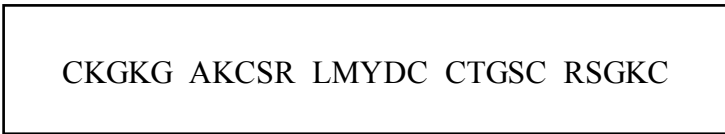
Marine Schnecken der Gattung *Conus* (Kegelschnecken) haben eine ungewöhnliche biochemische Strategie zur Jagd auf Beutetiere entwickelt. Sie beißen mit einem hohlen, harpunenartigen Zahn zu, der gleich zwei Funktionen erfüllt. Zum einen wird die Beute mechanisch festgehalten, zum anderen wird ein Giftcocktail injiziert. Es gibt ca. 500 verschiedene Kegelschnecken, deren Gift jeweils aus 40 bis 200 cysteinreichen Peptiden mit Sequenzen von 10 bis 30 Aminosäuren besteht.<sup>26</sup>

Die Conotoxine sind direkte Translationsprodukte von Genen, und ihre Aminosäuresequenz ist direkt durch die Nukleinsäuresequenz kodiert. Die Anzahl der Peptide und die große Variation an Sequenzen birgt ein hohes pharmakologisches Potential. Sie werden derzeit in hunderten Forschungslaboren untersucht. Dabei liegen die Schwerpunkte auf unterschiedlichsten physiologischen und pharmakologischen Wirkungen der Conotoxine auf das Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten durch die spezifische Bindung an Oberflächen von Rezeptoren und Ionenkanälen.<sup>27</sup>

Es werden auch immer wieder neue Wirkorte der Peptide bestimmt. Das  $\kappa$ -Conotoxin PVIIA, bestehend aus 27 Aminosäuren, ist das erste, welches den *Shaker*-Kaliumkanal blockiert. Es stammt aus der ostpazifischen, fischjagenden Kegelschnecke *Conus purpurascens* und ist ein Schlüssel bei der schnellen Immobilisation des Beutetieres.<sup>28,29</sup>

Das aus 25 Aminosäuren bestehende Conopeptid  $\omega$ -Conotoxin MVIIA (siehe Abbildung 01) aus *Conus magus* befindet sich derzeit in der Klinischen Phase III für die Behandlung von schweren Schmerzzuständen. Es wirkt, indem es

N-typ-Calciumkanäle in den Schmerzfasern der Wirbelsäule blockiert. Dies ist ein erfolversprechendes Beispiel für die Anwendung der Conotoxine.<sup>30</sup>



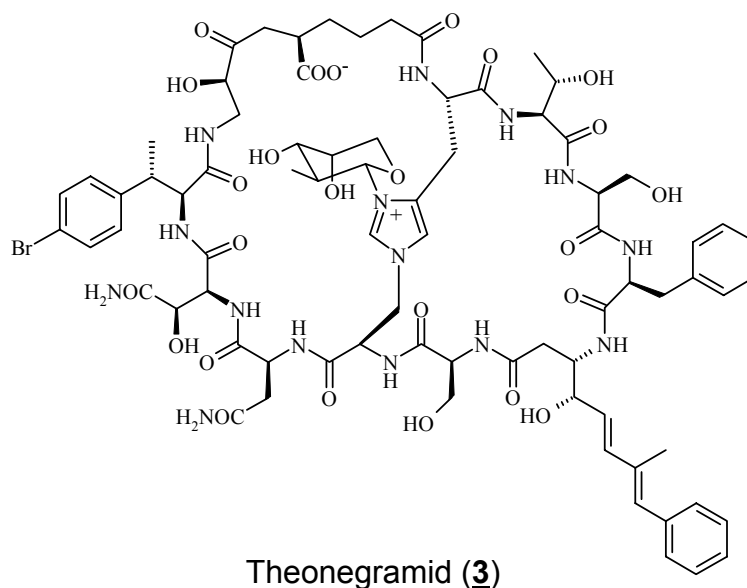
**Abbildung 01 Primärstruktur von  $\omega$ -Conotoxin MVIIA**

## 2.2. Naturstoffe aus Schwämmen

### 2.2.1. Der Schwamm *Theonella swinhoei*

Erste Metabolite des Schwammes *Theonella swinhoei* sind seit den 80er Jahren bekannt. Auch heute werden noch neue Sekundärstoffe mit interessanter biologischer Aktivität aus diesem Invertebraten isoliert.

Peptide bilden hier die größte Substanzklasse. 1994 wurde die Struktur von Theonegramid (**3**)<sup>31</sup>, einem antifungisch wirkenden Glykopeptid von D. J. Faulkner veröffentlicht. **3** ist ein bicyclisches Dodecapeptid. Es enthält unter anderem D-Arabinose und die ungewöhnlichen Aminosäuren  $\beta$ -Hydroxyasparagin, Isoserin,  $\alpha$ -Amino adipinsäure, 4'-Bromo-3-methylphenylalanin und 3-Amino-4-hydroxy-6-methyl-8-phenylocta-5,7-dienoinsäure. Der hier bearbeitete Schwamm wurde an der Küste der Philippinen gesammelt.

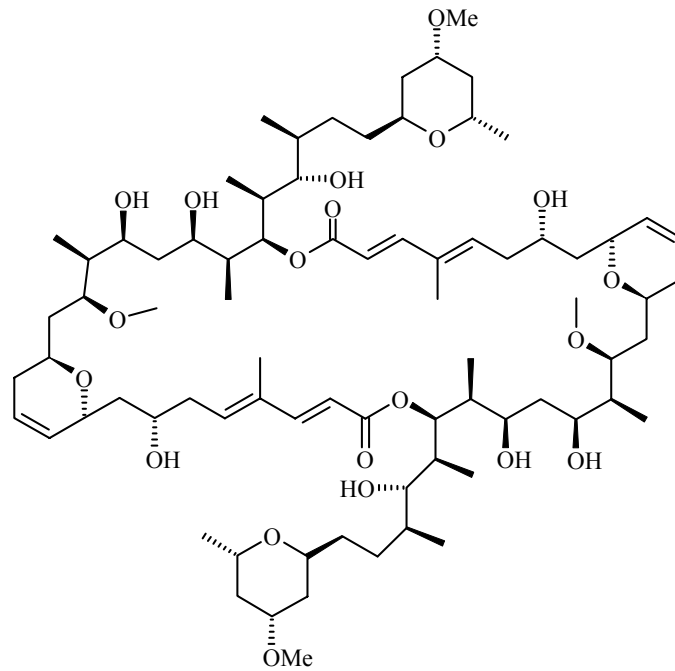


Nicht auf den Philippinen, sondern vor der Küste Okinawas wurde der Schwamm gesammelt, aus dem erstmals Theonellapeptolid IId<sup>32</sup>, ein Tridecapeptidlacton, isoliert wurde. Dieses Peptid verhindert die Befruchtung der Seegurke *Hemicentotus pulcherrimus*, hat jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum von befruchteten Eiern. Ebenfalls in Japan, jedoch vor der Küste der Insel Hachijo-jima, 300 km südlich von Tokyo, wurde ein Schwamm gefunden, der sechs neue lineare Pentapeptide, die Pseudotheonamide<sup>33</sup>, produziert. Sie wirken als Serin-Protease-Inhibitoren.

Ein indonesischer Schwamm der Gattung *Theonella swinhoei* enthielt die drei cyclischen Peptide Barangamid B, C und D<sup>34</sup>. Sie zeigen eine leichte immunsuppressive Aktivität. In Indonesien und Papua Neu Guinea wurden Schwämme untersucht, die das antifungisch wirkende Cyclodepsipeptid Cyclolithistid A<sup>35</sup> enthielten.

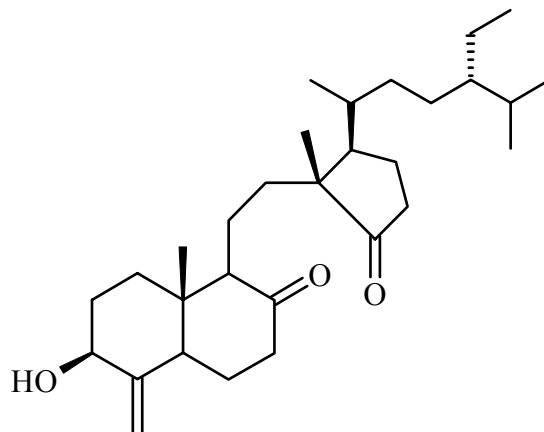
Ebenfalls vor der Küste Papua Neu Guinas wurde das Exemplar gesammelt, welches die Papuamide A - D<sup>36</sup> enthält. Diese cyclischen Depsipeptide wirken als HIV-Inhibitoren. Auf der gleichen Forschungsfahrt wurde auch der Schwamm *Theonella mirabilis* gesammelt, aus dem ebenfalls die Papuamide A – D isoliert werden konnten.

*Theonella swinhoei* produziert neben Peptiden auch Makrolide. Die cytotoxisch und antifungisch wirkenden Swinholide<sup>37,38,39</sup> stammen aus Schwämmen, die vor der Küste Okinawas gesammelt wurden. Eine monomere Carbonsäure von Swinholid A, Pre-Swinholid A, entstammt einem in Papua Neu Guinea gesammelten Schwamm.



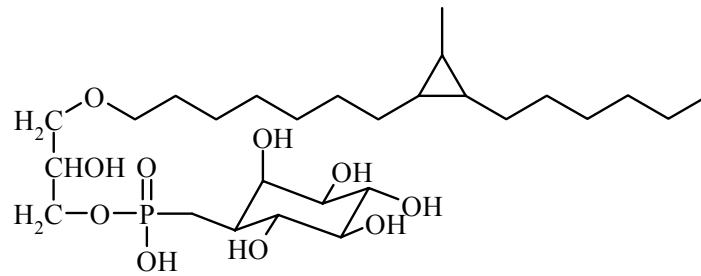
Swinholid A

Auch Steroide gehören zur großen Substanzpalette von *Theonella swinhoei*. Die Swinhosterole A – C, sowie Theonellasteron, Conicasteron und Bistheonellasteron entstammen Schwämmen aus Okinawa.<sup>40,41</sup> Ebenso lassen sich Steroide in den Organismen der Philippinischen Küste nachweisen. 7 $\alpha$ -Hydroxytheonellasterol<sup>42</sup> zeigt dabei in Kombination mit Bistheonellid A moderate cytotoxische Aktivität.



Swinhosterol A

Von einer Sammlung bei der Insel Hachijo-jima stammen zwei neue antimikrobiell wirksame Lysoplasmanylinositate. Inositate sind unter anderem als Wachstumsfaktoren bekannt.<sup>43</sup>



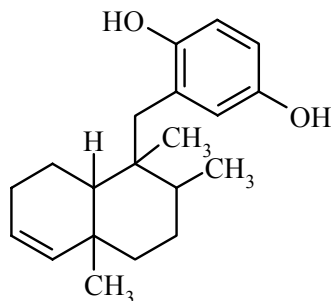
Lysoplasmanylinositol

Die Vielfalt und die Art der Substanzen aus *Theonella swinhoei* ist auffallend. Dabei wurden aus Schwämmen unterschiedlicher Standorte die gleichen oder ähnliche Metabolite isoliert. Es liegt also der Schluss nahe, dass symbiotische Mikroorganismen die wahren Produzenten sind. Diese Hypothese lässt sich jedoch nur schwer beweisen, da Symbionten im allgemeinen als kaum kultivierbar gelten.

#### 2.2.2. Avarol (**4**)

1974 wurde erstmals das Sesquiterpenhydrochinon Avarol (**4**)<sup>44</sup> aus dem Schwamm *Dysidea avara* beschrieben. **4** weist eine starke cytotoxische Aktivität<sup>45</sup> gegen Brustkrebszellen auf.

Jetzt ist der Arbeitsgruppe W. E. Müller der Nachweis gelungen, dass **4** auch vom symbiontenfreien, unter Laborbedingungen gezüchteten Schwammzellen produziert wird.<sup>46</sup> Damit wurde die Hypothese bestätigt, dass Schwämme auch ohne assoziierte oder symbiotische Bakterien in der Lage sind, Naturstoffe zu bilden.

Avarol (**4**)



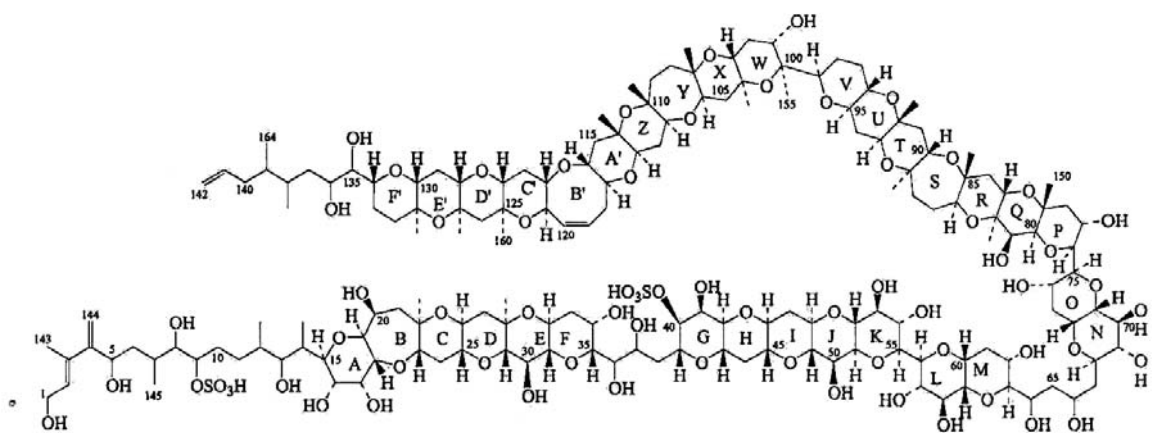
## 2.3. Naturstoffe aus marinen Mikroorganismen

### 2.3.1. Maitotoxin (**5**)

Maitotoxin (**5**) ist das stärkste, bisher bekannte, nichtproteinogene Gift. Die LD<sub>50</sub> bei einer intraperitonealen Injektion<sup>47</sup> beträgt 50 ng pro Kilogramm Maus. Das bedeutet, dass 1 mg **5** eine Millionen Mäuse töten könnte. **5** weist jedoch noch verschiedene pharmakologische Aktivitäten auf.

Maitotoxin (**5**) wurde erstmals als Bestandteil des Fischvergiftung verursachenden Gifts Cigatera<sup>48</sup> entdeckt. 1977 identifizierte T. Yasumoto<sup>49</sup> einzellige Mikroalgen, den Dinoflagellaten *Gambierdiscus toxicus*, als Verursacher der Vergiftungserscheinungen. **5** wurde aus dem Doktorfisch *Ctenochaetus striatus* isoliert und erhielt seinen Namen nach der Tahitianischen Bezeichnung "Maito" für diesen Fisch.<sup>48</sup> Später produzierte *Gambierdiscus toxicus* das Toxin auch unter Laborbedingungen.<sup>50</sup> Um eine ausreichend große Menge von 10 – 20 mg für die Strukturaufklärung zu erhalten, mußten insgesamt 4000 L Kulturlösung bereitgestellt werden.<sup>50</sup>

Die Strukturaufklärung von Maitotoxin (**5**) gelang erst mit Hilfe neuer Methoden der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. **5** besitzt ein Molekulargewicht von 3422 Da mit der Summenformel C<sub>164</sub>H<sub>256</sub>O<sub>68</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> als Dinatriumsalz und gehört somit zu den größten bekannten Sekundärmetaboliten. Maitotoxin (**5**) enthält eine C<sub>142</sub>-Kette, die 32 Etherringe, 28 Hydroxygruppen sowie zwei Sulfatester enthält.<sup>51</sup>



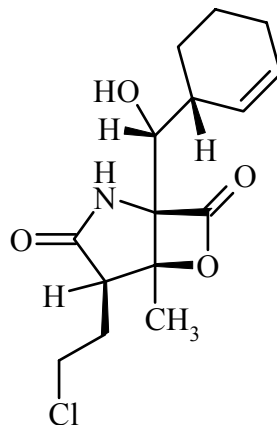
Maitotoxin (**5**)

Maitotoxin (**5**) weist außerdem eine sehr hohe Cytotoxizität, Ichthyotoxizität und hemolytische Aktivität auf. Es stimuliert den Calciumfluss in verschiedene Zellen und ist somit ein Calciumkanal-Agonist.<sup>52</sup>

### 2.3.2. *Salinospora* sp.

Die Arbeitsgruppe W. Fenical<sup>53</sup> erbrachte im Jahr 2000 mit Hilfe der Sequenzierung von 16S rRNA den Beweis für die Existenz von obligat marinen Actinomyceten. 2500 Stämme wurden inzwischen isoliert und konnten der neuen Gattung, genannt *Salinospora*, durch zuvor nicht beschriebene 16S rRNA-Gensequenzen zugeordnet werden. Die Stämme wurden aus dem Sediment von tropischen und subtropischen Ozeanen aus mehr als 1000 m Tiefe isoliert.<sup>54</sup> Es gelang, die so erhaltenen Stämme auf marinen Nährmedien zu kultivieren. Die Extrakte zeigten cytotoxische und cytostatische Aktivitäten und erwiesen sich als eine gute Quelle für die Suche nach neuen Naturstoffen.<sup>54</sup>

Der *Salinospora*-Stamm CNB-392 führte mit Hilfe einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des Extraktes zu Salinosporamid A (**6**) mit einer Ausbeute von 7 mg/L. **6** besitzt eine bicyclische  $\gamma$ -Lactam- $\beta$ -lacton-Struktur. Dieses Strukturelement ist bisher nur von Omuralid bekannt, welches aus einem terrestrischen Streptomyceten isoliert wurde. Die Funktionalisierung von (**6**) ist jedoch einzigartig.<sup>54</sup>



Salinosporamid A (**6**)

Salinosporamid A (**6**) weist eine bemerkenswerte Wirkung ( $IC_{50}$ -Wert = 11 ng/mL) gegen HTC-116-Darmkrebszellen auf. Außerdem hemmt es Lungenkrebs-, Brustkrebs- und Melanom-Zelllinien.<sup>54</sup>

Die Entdeckung einer neuen Bakterienart zeigt, dass die Erforschung des marinen Lebensraums noch lange nicht abgeschlossen ist. Immer wieder werden neue und interessante Sekundärstoffe mit pharmakologischen Wirkungen entdeckt. Für die Zukunft gilt es, mit neuen Methoden den schwer kultivierbaren marinen Mikroorganismen ihre Geheimnisse zu entlocken.

### 3. Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung von Mikroorganismen bezüglich ihrer Naturstoffproduktion, wobei die Mikroorganismen aus verschiedenen Habitaten stammen. Dabei sollte ein chemisches Screening mit marinen Pilze und marinen und terrestrischen Streptomyceten durchgeführt werden. Die Kultivierung der Mikroorganismen sollte in verschiedenen Nährmedien erfolgen, um möglichst viele Substanzen zu erfassen. Die Detektion zielte auf die Erfassung von Substanzen mit möglichst hoher chemischer Diversität. Dabei wurden an die Produzentenstämme folgende Anforderungen gestellt:

- Bildung einer im chemischen Screening auffallenden Produktpalette,
- Variation der Produktpalette unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen,
- Bildung von Substanzen unterschiedlicher Polarität,
- unterschiedliche Substanzklassen (Anfärbeverhalten mit Sprühreagenzien im Dünnschichtchromatogramm),
- Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Stämme, die diese Anforderungen erfüllten, sollten im größeren Maßstab kultiviert werden, um so im Anschluss an die Aufarbeitung ausreichende Substanzmengen für eine weitere Bearbeitung verfügbar zu haben. Nach der Isolierung unter Verwendung verschiedener chromatographischer Trennverfahren sollte sich die Strukturaufklärung unter Einbeziehung moderner chemischer und spektroskopischer Methoden anschließen. Im Plattendiffusionstest sollte die biologische Aktivität neuer Substanzen geprüft werden.

---

In einem Teilprojekt, gefördert vom BMBF, sollten Invertebraten der Tiefsee, die eine dichte Besiedlung der Kiemen mit Symbionten aufwiesen, auf ihren Naturstoffgehalt geprüft werden. Dazu wurden verschiedene Ansätze zur Aufarbeitung der Proben verfolgt. Die Isolierung der Naturstoffe sollte unter Einbeziehung verschiedener chromatographischer Trennmethoden erfolgen, wobei auf der Charakterisierung auch kleinster Substanzmengen ein besonderes Augenmerk lag. Die so isolierten Substanzen sollten in ihrer Struktur anhand von spektroskopischen Daten aufgeklärt werden. Abschließend sollte die biologische Aktivität im Plattendiffusionstest geprüft werden.

## II Streptomyceten

### 1. Screening von Streptomyceten

#### 1.1. Screeningmethoden

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Methoden für das Auffinden von Sekundärmetaboliten. Die eine beginnt mit der Untersuchung der biologischen Aktivität der Extrakte, ist also wirkungsorientiert. Die andere Methode weist Sekundärmetabolite physikochemisch nach, ist also strukturorientiert.

Das biologische Screening beruht auf den Ansätzen von S. A. Waksman<sup>55</sup>, wobei die antibakterielle Wirkung von Substanzen auf Testorganismen im Plattendiffusionstest untersucht wird. Das zunehmende Wissen um die Mechanismen von Krankheitsverläufen auf genetischer und molekularer Ebene führte zum target-orientierten Screening<sup>56</sup>. Dabei erfolgt die Testung mittels Enzym- und Rezeptormodellen, die auf spezielle Krankheiten ausgelegt sind. Dieser Ansatz erlaubt eine weitgehende Automatisierung mit hohem Durchsatz, das sogenannte High-Throughput-Screening (HTS)<sup>57</sup>, und wird vor allem in der Industrie angewandt.

Die Nachteile des biologischen Screenings sind im folgenden zu sehen: Interessante Metabolite, die in zu geringer Konzentration auftreten oder eine andere Wirkung als die getestete aufweisen, werden nicht nachgewiesen. Außerdem kann es zu falsch positiven Ergebnissen aufgrund von synergistischen Effekten im Extrakt kommen. Unbekannte Substanzen mit interessanten Strukturen aber ohne biologische Aktivität sind nicht nachweisbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass auch bekannte Verbindungen erfasst werden, was sich jedoch mit keiner Methode ausschließen lässt.

Das (physiko-) chemische Screening geht auf Umezawa<sup>58</sup> zurück und wurde von Zähler<sup>59</sup> und Zeeck<sup>60</sup> weiterentwickelt. Dabei werden die im Dünnschichtchromatogramm aufgetrennten Extrakte mit verschiedenen Sprühreagenzien angefärbt. Das Sprühreagenz reagiert mit bestimmten funktionellen Gruppen der Metabolite und färbt so die Zone im Chromatogramm an. Dabei lassen sich schon aus der Färbung gewisse Rückschlüsse auf die Funktionalitäten ziehen. So sind z.B. mit Anisaldehyd Steroide und höhere

Alkohole, mit Ehrlichs Reagenz Amine und mit Orcin Zucker besonders gut nachweisbar.<sup>61</sup> Eine Erweiterung dieser Methode erfolgte durch die zunehmend fortschreitende Entwicklung der HPLC-Technik. Damit lassen sich die Substanzen "on flow" charakterisieren, indem die HPLC-Anlage mit verschiedenen Detektoren gekoppelt wird. Beispiele hierfür sind die gekoppelten Methoden HPLC-DAD<sup>62</sup>, HPLC-MS<sup>63,64</sup> und HPLC-NMR<sup>65</sup>.

Die Nachteile des chemischen Screenings sind folgende: Eine Automatisierung im Sinne eines HTS ist schwer umsetzbar. Das Screeningfenster liegt auf den durch die Sprühreagenzien vorgegeben Farbreaktionen. Außerdem werden auch hier bekannte Substanzen detektiert und können von neuen Sekundärmetaboliten nur mit viel Erfahrung unterschieden werden.

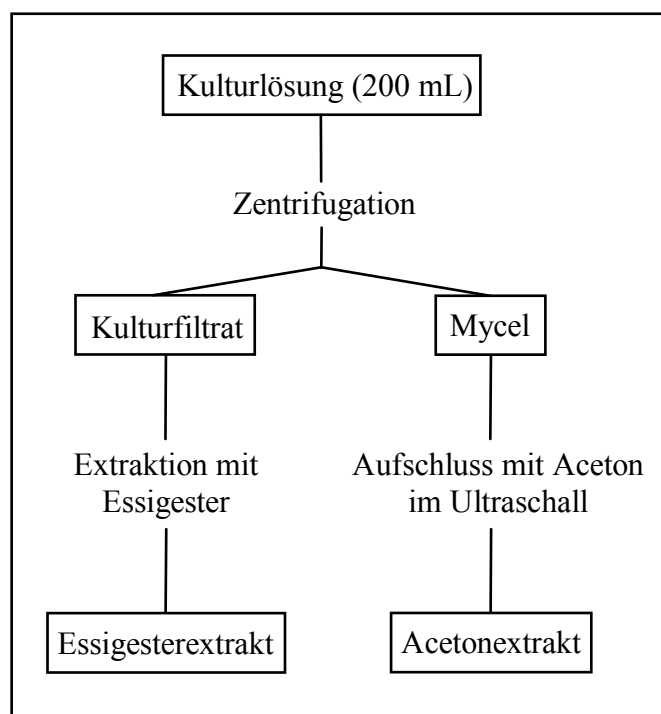
Heute kombiniert man die Vorteile des biologischen mit denen des chemischen Screenings. Dabei werden die Extrakte nach einer ersten Fraktionierung mittels gekoppelter HPLC-Methoden untersucht und gleichzeitig in einen biologischen Assay eingeschleust. Die so gesammelten Informationen werden mit Datenbanken verglichen, um bekannte Metabolite möglichst rasch ausschließen zu können.

## 1.2. Chemisches Screening der bearbeiteten Stämme

Um einen Überblick über das Metabolitenmuster zu erhalten, erfolgte die Kultivierung der Streptomyceten bei den terrestrischen Mikroorganismen in vier, bei den Stämmen mariner Herkunft in fünf verschiedenen Nährmedien. Untersuchungen der Firma Panlabs haben gezeigt, dass eine bestimmte biologische Aktivität bei 75 % der bearbeiteten Stämme nur auf einem von vier Nährmedien zu beobachten ist.<sup>66</sup> Das Fehlen wichtiger Spurenelemente kann dabei die Bildung von Sekundärmetaboliten verhindern, wogegen andere Nährmedienbestandteile, wie z.B. Glucose oder Ammoniumionen stille Biosynthesegene aktivieren können.

Um ein breites Spektrum an Nährmedienbestandteilen abzudecken, wurden im Screening die komplexen Medien M2, SGG, SM, Hafer und Marine Broth verwendet. Temperatur und Belüftung wurden im für Streptomyceten günstigen Bereich konstant gehalten. Mit zwei Kolben je Nährmedium sollten eventuelle Unregelmäßigkeiten ausgeglichen werden. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß

Abbildung 02. Die so erstellten Extrakte wurden jeweils in 2 mL Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen und 5  $\mu$ L dieser Lösung auf HPTLC-Kieselgelplatten aufgetragen. Die Chromatogramme wurden in den Laufmittelgemischen Chloroform/Methanol (9:1) und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) entwickelt. Die Detektion erfolgte anhand der Eigenfarbe bei farbigen Substanzen, anhand UV-Absorption/Fluoreszenz bei 254 und 366 nm sowie durch das Anfärbeverhalten mit unterschiedlichen Sprühreagenzien. UV-Absorption und Fluoreszenz wurden ebenso wie das Anfärbeverhalten fotografisch dokumentiert.



**Abbildung 02 Aufarbeitungsschema für die Streptomyceten**

### 1.3. Herkunft und Stammauswahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 24 Streptomyceten-Stämme untersucht, deren Herkunft sich wie folgt gliedert:

- Streptomyceten terrestrischer Herkunft: Ägy-rot, Z- und Te-Stämme.
- Streptomyceten mariner Herkunft (Atlantik): Ku2, Ku3, Kuba.
- Streptomyceten mariner Herkunft (Ostsee): RS-Stämme, 20XX-Stämme.

**a) Streptomycceten terrestrischer Herkunft**

Der Stamm Ägy-rot stammt aus einer Bodenprobe, die ca. 10 km westlich von Hurghada (Ägypten) in einer Steinwüste entnommen wurde. Die Z-Stämme wurden aus einer Probe isoliert, die unter einer Zeder an den Niederungen der Erft (bei Düsseldorf) entnommen wurde. Die Te-Stämme stammen aus dem Abraum von Tennisplätzen.

**b) Streptomycceten mariner Herkunft aus dem Atlantik**

Aus einer Sedimentprobe, die an der Atlantikküste im Südosten Kubas entnommen wurde, ließen sich die drei Stämme Ku2, Ku3 und Kuba isolieren. Die Probe stammt aus einer Meerestiefe von 1.30 - 1.50 m. Die Entfernung der Entnahmestelle zur Atlantikküste (bei Guardalavaca) betrug etwa 80 m.

**c) Streptomycceten mariner Herkunft aus der Ostsee**

Aus verschiedenen Sedimentproben, die an der deutschen Ostseeküste entnommen wurden, ließen sich sieben RS-Stämme sowie sieben 20XX-Stämme isolieren.

Die 24 Stämme wurden wie in Kapitel 1.2 angegeben dem chemischen Screening unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 01 zusammengefasst. Folgende Stämme wurden zur weitergehenden Bearbeitung ausgewählt: Ägy-rot, Z3, Z6, Z9 und Z12 sowie Ku2.



| Stamm   | M2    | SM    | SGG   | Hafer | Marine Broth |
|---------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| Ägy-rot | +++++ | +++   | +++++ | ++    | -            |
| Z3      | ++++  | ++    | ++++  | ++    | -            |
| Z6      | ++    | ++    | ++    | +++   | -            |
| Z9      | +++++ | ++    | +     | ++    | -            |
| Z12     | ++    | +++++ | ++++  | +     | -            |
| Te1     | +     | +     | +     | +     | -            |
| Te2     | +     | +     | +     | +     | -            |
| Ku2     | ++    | ++    | +     | +++++ | +            |
| Ku3     | +     | +     | +     | +     | +            |
| Kuba    | +     | ++    | +     | +     | +            |
| RS1     | +     | +     | +     | +     | +            |
| RS2     | +     | +     | +     | +     | +            |
| RS3     | ++    | +     | +     | ++    | +            |
| RS4     | +     | +     | +     | +     | +            |
| RS5     | +     | +     | +     | +     | +            |
| RS6     | ++    | +     | +     | +     | +            |
| RS7     | +     | ++    | +     | +     | +            |
| 2014    | +     | +     | +     | +     | +            |
| 2019    | +     | +     | +     | +     | +            |
| 2021    | ++    | +     | +     | +     | +            |
| 2022    | +     | +     | +     | +     | +            |
| 2024    | +     | +     | ++    | +     | +            |
| 2025    | +     | +     | +     | +     | +            |
| 2026    | +     | +     | +     | +     | +            |

Tabelle 01 Bewertung der bearbeiteten Streptomyceten-Stämme (mit +++++ = sehr gutes Metabolitenspektrum bis + = kaum vorhandenes Metabolitenspektrum, - = nicht untersucht)

## 2. Streptomyceten mit auffälligem Metabolitenmuster

### 2.1. Der Stamm Ägy-rot

#### 2.1.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm Ägy-rot fiel im chemischen Screening durch drei Metabolite roter Eigenfarbe auf, die fluoreszierend und UV-löschend sind. Mit den verwendeten Sprühreagenzien Anisaldehyd, Ehrlichs Reagenz und Orcin erfolgte keine Reaktion. Im Mycel des M2- und SGG-Mediums zeigte der Stamm ein ähnliches Metabolitenmuster, wobei die polarere Substanz verstärkt im M2-Medium und die unpolare Substanz verstärkt im SGG-Medium produziert wurden.

Der Stamm wurde bei 28 °C und 180 rpm in 300 mL-Schüttelkolben mit Schikane, befüllt mit 100 mL der M2-Nährlösung, fermentiert. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Abbildung 02, wobei der Essigester-Extrakt verworfen wurde. Der Aceton-Extrakt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Chloroform/Methanolgemisch (14:1) unterworfen. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte an Sephadex LH-20 (Methanol) und ergab 7-Desoxy-13-dihydrodaunomycinon (**7**) (1.3 mg/L) und eine weitere Verbindung (0.1 mg/L), die aufgrund zu geringer Menge nicht aufgeklärt werden konnte.

Die Kultivierung von Ägy-rot im SGG-Nährmedium führte unter den selben Bedingungen zu einem ähnlichen Metabolitenmuster mit einem polareren Hauptmetaboliten. Der Aceton-Extrakt wurde an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) getrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte an Sephadex LH-20 (1. Aceton, 2. Methanol). Im letzten Schritt wurde an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (100:1) getrennt, wobei  $\epsilon$ -Rhodomycinon (**8**) (3.9 mg/L) erhalten wurde.

#### 2.1.2. Charakterisierung der gebildeten Hydroxyanthrachinone

##### **7-Desoxy-13-dihydrodaunomycinon (7)**

Für den roten Feststoff **7**, der einen Schmelzpunkt von 220 °C besitzt und optisch aktiv ist, wurde durch EI-MS eine Molmasse von 384 g/mol zugeordnet. Die rote Eigenfarbe ließ ein Hydroxyanthrachinon-System vermuten. Die Bande im UV-Spektrum (siehe Abbildung 03) bei 494 nm bestätigte diese Vermutung.

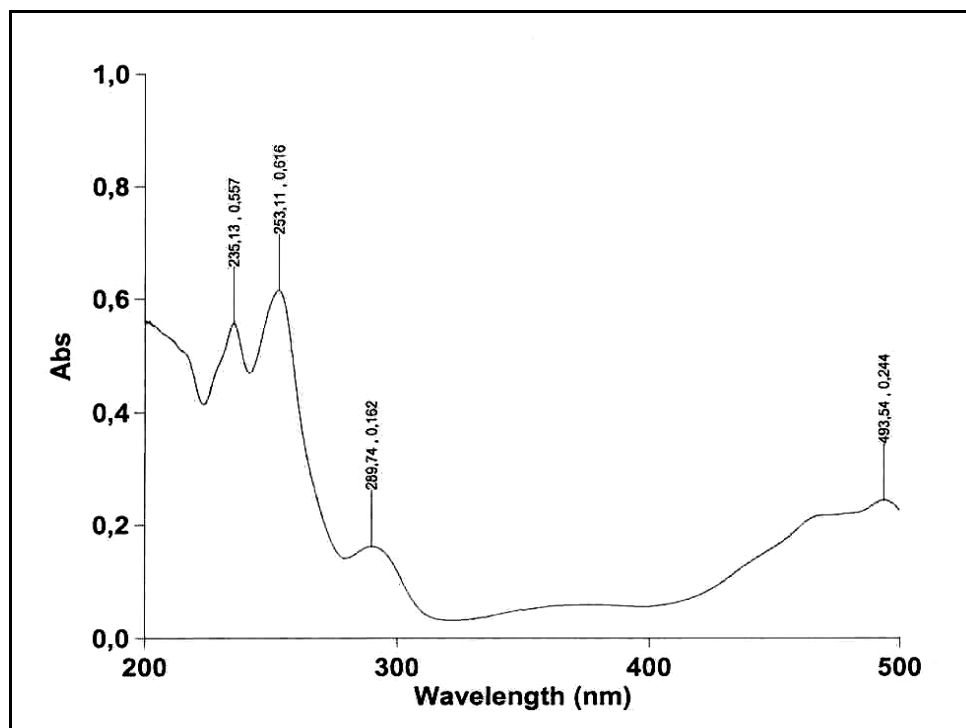


Abbildung 03 UV-Spektrum von **7**

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten den Signalen bei  $\delta_{\text{H}} = 7.59$  und  $7.87$  drei aromatische Protonen zugeordnet werden. Die Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 4.60$ ,  $13.35$  und  $13.90$  deuten auf mindestens drei Hydroxygruppen hin. Desweiteren sind bei  $\delta_{\text{H}} = 1.13$  eine Methylgruppe und bei  $\delta_{\text{H}} = 3.97$  eine Methoxygruppe zu erkennen. Mit dem  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum konnten die Aussagen des Protonenspektrum bestätigt werden und die restlichen Protonen drei Methylengruppen mit  $\delta_{\text{C}} = 20.1$ ,  $26.0$  und  $31.9$  sowie einer an Sauerstoff gebundenen Methingruppe mit  $\delta_{\text{C}} = 72.1$  zugeordnet werden. Außerdem erscheinen zwei Signale bei  $\delta_{\text{C}} = 185.9$  und  $186.2$ , die typisch für zwei Carbonyl-Kohlenstoffatome sind. Mit diesen Informationen wurde eine Struktursuche in der Datenbank Antibase<sup>67</sup> durchgeführt. Durch den Vergleich mit Literaturdaten<sup>68</sup> wurde **7** eindeutig als 7-Desoxy-13-dihydrodaunomycinon identifiziert. **7** entspricht dem Aglykon von Daunomycin (gleich Daunorubicin), einem Anthracyclin mitausgeprägter Antitumoraktivität<sup>69</sup>. In Tabelle 02 sind die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **7** im Vergleich zu **8** und den jeweiligen Literaturdaten aufgeführt.

|                    | <u>7</u> (Literatur) <sup>a</sup> | <u>7</u> (isoliert) <sup>b</sup> | <u>8</u> (isoliert) <sup>b</sup> | <u>9</u> (Literatur) <sup>c</sup> |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1-H                | 7.87                              | 7.86                             | 7.77                             | 8.33                              |
| 2-H                | 7.87                              | 7.86                             | 7.82                             | 7.85                              |
| 3-H                | 7.59                              | 7.59                             | 7.39                             | 7.85                              |
| 4-H                |                                   |                                  |                                  | 8.33                              |
| 4-OH               |                                   |                                  | 11.95                            |                                   |
| 6-OH               | 13.90                             | 13.91                            | 13.40                            | 13.33                             |
| 7-H                | 2.65 / 2.84                       | 2.51-2.95                        | 5.52                             | 5.42                              |
| 7-OH               |                                   |                                  | 5.33 / 5.54*                     | 3.40                              |
| 8-H                | 1.51 / 1.88                       | 1.50 / 1.89                      | 1.99 / 2.10                      | 2.28 / 2.56                       |
| 9-OH               |                                   | 4.26                             | 5.33 / 5.54*                     | 3.89                              |
| 10-H               | 2.65                              | 2.51-2.95                        | 4.15                             | 4.11                              |
| 11-H               |                                   |                                  |                                  | 7.74                              |
| 11-OH              | 13.35                             | 13.38                            | 12.74                            |                                   |
| 13-H               | 3.55                              | 3.55                             | 1.43 / 1.68                      | 1.59 / 1.74                       |
| 13-OH              | 4.60                              | 4.68                             |                                  |                                   |
| 14-H               | 1.13                              | 1.14                             | 1.03                             | 1.12                              |
| 4-OCH <sub>3</sub> | 3.97                              | 3.96                             |                                  |                                   |
| COOCH <sub>3</sub> |                                   |                                  | 3.62                             | 3.72                              |

Tabelle 02 Vergleich der NMR-Daten von 7 und 8 mit Literaturdaten  
 (\* = Zuordnung nicht gesichert. <sup>a</sup> 270 MHz/DMSO-d<sub>6</sub>,  
<sup>b</sup> 600 MHz/DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>c</sup> 400 MHz/CDCl<sub>3</sub>.)

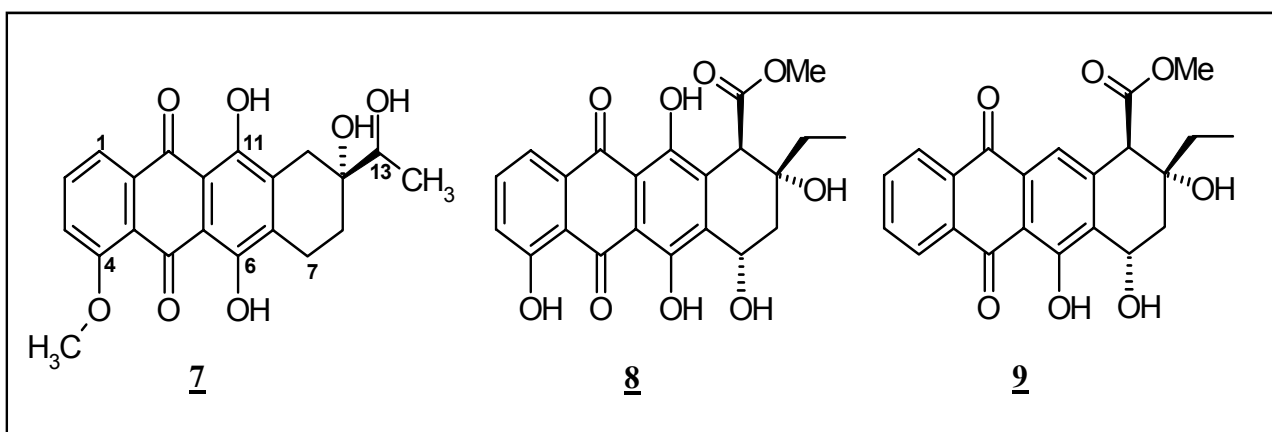
### ε-Rhodomycinon (8)

Die Verbindung 8 erwies sich nicht nur durch die rote Eigenfarbe, sondern auch anhand der spektroskopischen Daten als sehr ähnlich zu 7. 8 ist jedoch deutlich polarer und auch die durch EI-MS bestimmte Molmasse von 428 g/mol ist um 44 Einheiten größer als die von 7.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum treten wieder drei aromatische Protonen bei δ<sub>H</sub> = 7.39, 7.77 und 7.82 auf. Die Signale bei δ<sub>H</sub> = 11.95, 12.74 und 13.40 deuten auf mindestens drei Hydroxygruppen hin. Auch eine Methylgruppe bei δ<sub>H</sub> = 1.03 und eine Methoxygruppe bei δ<sub>H</sub> = 3.62 sind zu sehen. Dabei fällt auf, dass sowohl die Methylgruppe als auch die Methoxygruppe im Vergleich zu 7 Hochfeld-verschoben sind. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigt neben den beiden Carbonylgruppen bei δ<sub>C</sub> = 185.9 und 190.0 eine weitere Carbonylgruppe bei δ<sub>C</sub> = 170.2. Es sind nur zwei Methylengruppen bei δ<sub>C</sub> = 32.1 und 34.6 auszumachen, dafür treten zwei Methingruppen bei δ<sub>C</sub> = 51.2 und 60.6 auf. Die Datenbankrecherche in Antibase führte zur Struktur von ε-Rhodomycinon. 8

stellt das Aglykon der Rhodomycine dar, welche eine große Gruppe tumoraktiver<sup>70</sup> Anthracycline bilden.

Rhodomycinon (**8**) wurde 1955 erstmals von Brockmann und Franck<sup>71</sup> beschrieben. 1961 folgte die Veröffentlichung der Konstitutionsformel<sup>72</sup>. Die Strukturaufklärung erfolgte zu dieser Zeit durch Bestimmung der Abbauprodukte. Bisher wurden keine NMR-spektroskopischen Daten zu  $\epsilon$ -Rhodomycinon (**8**) veröffentlicht. Der Datenvergleich fand mit Hilfe der Literaturangaben zu **7** und der Literaturdaten von 7-Desoxyaklavinon (**9**)<sup>73</sup> statt (siehe Tabelle 02). **9** unterscheidet sich von **8** nur an Position C-4 und C-11 durch die bei **9** nicht vorhandenen Hydroxygruppen.



**Abbildung 04** 7-Desoxy-13-dihydrodaunomycinon (**7**),  $\epsilon$ -Rhodomycinon (**8**) und 7-Desoxyaklavinon (**9**)

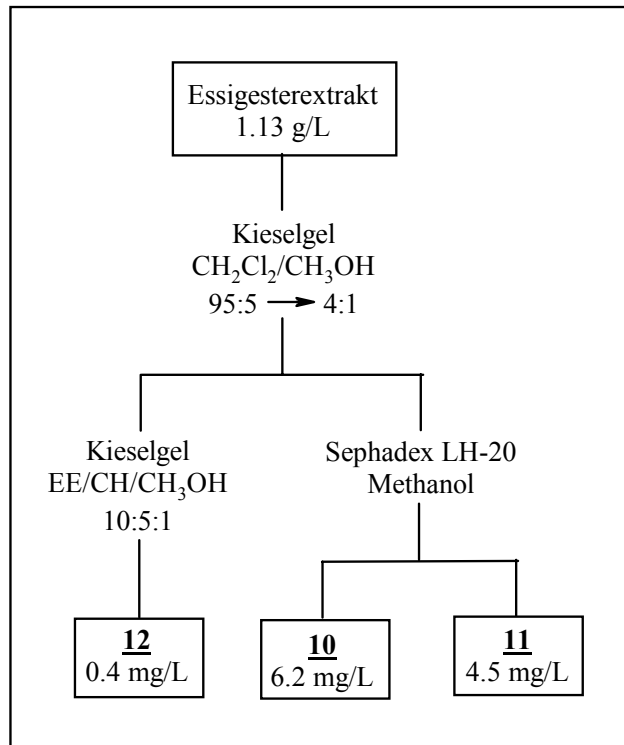
## 2.2. Der Stamm Z9

### 2.2.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm Z9 fiel im chemischen Screening durch die Bildung einer mit Anisaldehyd orange-braun anfärbenden Zone und einer schleifenden, mit Anis grau-braun anfärbenden Zone im Nährmedium M2 auf. Die Substanzen wurden ausschließlich im Kulturfiltrat detektiert und sind mit  $R_f$ -Werten zwischen 0.24 und 0.34 in Chloroform/Methanol (9:1) im polaren Bereich anzusiedeln.

Der Stamm wurde bei 28°C und 180 rpm in 300 mL-Schüttelkolben mit Schikane, befüllt mit 100 mL M2-Nährlösung, fermentiert. Die Aufarbeitung der

Kulturbrühe erfolgte nach Abbildung 02, wobei der Aceton-Extrakt verworfen wurde. Der Essigester-Extrakt wurde gemäß Abbildung 05 aufgereinigt und führte zu Nonactinsäure (**10**) (6.2 mg/L), Homononactinsäure (**11**) (4.5 mg/L) und Streptenol E (**12**) (0.4 mg/L).



**Abbildung 05** Isolierung von **10**, **11** und **12**

### 2.2.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

#### Streptenol E (**12**)

Die in Form eines farblosen Öls erhaltene Substanz färbt mit Anisaldehyd ocker und mit Orcin braun an. Durch EI- und ESI-MS lässt sich eine Molmasse von 227 g/mol zuordnen, wobei die ungerade Zahl auf eine ungerade Anzahl Stickstoffatome hinweist.

Dem Protonenspektrum lassen sich Signale für 19 Protonen entnehmen, die in Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 1.60$  bis 5.38 zu sehen sind. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind zwei Methylgruppen, fünf Methylengruppen und drei Methingruppen zu erkennen, sowie zwei Signale bei  $\delta_{\text{C}} = 173.4$  und 211.6 für Carbonylgruppen. Anhand des  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrums ließen sich Teilstücke des Moleküls ableiten, die

bei der Datenbankrecherche in Antibase (Abbildung 06) nur eine mögliche Lösung ergaben. Durch Vergleich mit Literaturdaten<sup>74</sup> konnte die Substanz 12 als Streptenol E identifiziert werden.

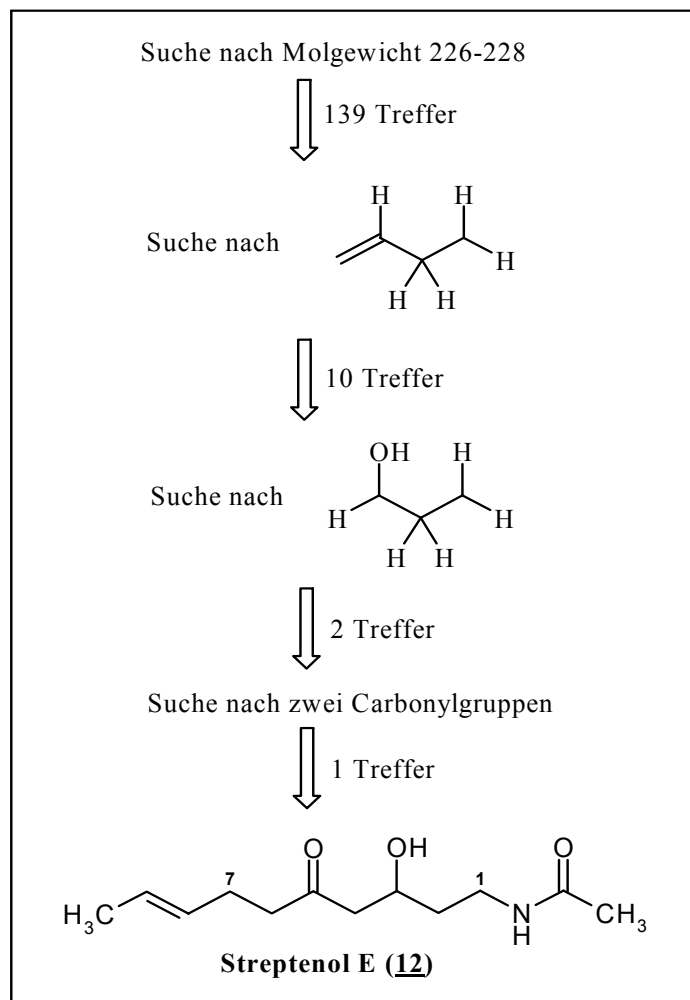


Abbildung 06 Antibase-Suchstrategie für 12

### Nonactinsäure (10)

Der weißen Feststoff 10, der sehr gut in Methanol löslich ist, hat die Molmasse 202 g/mol (ESI-MS). 10 ist nicht UV-löschend oder fluoreszierend, färbt jedoch mit Anisaldehyd rotbraun, mit Orcin graubraun und mit Ehlich's Reagenz hellviolett an.

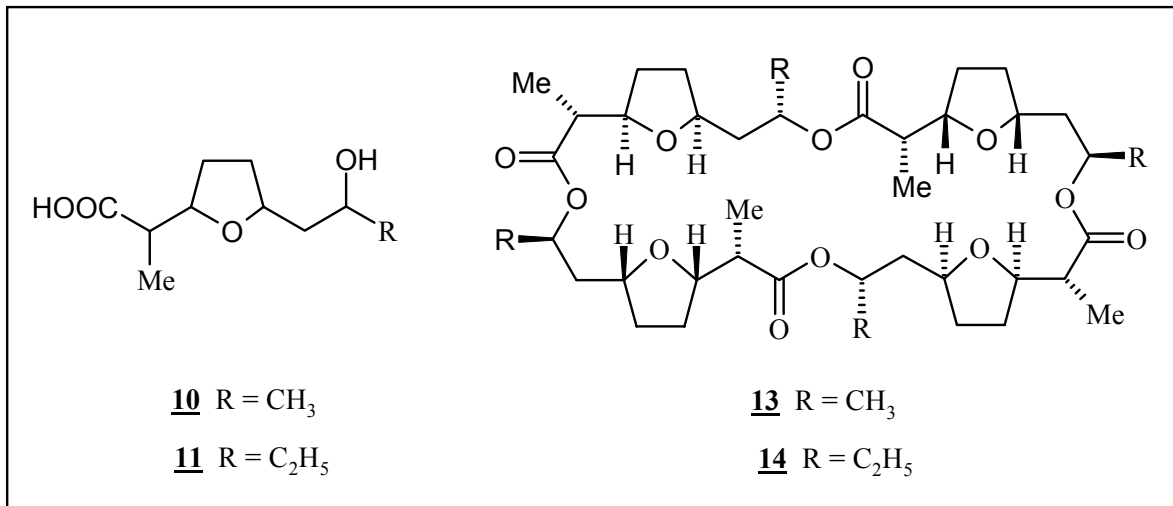
Im Protonenspektrum spalten zwei Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 1.10$  und  $1.15$  jeweils zum Dublett ( $J = 7.0$  und  $6.0$  Hz) auf. Die Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 1.55$ ,  $1.60$  und  $2.00$  ließen sich drei Methylengruppen zuordnen. Desweiteren lassen sich vier Methingruppen ausmachen, wobei drei von ihnen mit  $\delta_{\text{H}} = 3.88$  bis  $4.02$

Tieffeld-verschoben sind, was auf eine Nachbarschaft zu Sauerstoff hindeutet. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum mit 10 Signalen bestätigt die Ergebnisse des Protonenspektrums und zeigt ein weiteres Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 178.9$  für eine Carbonylgruppe. Mit den Informationen aus Massen- und NMR-Spektroskopie wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt. Durch den Vergleich mit Literaturdaten<sup>75</sup> konnte **10** eindeutig als Nonactinsäure identifiziert werden, wobei der Drehwert von Null auf ein (+)/(-)-Gemisch hinweist. Die Tetramerisierung von je zwei Molekülen der (+)- und (-)-Nonactinsäure (**10**) führt in der Biosynthese zu Nonactin (**13**), einem Macrotetrolid-Antibiotikum.<sup>76</sup>

### **Homononactinsäure (11)**

Die Substanz **11** unterscheidet sich nur wenig von **10**. Sie ist ebenfalls nicht UV-löschend oder fluoreszierend, färbt jedoch mit Anisaldehyd grau, mit Orcin graubraun und mit Ehrlichs Reagenz weiß an. Aus dem ESI-MS-Spektrum lässt sich eine Molmasse von 216 g/mol ableiten, was auf eine Verlängerung der Kohlenstoffkette von **10** um eine  $\text{CH}_2$ -Einheit hindeutet. Dem entsprechend sind im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum vier Methylengruppen zu erkennen. Ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>77</sup> führte zu Homononactinsäure (**11**). Auch bei **11** ist der Drehwert gleich Null, was wiederum auf ein (+)/(-)-Gemisch hinweist. Die Tetramerisierung von je zwei Molekülen der (+)- und (-)-Homononactinsäure (**11**) führt in der Biosynthese zu Tetranactin (**14**). Der Zusammenhang zwischen Tetranactin (**14**), Nonactin (**13**) und den jeweiligen Bausteinen Homononactinsäure (**11**) und Nonactinsäure (**10**) ist in Abbildung 07 dargestellt.





**Abbildung 07 Nonactin (13), Tetranactin (14) und die jeweiligen Bausteine Nonactinsäure (10) und Homononactinsäure (11)**

### 2.3. Der Stamm Z12

#### 2.3.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm Z12 fiel im chemischen Screening durch die Bildung interessanter Zonen bei der Kultivierung in SGG und SM auf. In SM war eine polare, mit Anisaldehyd blau anfärbende Substanz im Dünnschichtchromatogramm zu sehen, die sich ausschließlich im Aceton-Extrakt befand. Im SGG-Medium fiel eine mittelpolare Substanz gelber Eigenfarbe auf, die mit Ehrlichs Reagenz schwach gelb anfärbte und eine etwas unpolare, UV-löschende und fluoreszierende Substanz, die ebenfalls mit Ehrlichs Reagenz schwach gelb anfärbte, jedoch keine Eigenfarbe aufwies. Beide Zonen waren sowohl im Aceton- als auch im Essigester-Extrakt zu sehen.

Der Stamm wurde bei 28 °C und 180 rpm in 300 mL-Schüttelkolben mit Schikane, befüllt mit 100 mL SGG-Nährlösung, fermentiert. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Abbildung 02, wobei der Essigester-Extrakt verworfen wurde. Der Aceton-Extrakt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) unterzogen. Durch eine nochmalige Auftrennung mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (9:1) konnte 2'-Desoxy-5-methylcytidin (**15**) mit einer Ausbeute von 1.6 mg/L erhalten werden.

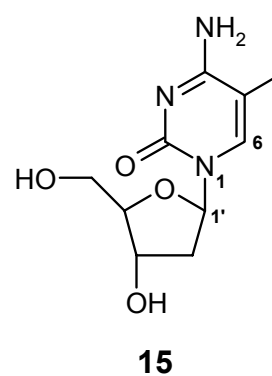
Die Kultivierung und Aufarbeitung von Z12 im Nährmedium SM erfolgte unter den selben Bedingungen wie oben. Aceton- und Essigester-Extrakt wurden aufgrund des sehr ähnlichen Metabolitenspektrums vereinigt. Die Aufreinigung der Metabolite erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) und durch zweimalige Chromatographie an Sephadex LH-20 (1. Methanol, 2. Aceton). Es konnten 0.05 mg/L Cyclo-(phenylalanyl-prolyl) (**16**) und 1.0 mg/L Kitamycin B (**17**) isoliert werden.

Um eine größere Menge an **17** und eventuell andere Kitamycine oder Antimycin-Antibiotika zu erhalten, wurde Z12 im selben Nährmedium im 50 L-Fermenter kultiviert. Es konnten jedoch kein Kitamycin B (**17**), aber eine polare, ausschließlich mit Orcin (dunkelblau) anfärbende Substanz **18** mit einer Ausbeute von 0.3 mg/L isoliert werden. Die Isolierung erfolgte an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Chloroform/Methanol (16:1 bis 6:1) und anschließender Aufreinigung an Sephadex LH-20 (Methanol). Aufgrund der starken Ähnlichkeit dieser Substanz zu **19**, einer aus dem Stamm Z6 isolierten Substanz, wird die Charakterisierung von **18** im Kapitel 2.5.2 genauer besprochen.

### 2.3.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

#### **2'-Desoxy-5-methylcytidin (**15**)**

Der im Aceton-Extrakt der Fermentation im SGG-Medium gefundenen, mit Orcin blau anfärbenden Substanz **15** lässt sich mittels DCI-MS eine Molmasse von 241 g/mol zuordnen. Im Protonenspektrum sind die typischen Signale einer Stickstoff-verknüpften Pentose mit Verschiebungen bei  $\delta_H = 2.21 / 2.29$  und  $3.70 / 3.79$  für zwei Methylengruppen sowie bei  $\delta_H = 3.92, 4.83$  und  $6.25$  für drei Methingruppen zu sehen.

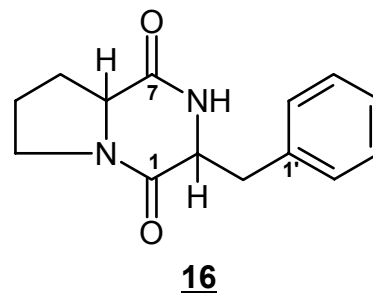


Desweiteren erscheint das Singulett einer Methingruppe bei  $\delta_H = 7.79$  und das Singulett einer Methylgruppe bei  $\delta_H = 1.93$ . Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum lassen sich bei  $\delta_C = 111.5, 152.4$  und  $166.4$  die Signale für weitere drei quartäre

Kohlenstoffatome ausmachen. Mit diesen Informationen wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt. Der Vergleich mit Literaturdaten<sup>78</sup> führte zur Struktur von 2'-Desoxy-5-methylcytidin. **15** ist als Intermediat des Nucleotidstoffwechsels bekannt und könnte aus dem im SGG-Nährmedium enthaltenen Cornsteep-Powder stammen.

### Cyclo-(phenylalanyl-prolyl) (**16**)

Aus dem Nährmedium SM ließ sich die Substanz **16** isolieren, die eine Molmasse von 244 g/mol aufweist (EI- und ESI-MS). **16** ist schwach UV-löschend, nicht fluoreszierend und färbt mit Ehrlichs Reagenz schwach gelb an.



Im Protonenspektrum sind vier Methylengruppen mit Verschiebungen zwischen  $\delta_H = 1.79$  und  $3.53$  erkennbar. Desweiteren sind zwei Methingruppen bei  $\delta_H = 4.05$  und  $4.43$  sowie ein Multiplett für fünf sich überlagernde aromatische Protonen bei  $\delta_H = 7.22$  zu sehen. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ergänzt die Informationen aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum um zwei Carbonylgruppen mit Verschiebungen bei  $\delta_C = 166.9$  und  $176.9$ . Mit diesen Daten wurde eine Struktursuche in Antibase durchgeführt. **16** konnte durch Vergleich mit Literaturdaten<sup>79</sup> als Cyclo-(phenylalanyl-prolyl) identifiziert werden und ist somit bei den Diketopiperazinen einzuordnen.

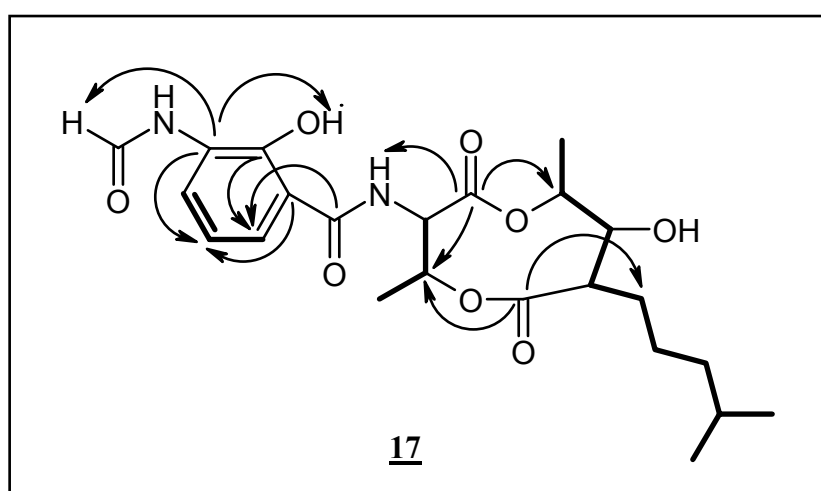
### Kitamycin B (**17**)

Die aus dem Nährmedium SM isolierte leuchtend gelbe Substanz **17** ist mit einem  $R_f$ -Wert von 0.69 (Chloroform/Methanol 9:1) mittelpolar. Anhand von EI- und ESI-MS konnte eine Molmasse von 466 g/mol ermittelt werden. Eine Hochauflösung des EI-Peaks bei  $m/z = 466$  führte zur Summenformel  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{N}_2$ .

Im Protonenspektrum wies ein Dublett bei  $\delta_H = 0.86$  mit  $J = 7.0$  Hz die Intensität von sechs Protonen auf, was auf eine Isopropylgruppe hindeutete. Weitere zwei Methylgruppen mit  $\delta_H = 1.31$  und  $1.46$  konnten bestimmt werden. Außerdem sind vier Methylengruppen und fünf Methingruppen mit Verschiebungen

zwischen  $\delta_H = 1.62$  und  $5.71$  zu erkennen. Das breite Singulett bei  $\delta_H = 1.94$  deutet ebenso wie das Singulett bei  $12.66$  auf je eine Hydroxygruppe hin. Den Signalen bei  $\delta_H = 7.15$  und  $8.01$  wurden zwei NH-Gruppen zugeordnet. Im Tieffeld-Bereich finden sich weitere vier Protonen, zwei bei  $\delta_H = 7.27$  und  $8.55$  spalten zum Dublett mit  $J = 8.0$  Hz auf, das dritte spaltet zum Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von zweimal  $8.0$  Hz auf und das vierte wurde bei  $\delta_H = 8.50$  detektiert.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bestätigte die Ergebnisse des Protonenspektrums und zeigte weitere sechs quartäre Kohlenstoffatome mit Verschiebungen von  $\delta_C = 112.6$  bis  $174.1$ . Anhand des  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COCY-NMR-Spektrums ergaben sich Teilstücke der Struktur, die mittels des HMBC-NMR-Spektrums, wie in Abbildung 08 dargestellt, verknüpft werden konnten. Eine Datenbankrecherche in Antibase ergab für **17** in Übereinstimmung mit den Literaturdaten<sup>80</sup> die Struktur von Kitamycin B. (**17**) gehört zur Gruppe der Antimycine, hemmt das Pflanzenwachstum und ist aktiv gegen *Candida albicans*.



**Abbildung 08** COSY-Fragmente (dick) und ausgewählte HMBC-Kopplungen (Pfeile) von **17**

## 2.4. Der Stamm Z3

### 2.4.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm Z3 fiel im chemischen Screening in den Nährmedien SGG und M2 auf. Im Aceton-Extrakt des SGG-Mediums zeigte sich eine fluoreszierende und UV-löschende Zone, die mit Orcin blau anfärbte. Bei der Kultivierung in M2 war

sowohl im Essigester- als auch im Aceton-Extrakt eine mit Anisaldehyd intensiv braun anfärbende Substanz zu sehen.

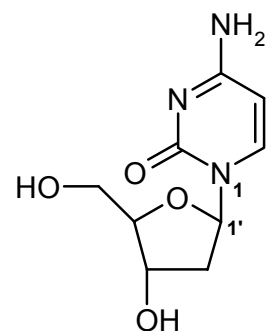
Die Fermentation von Z3 erfolgte bei 28 °C und 180 rpm in 300 mL-Schüttelkolben mit Schikane, befüllt mit 100 mL der Nährlösung SGG. Die Aufarbeitung wurde nach Abbildung 02 durchgeführt, dabei wurde der Essigester-Extrakt verworfen. Der Aceton-Extrakt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) unterworfen. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte an Sepadex LH-20 (Methanol) und ergab 2'-Desoxycytidin (**20**) mit einer Ausbeute von 0.5 mg/L.

Die Kultivierung und Aufarbeitung von Z3 im Nährmedium M2 erfolgte unter den selben Bedingungen wie oben. Da die mit Anisaldehyd braun anfärbende Substanz im Aceton- und im Essigester-Extrakt zu sehen war, wurden beide vereinigt. Es folgte eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (9:1) und anschließender Aufreinigung an Sephadex LH-20 (Methanol). Man erhielt 2,5-Furandimethanol (**21**) mit einer Ausbeute von 7.3 mg/L.

#### 2.4.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

##### 2'-Desoxycytidin (**20**)

Der mit Orcin blau anfärbende weiße Feststoff zeigt in allen physikalischen Eigenschaften ebenso wie in den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren eine große Ähnlichkeit zu 2'-Desoxy-5-Methylcytidin (**15**) (siehe Kapitel 2.3.2). Die Molmasse von 227 g/mol (ESI-MS) ist im Vergleich zu **15** um eine Methylengruppe kleiner.



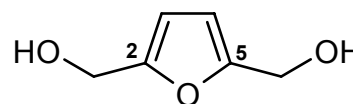
**20**

Im Protonenspektrum zeigt sich ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}} = 5.68$  mit  $J = 8.0$  Hz und das Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 7.98$  spaltet mit der selben Kopplungskonstante ebenso zum Dublett auf. Die anderen Signale sind im Vergleich zu **15** nahezu unverändert. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum werden die Ergebnisse aus Massen- und Protonenspektrum bestätigt. Durch den Vergleich mit Literaturdaten<sup>81</sup> wird für

**20** die Struktur von 2'-Desoxycytidin bestätigt. **20** ist ebenso wie **15** als Intermediat des Nucleotidstoffwechsels bekannt und könnte auch hier aus dem im SGG-Nährmedium enthaltenen Cornsteep-Powder stammen.

### 2,5-Furandimethanol (**21**)

Für den weißen Feststoff ergab sich laut EI- und ESI-MS eine Molmasse von 128 g/mol. Die Hochauflösung des Molpeaks im EI-MS-Spektrum führte zur Summenformel C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>.



**21**

Im Protonenspektrum sind nur drei Signale bei  $\delta_H = 4.37$ , 5.10 und 6.19 zu sehen, wobei das erste eine Intensität von zwei und die anderen eine Intensität von eins aufweisen. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum sind ebenfalls nur drei Signale erkennbar. Das Signal bei  $\delta_C = 54.4$  kann einer Sauerstoff-gebundenen Methylengruppe zugeordnet werden, wogegen die Kohlenstoffatome mit  $\delta_C = 109.1$  und 155.7 auf eine Doppelbindung hindeuten. Die starke Tieffeld-Verschiebung von  $\delta_C = 155.7$  lässt auf eine Bindung an ein Sauerstoffatom schließen. Aufgrund der oben angegebenen Summenformel muß hier eine symmetrische Substanz vorliegen. Durch einen Vergleich mit Literaturdaten<sup>82</sup> konnte **21** als 2,5-Furandimethanol identifiziert werden.

## 2.5. Der Stamm Z6

### 2.5.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

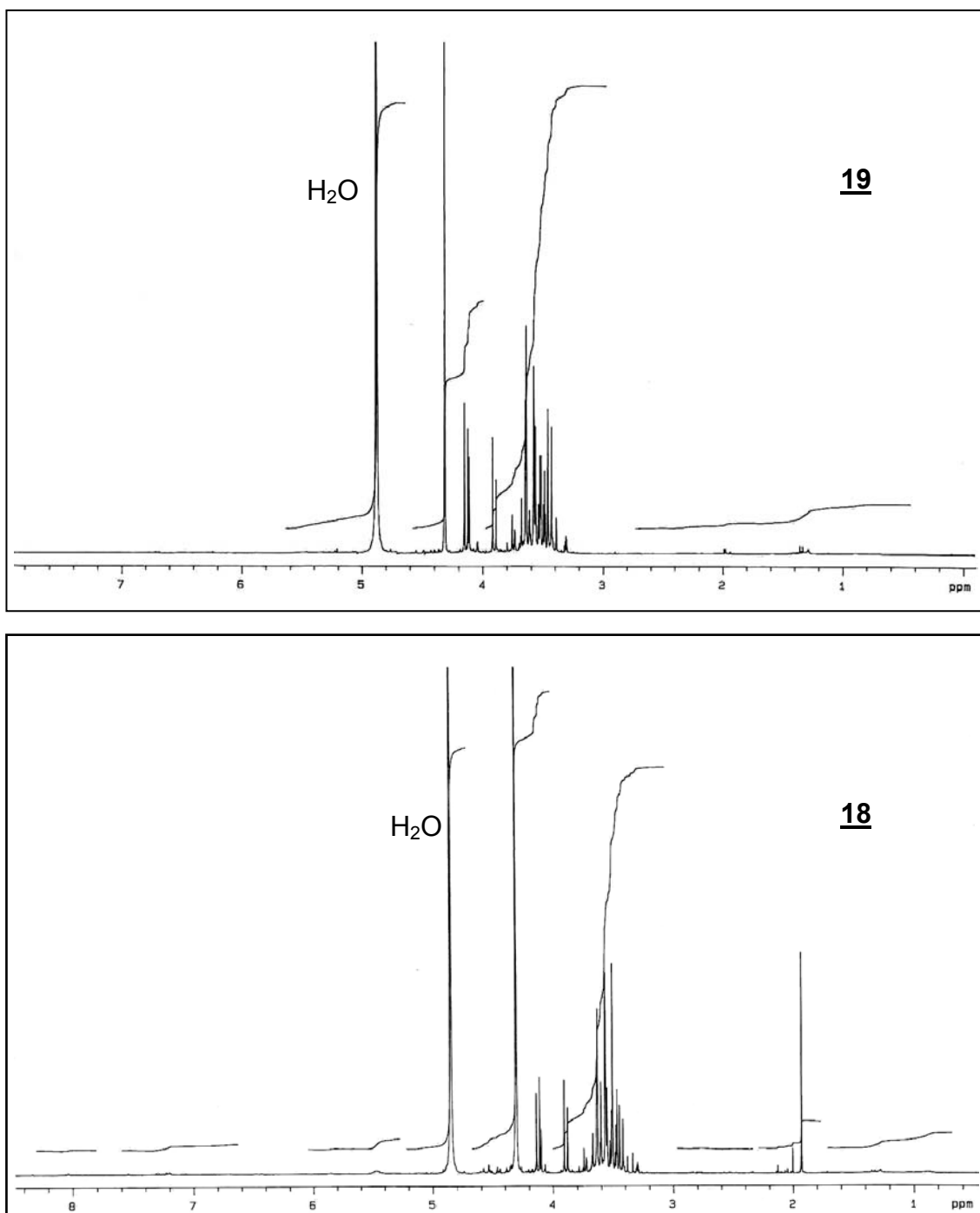
Da der Stamm Z6 im chemischen Screening zwar nicht sehr auffällig war, aber dennoch ein gewisses Potential erkennen ließ, wurde er einem weiteren Screening unterzogen. Dabei wurden wieder die Nährmedien M2, SM, SGG und Hafer verwendet, jedoch unter veränderten Bedingungen. Eine Kultivierung bei 30 °C statt der üblichen 28 °C brachte auch bei unterschiedlichen Zeiten der Probennahme keinen erkennbaren Fortschritt. Ein Zusatz von Oberflächenmaterialien zur Fermentation wurde aufgrund der guten Erfahrungen von C. Puder<sup>83</sup> getestet. Es wurden 30 g/L Erde oder XAD-2 dem Nährmedium zugesetzt, wobei die Kulturbrühe wie üblich (Abbildung 02) aufgearbeitet wurde.

Bei der Fermentation in Hafer mit Erde fiel dabei eine mit Orcin violett anfärbende Substanz (**19**) im Essigester-Extrakt auf. **19** ist nicht UV-löschend oder fluoreszierend und färbt auch mit anderen Sprühreagenzien als Orcin nicht oder kaum an. Die Isolierung erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) und anschließend an Sephadex LH-20 (Methanol). **19** wurde mit einer Ausbeute von 55 mg/L erhalten.

#### 2.5.2. Charakterisierung des gebildeten Metaboliten **19** im Vergleich zu **18**

Der von Z6 gebildete Metabolit **19** weist eine sehr große Ähnlichkeit zu der aus dem 50 L-Fermenter des Stammes Z12 isolierten Substanz **18** auf. Beide haben einen identischen  $R_f$ -Wert von 0.11 im Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (9:1) und 0.34 im Laufmittelgemisch n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und sind damit als polar einzustufen. Beide erinnern im Geruch stark an Liebstöckel ("Maggikraut") und sind weder UV-löschend noch fluoreszierend. Sie lassen sich weder mit ESI- noch mit FAB-, DCI- oder EI-MS vermessen, wobei aufgrund der hohen Polarität am ehesten im ESI-, FAB- oder auch im DCI-MS ein Ergebnis zu erwarten gewesen wäre. Eine Elementaranalyse von **19** ergab ein Verhältnis von Kohlenstoff zu Wasserstoff von eins zu zwei. Stickstoff konnte nicht nachgewiesen werden, und eine Bestimmung des Sauerstoffgehalts der Probe ist mit dieser Methode nicht möglich. Eine Kristallisation gelang bis heute nicht.

Im Protonenspektrum von **19** ist eine Vielzahl von Signalen im Bereich von  $\delta_H = 3.35$  bis  $4.32$  auszumachen, die sich größtenteils überlagern. Dabei fällt besonders das Singulett bei  $\delta_H = 4.32$  auf, da es im Vergleich zu den anderen Signalen in etwa sechs Methylengruppen entspricht. Das Protonenspektrum von **18** ist nahezu identisch, jedoch entspricht hier das Singulett bei  $\delta_H = 4.32$  in etwa 24 Methylengruppen. Zur Veranschaulichung werden die Protonenspektren von **18** und **19** in Abbildung 09 dargestellt.



**Abbildung 09** Protonenspektren von **18** und **19** in CD<sub>3</sub>OD

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **19** liegen fast alle Signale im Bereich von  $\delta_C = 63.0$  bis  $112.3$ . Dabei tritt eine Häufung im Bereich bei  $\delta_C = 64$  auf, was auf viele Sauerstoff-gebundene Kohlenstoffatome schließen lässt. Das Signal bei  $\delta_C = 66.7$  weist hier eine besonders hohe Intensität auf und ist somit den fünf Methylengruppen des Protonenspektrums zuzuordnen. Ein weiteres Signal bei  $\delta_C = 212.1$  deutet auf eine Keto-Funktion hin. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **18**



ist wiederum nahezu identisch, jedoch ist die Intensität des Signals bei  $\delta_C = 66.7$  deutlich größer und somit den 15 Methylengruppen zuzuordnen.

Das APT-NMR-Spektrum von **19** (siehe Abbildung 10) lässt nur quartäre Kohlenstoffatome und Methylengruppen für die gesuchte Struktur zu. Das gleiche gilt für das APT-NMR-Spektrum von **18**. Ein  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum brachte aufgrund der Vielzahl der sich überlagernden Protonen keine verwertbaren Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde von weiteren 2D-NMR-Experimenten Abstand genommen.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist keine genaue Aussage zu den Strukturen von **18** und **19** möglich. Lediglich das Vorhandensein einer oder mehrerer Ketogruppen gleicher Verschiebung scheint gesichert, ebenso dass aufgrund der Verschiebungen im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum mehrere Hydroxygruppen Bestandteil der Strukturen sein müssen. Da die Substanzen jedoch sehr polar sind, war ein NMR-Experiment in einem aprotischen Lösungsmittel nicht möglich. Um weitere Aussagen zu den Strukturen von **18** und **19** treffen zu können, sollte ein Derivat hergestellt werden.

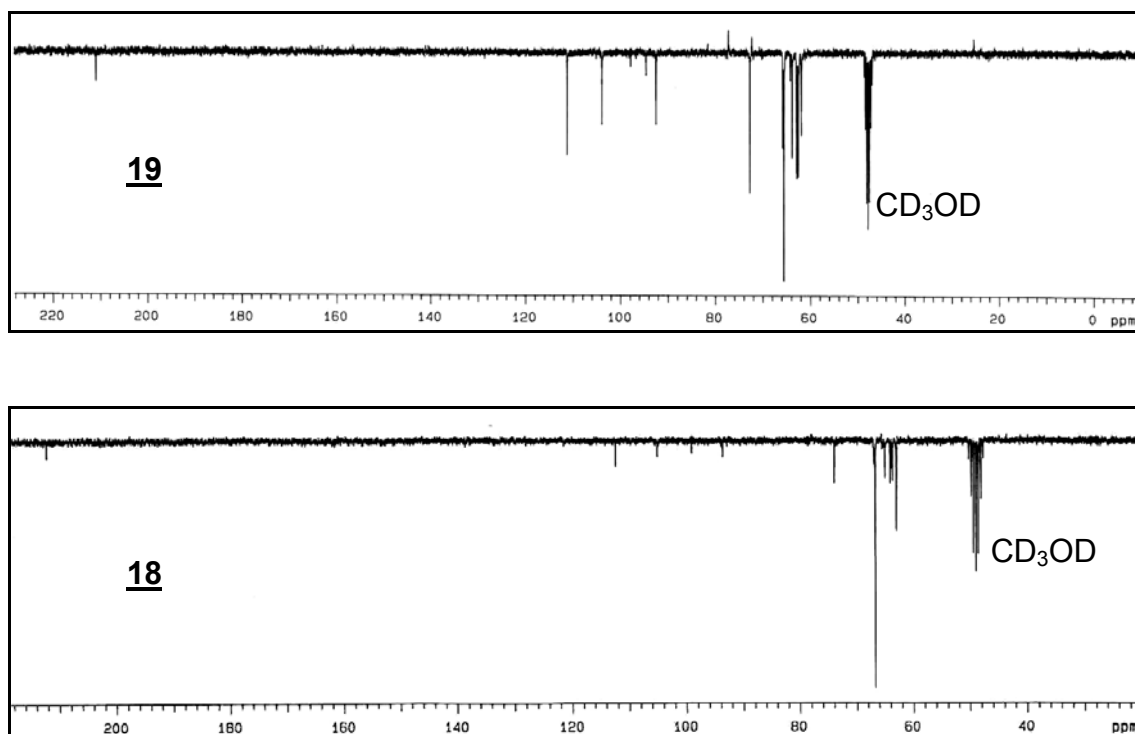


Abbildung 10 APT-NMR-Spektrum von **18** und **19** in CD<sub>3</sub>OD

### 2.5.3. Derivatisierungen von **19**

Um möglichst wenig Substanz zu verbrauchen, wurden erste Experimente im Tüpfelmaßstab durchgeführt. Somit wurde zunächst überprüft, ob die geplanten Derivatisierungen Erfolg versprechend sind.

#### **Ansätze im Tüpfelmaßstab**

Zuerst wurde eine Acetylierung von **19** mit Acetanhydrid in Dichlormethan unter Zusatz von Pyridin bei 0 °C durchgeführt. Dabei wurde gleich zu Beginn und im folgenden jede halbe Stunde ein Tropfen der Reaktionslösung im Vergleich zur Ausgangssubstanz (**19**) auf ein Dünnschichtchromatogramm getüpfelt und dieses im Laufmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (4:1) entwickelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zone von **19** im Reaktionsgemisch immer schmaler wurde und schließlich verschwand. Dagegen erschien eine weitere, wesentlich unpolare Zone, die jedoch die gleiche blaue Farbe wie **19** mit dem Sprühreagenz Orcin lieferte. Andere, deutlich schmalere, mit Orcin lila anfärbende Zonen waren ebenfalls auszumachen. Nach vier Stunden konnte die Reaktion als beendet betrachtet werden, da die Ausgangssubstanz (**19**) nicht mehr zu sehen war. Die Acetylierung sollte in größerem Maßstab wiederholt werden.

Eine weitere Acetylierung wurde mit Essigsäure bei Raumtemperatur durchgeführt. Hier waren auch nach längerer Zeit keine Veränderungen im Dünnschichtchromatogramm erkennbar. Von einer Wiederholung in größerem Maßstab wurde daher Abstand genommen.

Desweiteren wurde eine Methylierung von **19** in reinem Methanol mit FeCl<sub>3</sub>-Zusatz durchgeführt. Hier waren schon nach kurzer Zeit mehrere neue Substanzen zu erkennen, darunter auch nach längerer Zeit jedoch kein Hauptprodukt, so dass auch hier von der Wiederholung des Experiments in größerem Maßstab abgesehen wurde.

#### **Acetylierung von **19****

Die Acetylierung von 30 mg **19** erfolgte mit Acetanhydrid unter den gleichen Bedingungen wie im Tüpfelansatz beschrieben. Nach vier Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser beendet. Im

Dünnschichtchromatogramm zeigte sich wie erwartet ein unpolarer, mit Orcin blau anfärbender Hauptspot und einige kleinere, mit Orcin lila anfärbende Zonen. Das Reaktionsgemisch wurde mehrfach mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase im Vakuum eingeengt und mit Toluol koevaporiert. Es folgte eine Aufreinigung an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (95:5) und anschließender Chromatographie an Sephadex LH-20 (Dichlormethan). Man erhielt das Hauptprodukt (**22**) der Derivatisierung mit einer Ausbeute von 15 mg.

Der Substanz **22** konnte anhand von DCI- und ESI-MS eine Molmasse von 174 g/mol zugewiesen werden. Im Protonenspektrum sind zwei Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 2.17$  und 4.78 zu sehen, wobei anhand der Integrale das erste einer Methyl- und das zweite einer Methylengruppe zuzuweisen ist. Die Methylgruppe sollte der eingeführten Acetylgruppe entstammen. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt vier Signale, wobei das bei  $\delta_{\text{C}} = 20.4$  dem der Methylgruppe und das Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 66.5$  dem der Methylengruppe des Protonenspektrums entspricht. Die anderen beiden Signale mit Verschiebungen von  $\delta_{\text{C}} = 170.2$  und 198.3 deuten auf Carbonylgruppen hin, wobei erstere der Acetylgruppe des reagierten Acetanhydrids entstammen dürfte.

Durch Kombination von Massen- und NMR-Spektroskopie wird deutlich, dass es sich bei **22** um eine symmetrische Substanz, nämlich 1,3-Diacetoxyacetondiacetat handeln muss. Die beiden Acetylgruppen sollten dabei aus Acetanhydrid stammen, so dass als Bestandteil von **19** Dihydroxyaceton (**23**) übrig bleibt (Abbildung 11). Dabei kann man bei einem Einsatz von 30 mg **19** und einer Ausbeute von 15 mg **22** von einem Dihydroxyaceton-Gehalt von mindestens 26 % ausgehen, wobei die Verluste durch die Aufreinigung nicht berücksichtigt sind.

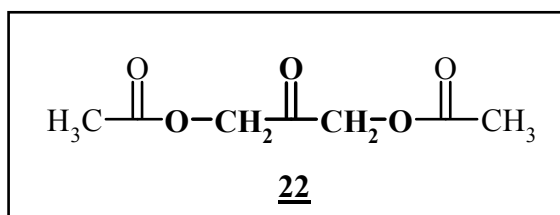
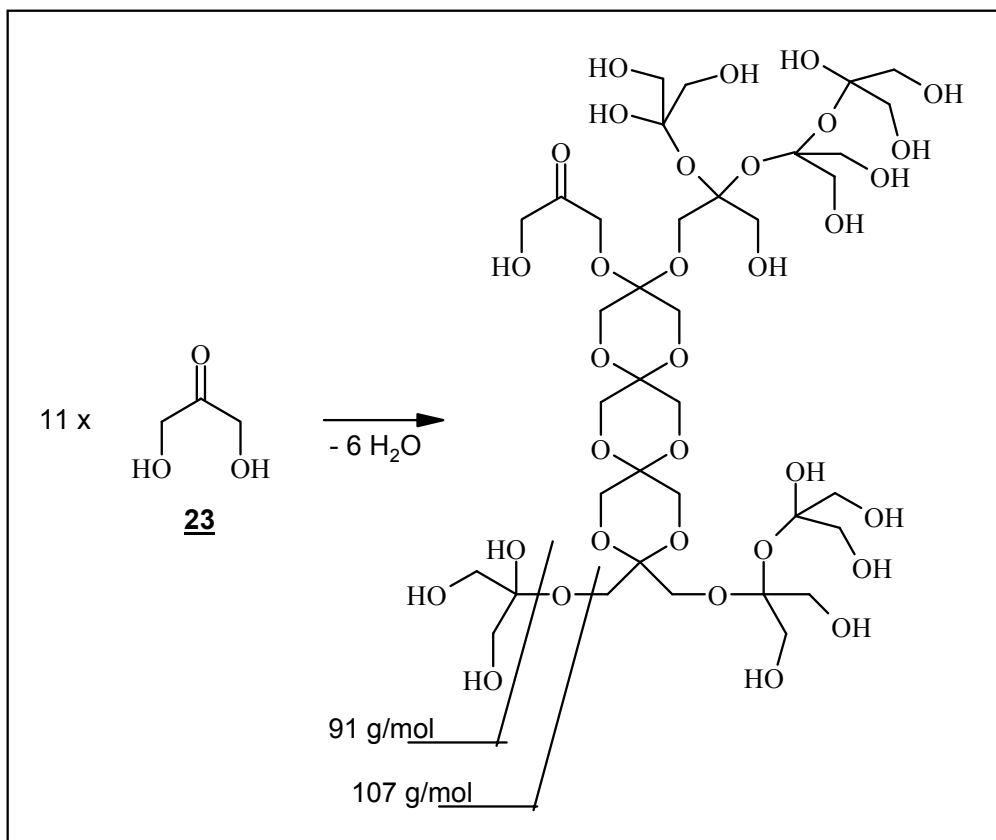


Abbildung 11 Hauptprodukt der Acetylierung von **19**

Da **19** nur quartäre und Methylen-Kohlenstoffatome enthält, könnte es sich hier um ein Polykondensat aus Dihydroxyaceton (**23**) handeln. Das Singulett im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 4.32 lässt sich durch einen hochsymmetrischen Teil im Molekül erklären. Jedoch muss die Substanz ebenso unsymmetrische Anteile enthalten, da im Bereich von 3.35 bis 4.17 des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums eine Häufung von Signalen zu beobachten ist. Daraus lassen sich Strukturvorschläge für **19** ableiten, die aufgrund der bisher nicht bestimmbar Molmasse jedoch nicht bewiesen werden können.



**Abbildung 12 Strukturvorschlag für **19****

Im FAB-Massenspektrum von **19** (siehe Abbildung 13) sind Bruchstücke zu erkennen, die sich um 91 und 107 g/mol unterscheiden. Diese können Teilen der in Abbildung 12 dargestellten Struktur zugeordnet werden und untermauern somit die Theorie, dass **18** und **19** Oligomere von Dihydroxyaceton sind. Dabei ist eine Säure- oder Basen-induzierte Polykondensation von Dihydroxyaceton auszuschließen, da **18** aus der Kulturbrühe des 50 L Fermenters isoliert wurde.

Diese erfolgte in einem pH-Bereich von  $6.5 \pm 1.5$ , wobei der Ernte-pH bei 7.9 lag.

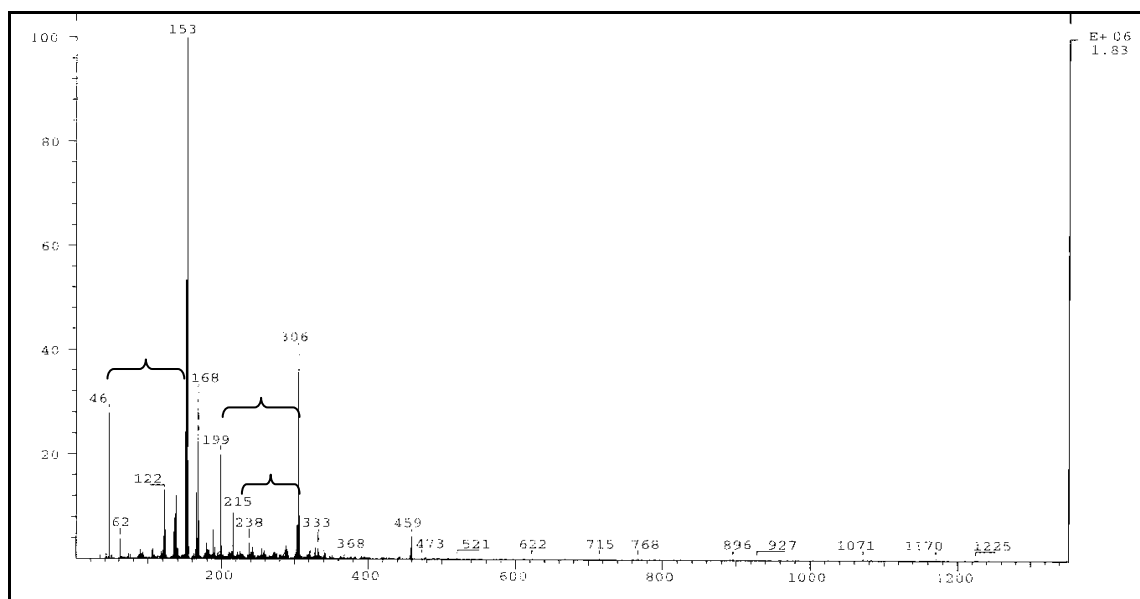


Abbildung 13 FAB-MS von 19

## 2.6. Der Stamm Ku2

### 2.6.1. Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten

Der Stamm Ku2 fiel im chemischen Screening im Hafermedium durch die Bildung einer mit Anisaldehyd rosa anfärbenden Zone auf.

Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 180 rpm in 300 mL-Schüttelkolben mit Schikane, befüllt mit 100 mL Nährlösung. Dem Schema in Abbildung 02 folgend, erhielt man den Essigester- und den Aceton-Extrakt. Diese wurden vereinigt, da die gesuchte Substanz in beiden Extrakten enthalten war. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (9:1) und anschließend an Sephadex LH-20 (Methanol) aufgereinigt. Man erhielt das Alkaloid TM-64 (24) mit einer geringen Ausbeute von 0.3 mg/L.

2.6.2. Charakterisierung des Alkaloids TM-64 (**24**)

Der weiße Feststoff hat laut EI- und ESI-MS eine Masse von 314 g/mol. Aufgrund der geringen Ausbeute ließ sich nur ein  $^1\text{H}$ - aber kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum messen.

Im Hochfeldbereich des Protonenspektrums lassen sich neben den Signalen einer Methin- und zweier Methylengruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 3.08, 3.70$  und  $4.32$  das mit einer Kopplungskonstante von  $J = 7.0$  Hz zum Dublett aufspaltende Signal einer Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 1.52$  ausmachen. Im Tieffeldbereich sind die Signale vier benachbarter aromatischer Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 7.00, 7.10, 7.14$  und  $7.62$  und ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}} = 8.09$  zu sehen. Im  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum ließen sich die in Abbildung 14 dargestellten Teilstrukturen formulieren. Mit den Informationen aus Massen- und NMR-Spektroskopie wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt. Durch Vergleich mit den Literaturdaten<sup>84</sup> konnte die Substanz als Alkaloid TM-64 (**24**) identifiziert werden. Diese Verbindung ist bisher nur als Metabolit aus einem Endosymbionten<sup>84</sup> und einem thermophilen Actinomyceten<sup>85,86</sup> beschrieben worden. Für **24** ist eine lokalanästhetische Wirkung am Auge bekannt.

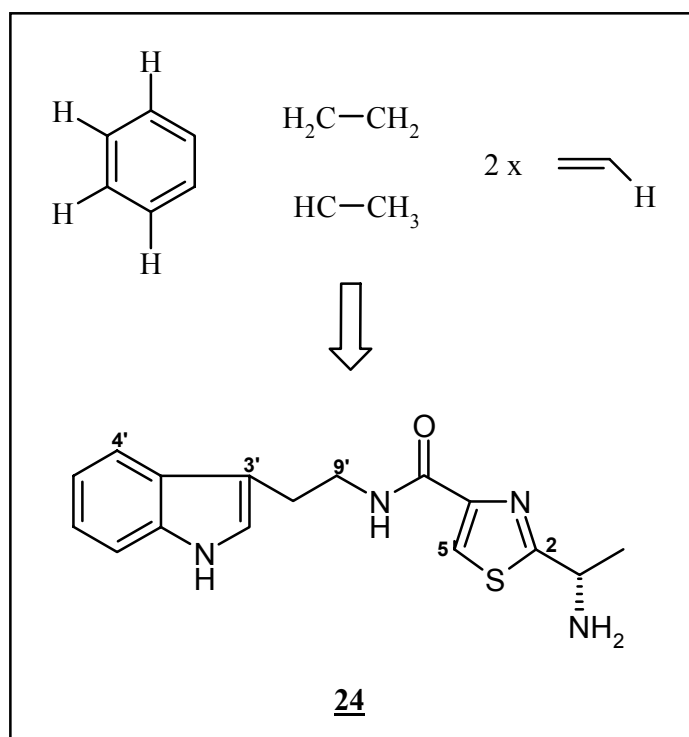


Abbildung 14 Aus dem  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von **24** abgeleitete Fragmente

### 3. Pyridomycinol (25)

#### 3.1. Stammbeschreibung und Isolierung

Der Sekundärmetabolit 25 wurde aus dem Stamm Tü 6252 (*Streptomyces aureofaciens*) isoliert, welcher in den Isolaten einer brasilianischen Bodenprobe aufgefallen ist. Der Extrakt dieses Stammes erwies sich im biologischen Screening des AK Fiedler (Universität Tübingen) als wirksam gegen Gram-positive und -negative Bakterien und hemmte das Wachstum der Grünalge *Chlorella fusca*. Aus dem Kulturfiltrat konnten drei Substanzen isoliert werden, Pyridomycin (26) und Pyridomycinalkohol (27) hatte M. Holzenkämpfer in ihrer Dissertation<sup>87</sup> beschrieben. Es galt nun, die dritte Substanz (25) in ihrer Struktur aufzuklären.

#### 3.2. Strukturaufklärung von 25

Der weißen Feststoff, der einen  $R_f$ -Wert von 0.62 (Chloroform/Methanol 9:1) aufweist, hat die Summenformel  $C_{27}H_{34}N_4O_9$  (HREI-MS). Im Vergleich zu Pyridomycin (26) sind zwei Wasserstoffatome und ein Sauerstoffatom mehr vorhanden. Ein Vergleich der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektren beider Substanzen macht deutlich, dass die Doppelbindung in 26 zwischen C-2 und C-1' in 25 hydratisiert vorliegt (siehe Abbildung 15). 25 ist ein neues Derivat von Pyridomycin (26), es wurde aufgrund der hydratisierten Doppelbindung Pyridomycinol genannt.

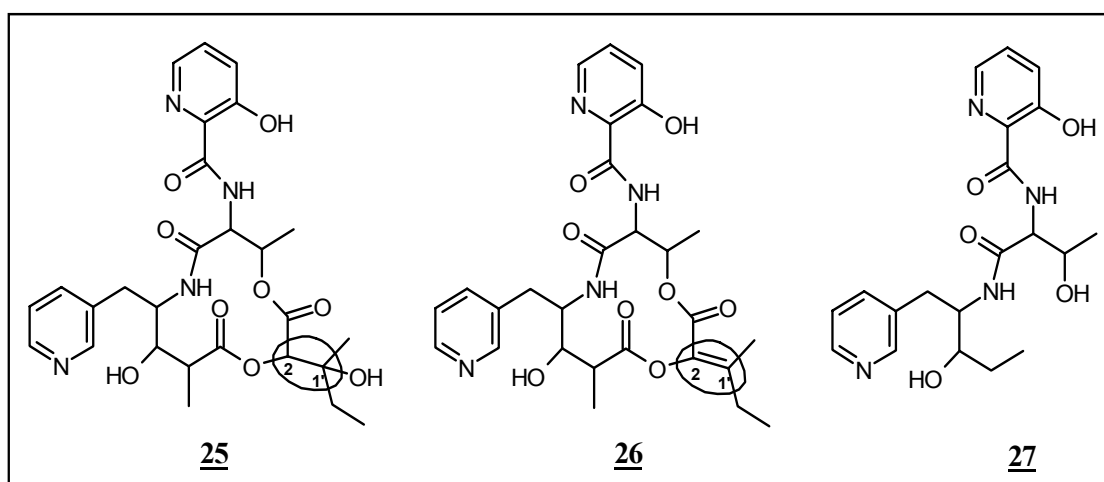


Abbildung 15 Vergleich von Pyridomycinol (25), Pyridomycin (26) und Pyridomycinalkohol (27)

#### 4. Diskussion und Ausblick

Im Rahmen der Untersuchungen der Streptomyceten wurden Stämme unterschiedlicher Herkunft untersucht. Die terrestrischen Vertreter stammen von zum Teil sehr ungewöhnlichen, bisher nicht untersuchten Orten (Abraum von Tennisplätzen). Dabei wurden neue, interessante Substanzen erwartet. Die Dünnschichtchromatogramme zeigten jedoch kein ausgeprägtes Metabolitenspektrum. Die Mikroorganismen einer Bodenprobe zeigten ein sehr ähnliches Metabolitenmuster. Die Stämme Z6 und Z12 wurden aus einer Bodenprobe, die unter einer Zeder entnommen wurde, isoliert. Beide produzieren sehr ähnliche Metabolite, die bisher noch nicht eindeutig in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Die weitere Bearbeitung erfordert neben der Derivatisierung auch Kristallisationsversuche.

Der Stamm Ägy-rot aus dem Wüstensand Ägyptens zeigte einige sehr interessante Sekundärmetabolite. Durch einen größeren Fermentationsansatz könnte es gelingen, weitere Derivate der Verbindungsklasse der Anthracycline in ausreichender Menge zu erhalten. Auch eine Veränderung der Kultivierungsparameter könnte stille Biosynthesegene aktivieren.

Aus dem Stamm Z12 ließ sich, jedoch nicht reproduzierbar, ein Antimycin isolieren. Durch Variation der Kultivierungsparameter könnten sich auch hier die Biosynthesegene der Sekundärstoffproduktion wieder aktivieren lassen.

Die Streptomyceten mariner Herkunft erwiesen sich als eher mäßige Naturstoffproduzenten. Es ist bekannt, dass sich die Kultivierung der Mikroorganismen und die Isolierung der häufig nur in sehr geringen Mengen vorhandenen Naturstoffe oft sehr schwierig gestalten. Eine Untersuchung der Stämme mit Gensonden nach Sekundärstoffbiosynthesegenen würde die Auswahl der zu bearbeitenden Mikroorganismen erleichtern. Außerdem könnten sich so Hinweise ergeben, von welcher Substanzklasse Sekundärmetabolite zu erwarten wären.



### III Pilze

#### 1. Screening von Pilzen

##### 1.1. Screeningmethoden

Die Methoden beim Screening von Pilzen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Streptomyceten (siehe Kapitel II). Auch hier kann ein chemisches oder ein biologisches Screening durchgeführt werden, ebenso ist eine Kombination beider Methoden möglich. Dabei finden sich bei Pilzen im Vergleich zu Streptomyceten vielfach andere Substanzklassen, da die Biosynthesegene recht unterschiedlich sind. Zu nennen sind hier beispielsweise die Penicillin-Antibiotika mit der strukturellen Besonderheit des  $\beta$ -Lactamrings oder die Aflatoxine<sup>88</sup> mit Sauerstoff-Heterocyclen als Strukturmerkmale.

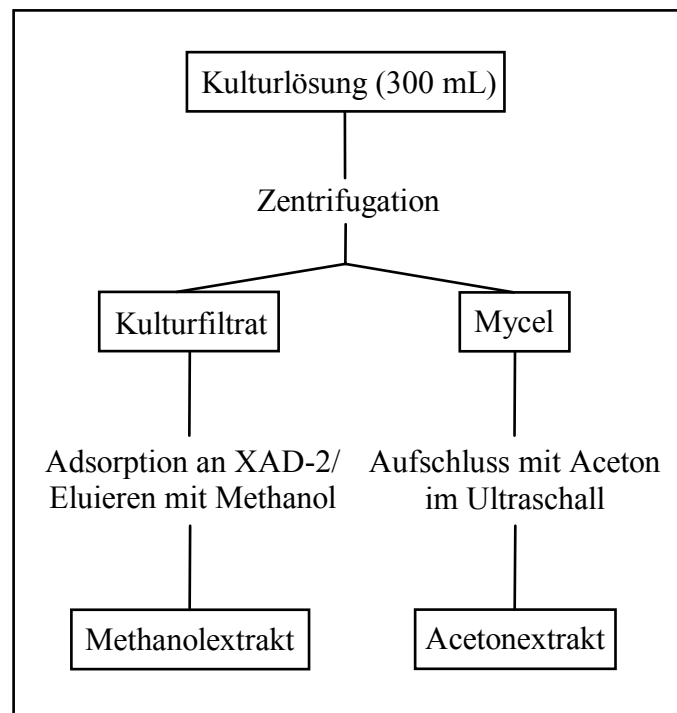
##### 1.2. Chemisches Screening der bearbeiteten Stämme

Um einen Überblick über das Metabolitenmuster zu erhalten, erfolgte die Kultivierung in acht verschiedenen Nährmedien: 1158, E2, G20, SGG, SM, 1549, Marine Broth (MB) und 1405a. Es wurden größtenteils komplexe Medien möglichst unterschiedlicher Zusammensetzung ausgewählt. Dabei enthält z.B. 1549 Fleischextrakt und 1405a nur definierte Nährmedienbestandteile.

Temperatur und Belüftung wurden konstant bei für Pilze im allgemeinen günstigen Bedingungen gehalten. Je Nährmedium wurden vier Kolben kultiviert, um eventuelle Unregelmäßigkeiten ausgleichen zu können. Zwei Kolben wurden nach vier Tagen und die restlichen zwei Kolben nach sechs Tagen Fermentationsdauer aufgearbeitet, da besonders bei Pilzen der Zeitpunkt der Sekundärstoffproduktion sehr unterschiedlich sein kann.

Nach Abbildung 16 erfolgte die Aufarbeitung der Kulturbrühen. Die so erstellten Extrakte wurden jeweils in 3 mL Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen und 5  $\mu$ L dieser Lösung auf HPTLC-Kieselgelplatten aufgetragen. In den Laufmittelgemischen Chloroform/Methanol (9:1) und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) wurden die Chromatogramme entwickelt. Die Detektion erfolgte anhand der Eigenfarbe bei farbigen Substanzen, mittels UV-Absorption/Fluoreszenz bei 254 und 366 nm sowie durch das Anfärbeverhalten mit unterschiedlichen

Sprühreagenzien. UV-Absorption und Fluoreszenz wurden ebenso wie das Anfärbeverhalten fotografisch dokumentiert.



**Abbildung 16 Aufarbeitungsschema für Pilze**

### 1.3. Herkunft und Stammauswahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht Pilzstämme untersucht, die alle aus Bryozoen isoliert wurden. Dabei wurden die Stämme A1, A2, A3, A4, A5 und B3 aus *Flustra foliacea* und MH11 und MH13 aus *Tubulipora liliacea* erhalten und sind somit als Mikroorganismen mariner Herkunft zu betrachten. Gattung bzw. Gruppe sind in Tabelle 03 wiedergegeben. Die Stämme wurden jeweils auf E2- und 1158-Agarplatten inkubiert und im folgenden auf der am besten bewachsenen Platte überimpft. Alle acht Stämme wurden wie oben angegeben dem chemischen Screening unterzogen, wobei anschließend die Stämme A2, A4, A5, MH11 und MH13 zur weiteren Bearbeitung ausgewählt wurden.

| Stamm | Gattung/Gruppe            | E2 | 1158  | G20   | SM    | SGG | 1549 | MB   | 1405<br>a |
|-------|---------------------------|----|-------|-------|-------|-----|------|------|-----------|
| A1    | <i>Acremonium Murorum</i> | +  | +     | +     | +     | +   | +    | +    | +         |
| A2    | <i>Metarrhizium</i>       | ++ | +     |       | +++++ | +   | +    | +    | +         |
| A3    | Coelomycetes              | ++ | +     | +     | +     | ++  | +    | +    | +         |
| A4    | <i>Trichoderma</i>        | +  | ++++  | ++    | +     | +   | ++   | +    | +         |
| A5    | Zygomycota                | ++ | +++++ | +     | +     | ++  | +    | +    | ++        |
| B3    | <i>Trichoderma</i>        | +  | +     | +     | +     | +   | +    | +    | +         |
| MH11  | Hefe                      | +  | +     | ++    | +     | +   | +    | ++++ | +         |
| MH13  | schwarze Hefe             | +  | +     | +++++ | ++    | +   | ++   | +    | +         |

**Tabelle 03 Bewertung der bearbeiteten Pilz-Stämme (mit +++++ = sehr gutes Metabolitenspektrum bis + = kaum vorhandenes Metaboliten-spektrum)**

Da die Stämme A1 - A5 und B3 aus der selben Bryozoe isoliert wurden, sollte untersucht werden, ob sich unter Laborbedingungen Interaktionen feststellen lassen. Dazu wurden auf E2- und 1158-Agarplatten jeweils zwei Stämme gegeneinander ausgestrichen. Dabei fiel besonders der Stamm A4 auf, der die anderen meist vollständig überwuchs. Es wurde daher eine antifungische Aktivität vermutet. Die Extrakte des Stammes wurden im Plattendiffusionstest auf antibakterielle und antifungische Wirkung untersucht, es konnte jedoch keine Aktivität festgestellt werden. Auch eine Mischfermentation von A4 mit B3 brachte keine neuen Zonen im Dünnschichtchromatogramm.

## 2. Pilze mit auffälligem Metabolitenmuster

### 2.1. Der Stamm A5

#### 2.1.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Methanol-Extrakt der 1158-Nährlösung des Stammes A5 fiel im chemischen Screening durch eine Substanz leuchtend gelber Eigenfarbe auf. Diese war nach 96 h am intensivsten.

Der Stamm wurde bei 28 °C und 100 spm in 1 L-Schüttelkolben ohne Schikane, befüllt mit 150 mL der 1158-Nährlösung, über 96 h fermentiert. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Abbildung 16, wobei der Aceton-Extrakt

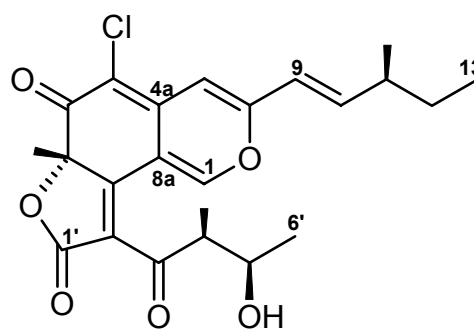
verworfen wurde. Der Methanol-Extrakt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (100:1 bis 95:5) und anschließender Auftrennung an Sephadex LH-20 (Methanol) unterzogen. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte an Kieselgel mit einem Essigester/Cyclohexangemisch (1:1) und ergab Chaetoviridin A (**28**) mit einer Ausbeute von 31.0 mg/L.

Eine Ruhefermentation des Stammes bei 28 °C in P-Kolben befüllt mit 1 L 1158-Nährlösung über 30 Tage zeigte die Bildung einer neuen Zone, wobei **28** im Dünnschichtchromatogramm nicht mehr sichtbar war. Diese neue Zone zeigte ähnliche Eigenschaften wie **28**, war jedoch polarer und färbte eher gelb als orange-gelb mit Anisaldehyd an. Die Kulturbrühe wurde nach Abbildung 16 aufgearbeitet. Da die gesuchte Zone sowohl im Methanol- als auch im Aceton-Extrakt zu sehen war, wurden beide zur weiteren Bearbeitung vereinigt. Es folgte eine Chromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (95:5 bis 4:1), anschließend mit einem Essigester/Cyclohexangemisch (1:1) und abschließender Aufreinigung an Sephadex LH-20 (Aceton). Chaetoviridin B (**29**) konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 22.7 mg/L isoliert werden.

### 2.1.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

#### Chaetoviridin A (**28**)

Der orange-gelbe Feststoff, der einen Schmelzpunkt von 121 °C aufweist und optisch aktiv ist, besitzt eine Molmasse von 433 g/mol (EI- und ESI-MS). Die Hochauflösung des Molpeaks im EI-MS führt zur Summenformel  $C_{23}H_{25}ClO_6$ .



**28**

Im Protonenspektrum sind fünf Methylgruppen sowie eine Methylengruppe im Bereich von  $\delta_H = 0.92$  bis 1.70 zu erkennen. Das breite Singulett bei  $\delta_H = 2.28$  spricht für eine aliphatisch gebundene Hydroxygruppe. Außerdem sind drei Methingruppen im Bereich von  $\delta_H = 2.30$  bis 3.86 und weitere vier Methingruppen im Bereich von  $\delta_H = 6.10$  bis 8.80 zu sehen. Dabei erscheint die

Tieffeld-Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 8.80$  als sehr hoch und deutet auf einen Heterocyclus hin.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bestätigt die Ergebnisse des Protonenspektrums und fügt zehn quartäre Kohlenstoffatome hinzu. Anhand der Summenformel und der NMR-spektroskopischen Daten wurde eine Struktursuche in Antibase durchgeführt. Ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>89</sup> identifizierte **28** als Chaetoviridin A. Diese Verbindung wurde erstmals 1990 aus dem Pilz *Chaetomium globosum* var. *flavo-viridae* isoliert. Chaetoviridin A (**28**) inhibiert mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $31.6 \mu\text{M}$  das Cholesteryl Ester Transfer Protein. Dieses Protein fördert den Austausch und Transfer von Neutralfetten wie z.B. Cholesterin zwischen Plasmaproteinen<sup>90</sup>.

### Chaetoviridin B (**29**)

Diese Substanz wies eine große Ähnlichkeit zu **28** auf, war jedoch eher von gelber Eigenfarbe. EI-, DCI- und auch ESI-MS ergaben eine Molmasse von  $435 \text{ g/mol}$ . Die NMR-Daten von **29** waren denen von Chaetoviridin A (**28**) sehr ähnlich und ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>89</sup> zeigte eine fast 100 %ige Übereinstimmung mit den NMR-daten von Chaetoviridin B (siehe Tabelle 04).

Jedoch stimmten die Angaben der Molmassen nicht überein. Die Literaturangabe war mit  $453 \text{ g/mol}$  um 18 Einheiten größer als die hier beschriebene, die mit drei verschiedenen Messmethoden bestimmt wurde. Eine nochmalige Aufnahme des Protonenspektrums brachte die Gewissheit, dass die isolierte Substanz **29** sich nicht verändert hatte.

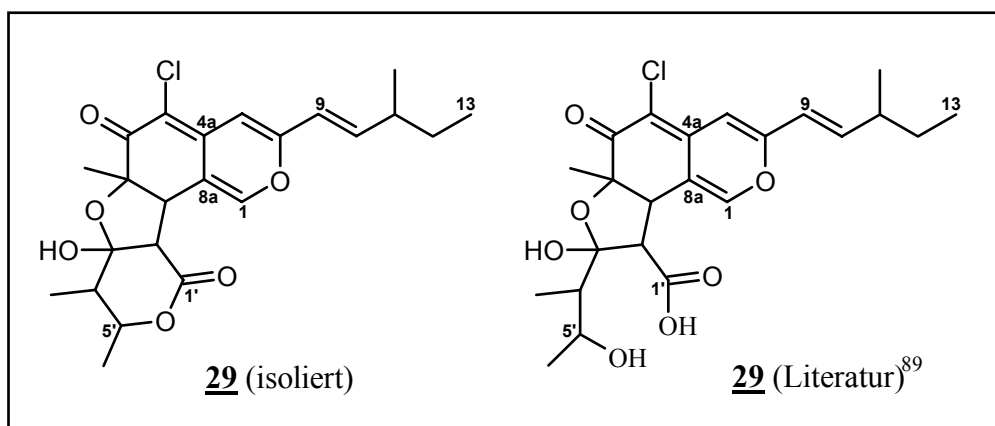
Die Strukturformel von Chaetoviridin B (**29**) in der Literatur zeigt eine Hydroxygruppe an Position C-5', welche durch Ausbildung eines  $\delta$ -Lactonringes mit der Carboxylgruppe an C-1' unter Wasserabspaltung reagieren könnte. Somit wäre die Massendifferenz von 18 Einheiten zu erklären. Diese Hypothese konnte anhand eines HMBC-Spektrums nicht bewiesen werden, da keine Kopplung von C-1' mit  $\delta_{\text{C}} = 170.8$  auf das Proton an C-5' mit  $\delta_{\text{H}} = 4.32$  zu erkennen war. Eine Simulation der vorgeschlagenen Strukturen für Chaetoviridin B mit dem Programm ACD Labs<sup>91</sup> ergab jedoch für das C1'-Atom der Literatur eine Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 175.1$ , und für die hier vorgeschlagene Struktur eine Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 168.5$ .

|                          | <b>29 (isoliert)</b><br><b><sup>1</sup>H-NMR<sup>a</sup></b> | <b>29 (Literatur)</b><br><b><sup>1</sup>H-NMR<sup>b</sup></b> | <b>29 (isoliert)</b><br><b><sup>13</sup>C-NMR<sup>a</sup></b> | <b>29 (Literatur)</b><br><b><sup>13</sup>C-NMR<sup>b</sup></b> |
|--------------------------|--|---|---|--|
| <b>C-1</b>               | 7.30   | 7.30  | 145.6   | 145.7  |
| <b>C-3</b>               | -  | -   | 157.7   | 157.8  |
| <b>C-4</b>               | 6.55   | 6.55  | 104.9   | 105.0  |
| <b>C-4a</b>              | -  | -   | 140.5   | 140.6  |
| <b>C-5</b>               | -  | -   | 109.9   | 110.1  |
| <b>C-6</b>               | -  | -   | 189.1   | 189.3  |
| <b>C-7</b>               | -  | -   | 83.6  | 83.9   |
| <b>C-8</b>               | 3.01   | 3.01  | 50.2  | 50.5   |
| <b>C-8a</b>              | -  | -   | 114.3   | 114.4  |
| <b>C-9</b>               | 6.06   | 6.06  | 120.1   | 120.2  |
| <b>C-10</b>              | 6.53   | 6.53  | 146.7   | 146.9  |
| <b>C-11</b>              | 2.26   | 2.26  | 38.8  | 38.9   |
| <b>C-12</b>              | 1.43   | 1.43  | 29.7  | 29.2   |
| <b>C-13</b>              | 0.91   | 0.91  | 11.6  | 11.7   |
| <b>7-CH<sub>3</sub></b>  | 1.40   | 1.40  | 23.3  | 23.4   |
| <b>11-CH<sub>3</sub></b> | 1.08   | 1.08  | 19.3  | 19.4   |
| <b>C-1'</b>              | -  | -   | 170.8   | 170.8  |
| <b>C-2'</b>              | 3.07   | 3.07  | 58.1  | 58.3   |
| <b>C-3'</b>              | -  | -   | 104.0   | 104.1  |
| <b>C-4'</b>              | 1.91   | 1.91  | 44.9  | 45.0   |
| <b>C-5'</b>              | 4.32   | 4.32  | 77.4  | 77.3   |
| <b>C-6'</b>              | 1.41   | 1.41  | 18.6  | 18.7   |
| <b>3'-OH</b>             | 3.19   | 3.19  | -   | -  |
| <b>4'-CH<sub>3</sub></b> | 1.14   | 1.14  | 8.7   | 8.8  |
| <b>5'-OH</b>             | 1.86   | 1.86  | -   | -  |

**Tabelle 04 Vergleich der gemessenen NMR-Daten von 29 mit denen der Literatur<sup>89</sup> (<sup>a</sup> 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

Wenn man die Massendifferenz von 18 Einheiten bei drei verschiedenen Messmethoden und die kleinere Differenz der Verschiebung des C-1'-Atoms bei Ringschluss zum Lacton berücksichtigt, so ist die hier vorgeschlagene Struktur wahrscheinlicher. Die in der Literatur angegebene<sup>89</sup> und die hier ermittelte Struktur von 29 werden in Abbildung 17 dargestellt.

Chaetoviridin B (29) inhibiert ebenso wie Chaetoviridin A (28) das Cholesteryl Ester Transfer Protein<sup>90</sup>. Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von <6.2 μM ist seine Aktivität größer als die von 28.



**Abbildung 17 Strukturvorschlag und Literaturangabe von 29**

## 2.2. Der Stamm A2

### 2.2.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm A2 fiel im chemischen Screening durch die Bildung zweier mit Orcin blau anfärbenden Substanzen im Aceton-Extrakt und einer mit Anis braun anfärbenden Zone im Methanol-Extrakt des Nährmediums SM auf. Der Stamm wurde bei 28 °C und 100 spm in 1 L-Schüttelkolben ohne Schikane, befüllt mit 150 mL des SM-Nährmediums über 96 h fermentiert. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Abbildung 16.

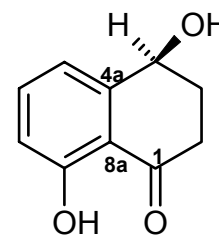
Der Methanol-Extrakt wurde an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (95:5) und anschließend mit einem Essigester/Cyclohexan/Methanolgemisch (10:8:1) aufgetrennt. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte an Sephadex G-10 (Methanol) und Isoscleron (30) konnte mit einer Ausbeute von 0.8 mg/L isoliert werden.

Die Aufreinigung des Aceton-Extraktes begann mit einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (100:1 bis 4:1). Dabei erhielt man die beiden Fraktionen F1 und F2. Beide wurden getrennt jeweils an Kieselgel mit einem Essigester/Methanolgemisch (8:2) und an Sephadex G-10 (Methanol) aufgetrennt. Dabei konnten aus F1 Adenosin (31) (0.4 mg/L) und aus F2 Uridin (32) (1.9 mg/L) isoliert werden.

## 2.2.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

### Isoscleron (**30**)

Die in Form eines weißen Feststoffes erhaltene Substanz färbt mit Orcin blaugrau, mit Anisaldehyd blau und mit Ehrlichs Reagenz hellgrau an. Sie ist UV-löschend und fluoresziert gelb. Aus dem DCI-MS ergab sich eine Molmasse von 178 g/mol.



**30**

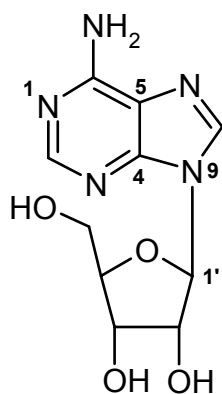
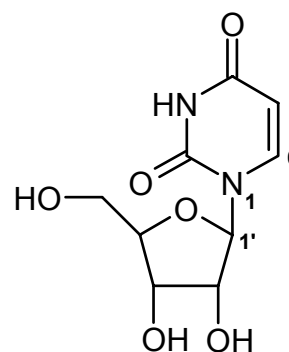
Im Protonenspektrum lassen sich zwei Methylengruppen bei  $\delta_H = 2.17 / 2.33$  und  $2.63 / 2.98$  als Multipletts ausmachen. Die Tieffeld-Verschiebung der Methingruppe bei  $\delta_H = 4.89$  lässt den Rückschluss auf ein benachbartes Sauerstoffatom zu. Weitere drei Methingruppen bei  $\delta_H = 6.69, 7.00$  und  $7.47$  sind erkennbar und aufgrund der starken Tieffeld-Verschiebung als aromatisch anzusehen. Das Singulett bei  $\delta_H = 12.40$  lässt sich einer Hydroxygruppe zuordnen.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum werden die Ergebnisse des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums bestätigt, und es lassen sich weitere vier quartäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_C = 116.5, 148.5, 163.7$  und  $206.2$  zuordnen. Das Signal bei  $\delta_C = 206.2$  ist dabei typisch für Keto-Funktionen. Mit diesen Informationen konnte eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt werden. Der anschließende Vergleich mit Literaturdaten<sup>92,93</sup> identifizierte **30** als Isoscleron. **30** gehört somit zu den Trihydroxytetralonen, typischen Pilzmetaboliten, und weist eine phytotoxische Aktivität auf.

### Adenosin (**31**) und Uridin (**32**)

Beide Substanzen weisen Übereinstimmungen auf. Sie färben beide mit Orcin blau an, sind UV-löschend und fluoreszierend. Für **31** wurde im EI-MS eine Molmasse von 267 g/mol ermittelt. Die Hochauflösung des Molpeaks ergab die Summenformel  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ . **32** hat laut EI- und DCI-MS eine Molmasse von 244 g/mol. Die Hochauflösung des Molpeaks im EI-Massenspektrum ergab die Summenformel  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ .



**31****32**

Im Protonenspektrum von **31** sind die typischen Signale einer Stickstoff-verknüpften Pentose mit Verschiebungen bei  $\delta_{\text{H}} = 3.55 / 3.65$  für eine Methylengruppe und  $\delta_{\text{H}} = 3.95, 4.14, 4.59$  und  $5.87$  für vier Methingruppen zu erkennen. Im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 5.43$  bis  $5.81$  sind drei OH-Gruppen sichtbar. Die Signale der Pentose sind auch im Protonenspektrum von **32** mit kleinen Abweichung wiederzufinden. Dazu kommen bei **31** noch zwei Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 8.12$  und  $8.33$  und das Signal einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 7.26$ . Bei **32** dagegen finden sich bei  $\delta_{\text{H}} = 5.61$  und  $7.85$  zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von  $J = 8.0$  Hz, sowie das breite Singulett einer NH-Gruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 11.20$ .

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **31** kommen zu den laut Protonenspektrum erwarteten Signalen die der quartären Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 119.3, 149.0$  und  $156.0$  dazu. Im Spektrum von **32** sind zwei quartäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 150.8$  und  $163.2$  zu sehen. Mit diesen Informationen wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt, und anschließend anhand von Literaturdaten **31** als Adenosin<sup>94</sup> und **32** als Uridin<sup>95</sup> identifiziert. **31** und **32** sind als Intermediate des Nucleotidstoffwechsels bekannt und könnten aus dem im Nährmedium SM enthaltenen Sojamehl stammen.

### 2.3. Der Stamm MH13

#### 2.3.1. Fermentation und Isolierung der gebildeten Metabolite

Der Stamm MH13 fiel im chemischen Screening durch die Bildung von vier Zonen im Methanol-Extrakt der Nährlösung G20 auf, die nach 96 h die

höchsten Konzentrationen erreichten. Es zeigten sich im Dünnschichtchromatogramm eine mit Anisaldehyd rosa und drei dunkelbraun anfärbende Zonen unterschiedlicher Polarität. Im Aceton-Extrakt konnten keine Metabolite detektiert werden.

Die Fermentation erfolgte bei 28 °C und 100 rpm in 1 L-Schüttelkolben ohne Schikane, befüllt mit 150 mL des SM-Nährmediums über 96 h. Die Kulturbrühe wurde nach Abbildung 16 aufgearbeitet, wobei der Aceton-Extrakt verworfen wurde. Die Aufreinigung der Substanzen folgte Abbildung 18. So konnten  $\alpha$ -Acetylorscinol (**33**), Indolessigsäure (**34**), *cis*-4-Hydroxyscytalon (**35**) und ein Gemisch aus Scytalon (**36**) und 6-Hydroxyisoscleron (**37**) isoliert werden. Eine weitere Trennung des Gemisches aus **36** und **37** erwies sich als nicht möglich.

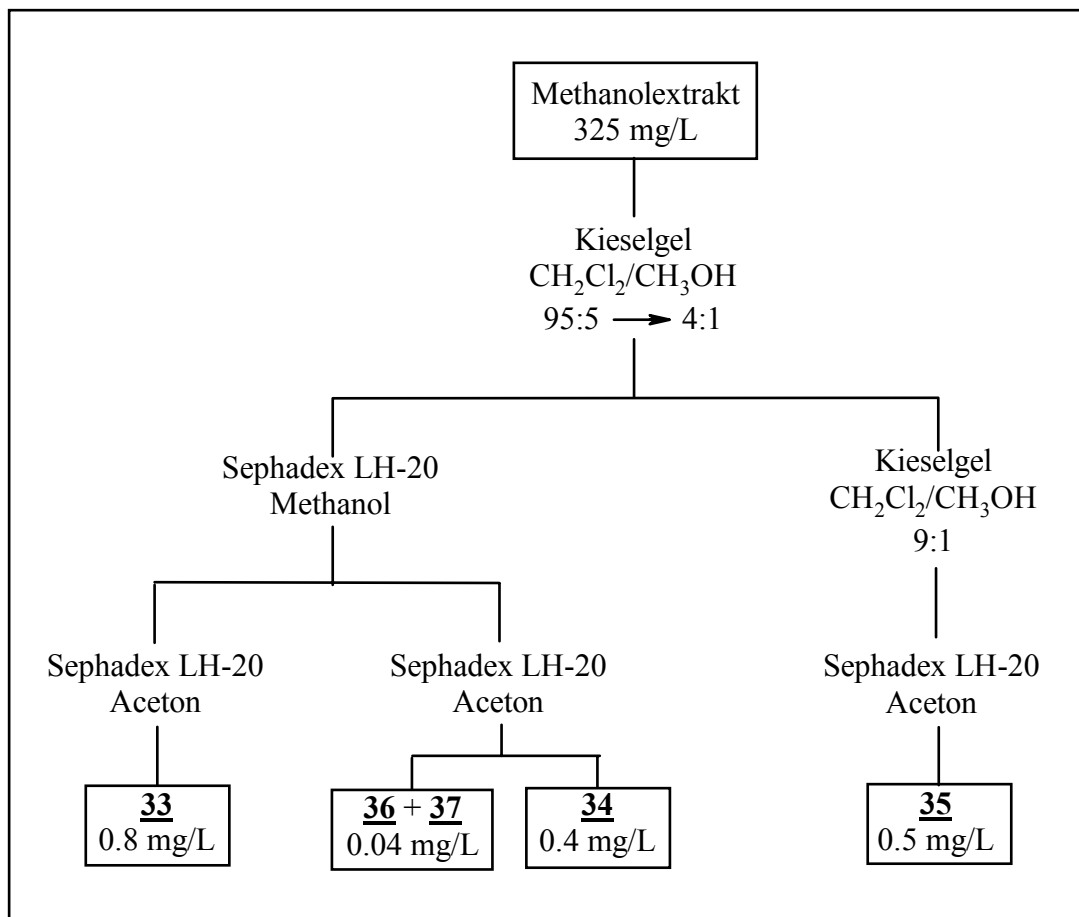


Abbildung 18 Aufarbeitungsschema des Methanol-Extraktes von MH13

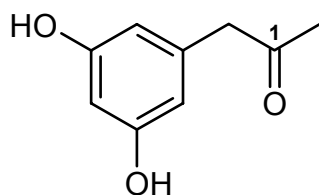
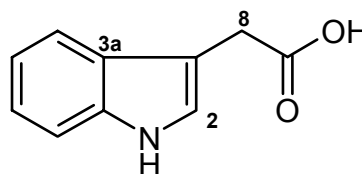
### 2.3.2. Charakterisierung der gebildeten Metabolite

#### **$\alpha$ -Acetylorcinol (33)**

ESI- und DCI-MS lieferten eine Molmasse von 166 g/mol. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren acht Protonen erkennbar, das Singulett einer Methylgruppe und einer Methylen-Gruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.16$  und  $3.59$ , sowie drei aromatische Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 6.20$ . Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigte zusätzlich zwei quartäre, Tieffeld-verschobene Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 137.9$  und  $159.9$ , sowie das für eine Keton-Funktion typische Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 209.7$ . Mit diesen Informationen wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt. Durch Vergleich mit Literaturdaten<sup>96</sup> konnte so **33** als  $\alpha$ -Acetylorcinol identifiziert werden.

#### **Indolessigsäure (34)**

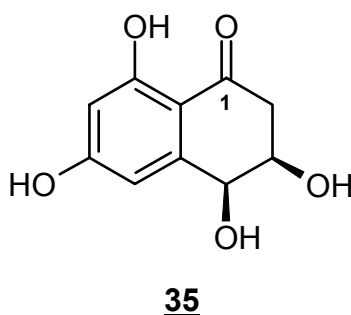
Der mit Orcin blau anfärbenden Substanz ließ sich mittels ESI-MS eine Molmasse von 175 g/mol zuweisen. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren Signale für sieben Protonen sichtbar, eine Methylen-Gruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 3.70$  und fünf aromatische Protonen im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 7.00$  bis  $7.54$ . Dabei fällt besonders das Singulett bei  $\delta_{\text{H}} = 7.19$  auf, da es typisch für das 2-H-Atom von Indolen ist. Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum kommen vier weitere quartäre Kohlenstoffatome hinzu. Das Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 176.6$  spricht dabei für eine Carboxylgruppe. Ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>97</sup> bestätigte die Annahme, dass es sich bei **34** um Indolessigsäure handelt. **34** ist zu den Wachstumshormonen der Pflanzen zu zählen.

**33****34**

**cis-4-Hydroxyscytalon (35)**

Der in Form eines weißen Feststoffes erhaltenen Substanz besitzt die Molmasse von 210 g/mol (ESI-MS). Im Protonenspektrum lassen sich eine Methylen-Gruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 2.83$  und zwei Methin-Gruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 4.28$  und  $4.76$  ausmachen. Die Tieffeld-Verschiebung von zwei weiteren Methin-Gruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 6.19$  und  $6.59$  deutet auf einen Aromaten hin. Das Singulett bei  $\delta_{\text{H}} = 12.64$  zeigt mindestens eine Hydroxy-Gruppe.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind zusätzliche vier Signale zu sehen. Dabei ist das Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 164.2$  zwei Kohlenstoffatomen zuzuordnen, wie ein Vergleich mit dem HSQC-NMR-Spektrum zeigt. Das Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 204.9$  deutet auf eine Carbonyl-Gruppe hin. Mit diesen Informationen wurde eine Datenbankrecherche in Antibase durchgeführt. Der Vergleich mit Literaturdaten<sup>98</sup> bestätigte für **35** die Struktur von *cis*-4-Hydroxyscytalon. **35** ist ebenso wie Isoscleron (**30**) den Tetralonen zuzuordnen.

**Scytalon (36) und 6-Hydroxyisoscleron (37)**

Die Strukturaufklärung dieser Substanzen erwies sich als schwierig. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum waren eine Vielzahl an Signalen zu erkennen, ebenso im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, so dass eine Verbindung mit ca. 20 Kohlenstoffatomen erwartet wurde. Dem ESI- und DCI-MS war nur eine Molmasse von 194 g/mol zu entnehmen. Eine HPLC-MS-Untersuchung zeigte, dass hier ein Gemisch von zwei Substanzen gleicher Molmasse vorlag (siehe Abbildung 20). Eine chromatographische Trennung war nicht möglich, da die Menge zu gering war.

Mit Hilfe des  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrums ließen sich einzelne Teilstücke der Verbindungen formulieren, die mit Hilfe der HMBC-Kopplungen verbunden werden konnten (siehe Abbildung 19). Ein Vergleich mit Literaturdaten bestätigte für **36** die Struktur von Scytalon<sup>99</sup> und für **37** die von

6-Hydroxyisoscleron<sup>100</sup>. Beide Metabolite sind den Tetralonen zuzuordnen, wobei **36** erwiesenermaßen ein Vorläufer in der Biosynthese von Melanin ist<sup>101</sup>.

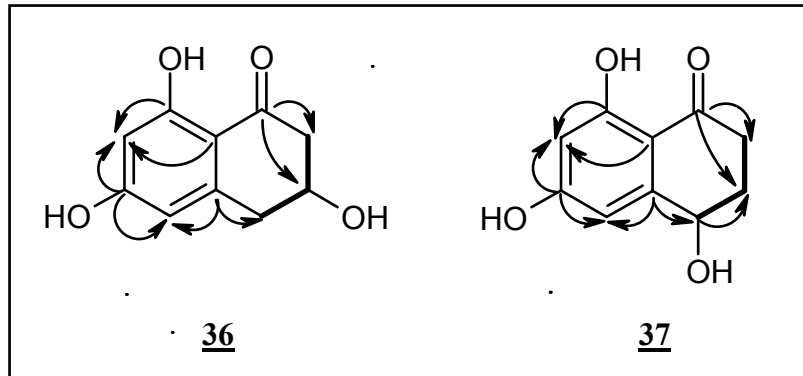


Abbildung 19 COSY-Fragmente (dick) und ausgewählte HMBC-Kopplungen (Pfeile) von **36** und **37**

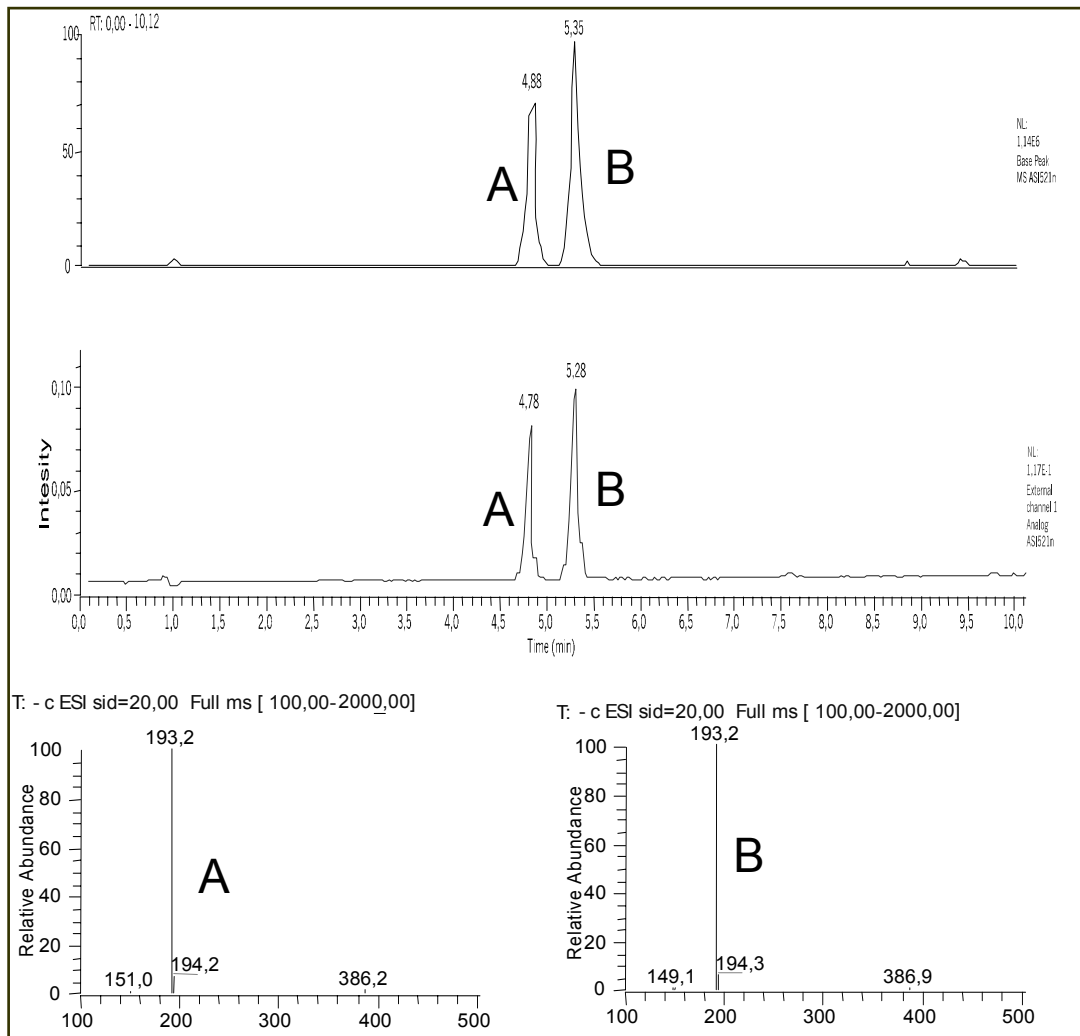


Abbildung 20 HPLC-MS-Spektren von **36** und **37**

## 2.4. Der Stamm MH11

### 2.4.1. Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten

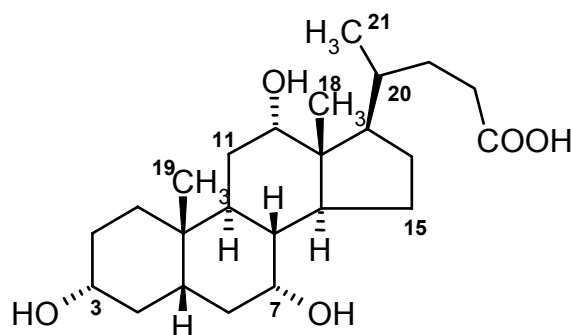
Der Stamm MH11 fiel im chemischen Screening im Nährmedium Marine Broth (MB) durch eine mit Anisaldehyd ocker und mit Orcin dunkelgelb anfärbende Zone im Dünnschichtchromatogramm auf, die nach 96 h am intensivsten war.

Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 100 rpm in 1 L-Schüttelkolben ohne Schikane, befüllt mit 150 mL des MB-Nährmediums über 96 h. Die Kulturbrühe wurde nach Abbildung 16 aufgearbeitet, wobei der Aceton-Extrakt verworfen wurde. Die Aufreinigung des Methanol-Extrakts erfolgte zunächst an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von Dichlormethan/Methanol (95:5 bis 4:1) und anschließend an Sephadex LH-20 (Methanol). So konnten 1.4 mg/L Cholsäure (**38**) isoliert werden.

### 2.4.2. Charakterisierung des gebildeten Metaboliten

#### **Cholsäure (38)**

Dem weißen Feststoff ließ sich mittels ESI-MS eine Molmasse von 409 g/mol zuweisen. Im Protonenspektrum sind alle Signale im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 0.72$  bis 3.79 zu sehen. Dabei lassen sich drei Methylgruppen, neun Methylengruppen sowie neun Methingruppen erkennen. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind dem weitere drei quartäre Kohlenstoffatome hinzuzufügen. Eine Datenbankrecherche in Antibase mit anschließendem Vergleich mit Literaturangaben<sup>102,103</sup> führte zu Cholsäure (**38**).



**38**

**38** ist eine weit verbreitete Gallensäure und gehört zu den Steroid-Carbonsäuren. Bisher ist eine Isolation aus Mikroorganismen nicht bekannt. Möglicherweise stammt **38** aus dem komplexen Nährmedium Marine Broth, wobei die relativ hohe Ausbeute dagegen spricht, ebenso wie die Tatsache, dass die mit Anisaldehyd ocker anfärbende Zone im Dünnschichtchromatogramm bei der Fermentation anderer Stämme in der Marine Broth-Nährlösung nicht gesehen wurde.

## 2.5. Der Stamm A4

### 2.5.1. Fermentation und Isolierung des gebildeten Metaboliten

Der Stamm A4 fiel im chemischen Screening durch die Bildung einer UV-löschenden, mit Anisaldehyd gelb anfärbenden, polaren Zone auf, deren Konzentration nach 144 h am höchsten war.

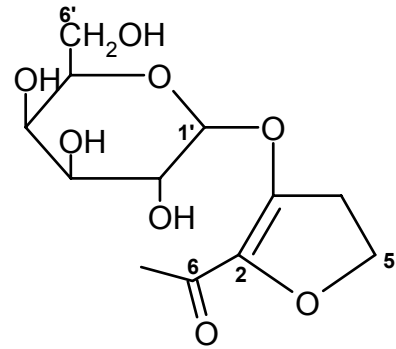
Die Fermentation erfolgte bei 28 °C und 100 rpm in 1 L-Schüttelkolben ohne Schikane, befüllt mit 150 mL der 1158-Nährlösung über 144 h. Die Kulturbrühe wurde nach Abbildung 16 aufgearbeitet, wobei der Aceton-Extrakt verworfen wurde. Der Methanol-Extrakt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (95:5 bis 4:1) unterzogen. Anschließend wurde an Sephadex LH-20 (Methanol) getrennt, worauf der letzte Reinigungsschritt an Kieselgel mit einem Chloroform/Methanolgemisch (4:1) folgte. So konnte O-Galactosylisomaltol (**39**) mit einer Ausbeute von 3.1 mg/L isoliert werden.

### 2.5.2. Charakterisierung des gebildeten Metaboliten

#### **O-Galactosylisomaltol (39)**

Dem weißen Feststoff lässt sich anhand von ESI-MS eine Molmasse von 288 g/mol zuweisen. Im Protonenspektrum sind eine Methylgruppe bei  $\delta_H = 2.48$  und eine Methylengruppen bei  $\delta_H = 3.68 / 3.47$  zu sehen. Außerdem lassen sich sieben Methingruppen ausmachen, wobei fünf mit Verschiebungen zwischen  $\delta_H = 3.42$  und 5.56 für benachbarten Sauerstoff sprechen. Die beiden anderen mit  $\delta_H = 6.76$  und 7.65 sind typisch für eine Doppelbindung.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind zusätzlich drei quartäre Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 139.3$ ,  $154.4$  und  $187.5$  sichtbar, wobei das letzte Signal aufgrund der starken Tieffeld-Verschiebung als das einer Carbonylgruppe einzuordnen ist. Das Signal der Methingruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 101.4$  ist typisch für das anomere Kohlenstoffatom von Zuckern, so dass mit großer Wahrscheinlichkeit ein Zucker als Bestandteil der Struktur von **39** anzunehmen war. Ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>104</sup> identifizierte **39** als O-Galactosylisomaltol. Galactosylisomaltol wird auch in gekochter Milch gefunden<sup>105</sup>. Daher ist **39** als Nährmedienbestandteil aus der 1158-Nährlösung anzusehen.

**39**

### 3. Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Pilze mariner Herkunft bearbeitet. Es bestand die Vermutung, dass diese bisher wenig beachteten Mikroorganismen über andere Biosynthesegene als die terrestrischen verfügen. Daher wurden neue, biologisch aktive Naturstoffe erwartet. Diese Erwartung wurde nicht erfüllt. Nur bekannte Substanzen wurden isoliert, wobei die Chaetoviridine sicher zu den interessanteren gehören.

Der Einsatz von spezifisch auf Sekundärstoffbiosynthesegene ansprechenden Gensonden wäre hier eine Möglichkeit zu entscheiden, ob die untersuchten Stämme überhaupt über die Fähigkeit zur Sekundärstoffbildung verfügen. Das genetische Screening wäre ein besseres Auswahlkriterium bei der Bearbeitung von Pilzen.



## IV Tiefseemuscheln

### 1. Projektbeschreibung

Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Projektes "TIEFBAK: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Invertebraten der Tiefsee und ihren symbiontischen Bakterien" (FKZ 03FO236C7) durchgeführt.

In einem Verbundprojekt der Arbeitsgruppen Imhoff (Universität Kiel), Suess (Geomar Forschungszentrum Kiel) und Zeeck (Universität Göttingen) übernahm unser Arbeitskreis die Aufgabe der "Isolierung und Strukturaufklärung von biologisch aktiven Naturstoffen aus marinen Invertebraten der Tiefsee und ihren symbiontischen Bakterien". Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf Identifizierung von marinen Naturstoffen gelegt werden.

Die verfügbaren Proben stammten aus Tiefseemuscheln und wurden in einer Prioritätenliste geordnet. Vorrang hatten Proben aus Kiemengewebe, da hier eine hohe Bakteriendichte zu erwarten sein sollte<sup>106</sup>. Größere Probenmengen wurden zuerst bearbeitet, da die Ausbeute an definierten Naturstoffen ohnehin klein sein würde und Erfahrungen gesammelt werden sollten. Die chemischen Arbeiten gliederten sich in drei Phasen:

- a) Erstellen der Extrakte
- b) Aufarbeitung der Extrakte unter Verwendung verschiedener Isolierungsmethoden
- c) Identifizierung der isolierten Substanzen

### 2. Erstellen der Extrakte und Aufarbeitung der Proben

Im Rahmen des Projektes wurden sieben Proben aus dem Kiemengewebe von verschiedenen Tiefseemuscheln bearbeitet (siehe Tabelle 05). Da die Proben eine unterschiedliche Genese aufwiesen, wurden sie getrennt bearbeitet, um eventuelle Standortunterschiede zu erkennen.

|                                 | Kiemengewebe      |         |
|---------------------------------|-------------------|---------|
|                                 | gefriergetrocknet | feucht  |
| <i>Solemya</i> sp. S8           | 7.7 g             | -       |
| <i>Solemya</i> sp. S9-15        | 4.6 g             | -       |
| <i>Solemya</i> sp. S7           | 5.5 g             | -       |
| <i>Solemya</i> sp. S1-6         | 12.9 g            | -       |
| <i>Acharax</i> sp. TVG 40-2     | 31.1 g            | 119.5 g |
| <i>Acharax</i> sp. TVG 56-1     | 9.8 g             | 18.5 g  |
| <i>Calyptogena</i> sp. TVG 68-2 | 12.4 g            | 41.2 g  |

**Tabelle 05 verfügbare Proben der Tiefseemuscheln**

### 2.1. *Solemya* sp.

Es wurde mit der Untersuchung von Kiemengewebe der Muschel *Solemya* begonnen, da hier eine besonders dichte Besiedlung von symbiontischen Bakterien vorlag und somit die Wahrscheinlichkeit, Metabolite zu finden, am höchsten war.

Die *Solemya*-Lyophilisatprobe S8 wurde lipophil/wässrig extrahiert. Die so gewonnenen Rohextrakte lieferten unauffällige Dünnschichtchromatogramme. Die modifizierte Aufarbeitung der Probe S9-15 mit Hilfe von Adsorberharz (XAD-2) führte zu stärker angereicherten Extrakten, die im Dünnschichtchromatogramm eine breite Substanzpalette zeigten. Für eine Isolierung der Substanzen waren die Mengen jedoch zu gering. Nur Thymidin konnte anhand des  $R_f$ -Wertes und seines typischen Anfärbeverhaltens (mit Anisaldehyd blau) identifiziert werden. Die Probe S7 wurde ebenfalls an Adsorberharzen aufgearbeitet, die Dünnschichtchromatogramme waren mit denen der Probe S9-15 vergleichbar. Daraufhin wurden die Proben von *Solemya* sp. gemeinsam bearbeitet, sofern sie vom gleichen Standort stammten.

Die Probe S1-6 wurde zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die Extrakte zeigten keine biologische Aktivität gegen die Testkeime *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Der Wasserextrakt zeigte im Dünnschichtchromatogramm ein Metabolitenspektrum mit einigen fluoreszierenden aber nur wenigen mit Anisaldehyd oder Orcin anfärbenden Substanzen. Eine mit Anisaldehyd blau anfärbende Substanz

erwies sich wiederum als Thymidin. Es wurden vier nicht anfärbende aber fluoreszierende Substanzen in Mengen zwischen 1.5 und 2.5 mg weitgehend aufgereinigt. Das EI-Massenspektrum einer dieser vier Substanzen weist auf ein Inosin-Derivat hin. Die geringen Mengen dieser Substanzen ließen weitere (NMR-) spektroskopische Untersuchungen nicht zu.

## 2.2. *Acharax* sp.

Die *Acharax*-Proben wurden getrennt, aber nach gleichem Schema bearbeitet und lieferten identische Ergebnisse.

Das Kiemengewebe der Muschel *Acharax* wurde zunächst gemahlen und mit Aceton im Ultraschall aufgeschlossen. Man erhielt den Aceton-Extrakt und einen Rückstand aus Kiemengewebe.

Der Rückstand wurde mit Dichlormethan erneut im Ultraschall aufgeschlossen. Der so erhaltene Dichlormethan-Extrakt wurde mehrfach an Kieselgel und Sephadex LH-20 chromatographiert. Es ließ sich nur Cholesterin (**40**) in beiden Muschelproben anhand von EI-MS und einer Vergleichsprobe identifizieren.

Der Rückstand aus zweimal im Ultraschall aufgeschlossenem Kiemengewebe wurde nochmals mit Methanol aufgeschlossen. Das Dünnschichtchromatogramm des Methanol-Extraktes wies keine interessanten Zonen auf.

Der zuerst erstellte Aceton-Extrakt wurde in einem Methanol/Wassergemisch aufgenommen und filtriert. Das Filtrat chromatographierte man an einer MCI-MPLC-Säule und erhielt jeweils **40**. Der Rückstand des Aceton-Extraktes wurde zunächst an Kieselgel und anschließend an Sephadex LH-20 getrennt und lieferte ebenfalls **40**. Andere Komponenten waren im Dünnschichtchromatogramm bei  $R_f$ -Werten zwischen 0.3 und 0.8 (Laufmittel: Chloroform/Methanol (1:1), Anfärbung mit Anisaldehyd) zu erkennen, jedoch aufgrund zu geringer Mengen nicht zu isolieren.

### 2.3. *Calypdogena* sp.

Aus dem Kiemengewebe der Muschel *Calypdogena* wurden ein Aceton-, ein Dichlormethan- und ein Methanol-Extrakt erstellt (siehe 2.2). Der Aceton- und der Dichlormethan-Extrakt wurden jeweils einmal über Kieselgel getrennt. Es folgte eine Vereinigung der im Dünnschichtchromatogramm ähnlich anfärbenden und UV-löschenden Fraktionen. Man erhielt vier Fraktionen, wobei die erste Fraktion fast ausschließlich Schwefel (**41**) (103.6 mg) enthielt, der anhand von EI- und DCI-Massenspektren identifiziert wurde.

Die Fraktionen wurden chromatographisch zunächst an Kieselgel und weiter an Sephadex LH-20 (Methanol) aufgereinigt. Die so erhaltenen acht Fraktionen (ohne **41**) zeigten einige sehr schwach anfärbende Substanzen mit  $R_f$ -Werten im Bereich 0.2 bis 0.8 (Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (1:1), Anfärbung mit Anisaldehyd). Sie wurden in der HPLC untersucht, wiesen jedoch nur eine sehr geringe Intensität im UV-Spektrum auf. Auch mit Hilfe der gekoppelten HPLC-MS-Methode ließen sich keine Substanzen identifizieren.

Das Dünnschichtchromatogramm des Methanol-Extraktes wies auch hier keine interessanten Zonen auf und wurde nicht weiter bearbeitet.

### 3. Diskussion und Ausblick

Marine Naturstoffforschung ist ein äußerst risikoreiches Arbeitsgebiet, weil marine Organismen Sekundärmetabolite, die zugleich Wirkstoffe sind, wenn überhaupt nur in sehr geringen Mengen produzieren. Insbesondere wenn bisher nicht untersuchte Makroorganismen als Quelle dienen (hier Tiefseemuscheln), können Erfahrungen gesammelt werden, wobei von der Probennahme bis zum biologisch-chemischen Screening alle Arbeitsschritte aufeinander abgestimmt sein müssen. Dies ließ sich in der verfügbaren Zeit nicht erreichen. Dennoch ergeben sich aus den Untersuchungen Hinweise, dass Tiefseemuscheln für weitergehende Prüfungen durchaus in Frage kommen.

Die Tiefsee ist ein bisher kaum erforschter und in sich weitgehend geschlossener Lebensraum. Die hier lebenden Organismen müssen eigene, vielleicht bisher nicht bekannte Möglichkeiten gefunden haben, miteinander zu

kommunizieren oder sich zu verteidigen. Dass die Symbionten von Tiefseemuschem interessante Wirkstoffe produzieren, ist daher anzunehmen.

Die Untersuchung von Kiemengewebe aus Tiefseemuschem war in diesem Fall nicht geeignet, um Metabolite der Symbionten zu identifizieren. Dazu müssten ausreichend große Mengen sorgfältig aufbereiteter Tiefseemuschem verfügbar sein, oder die Symbionten müssten in Kultur gebracht werden. Es gibt viele Beispiele bei der Beschreibung mariner Wirkstoffe, wo erst aus hunderten Kilogramm der Makroorganismen (Feuchgewicht) nur wenige mg Wirkstoff isoliert werden konnten. So wurden z.B. 6.5 mg des anticancerogen wirkenden Naturstoffs Agelagalastatin<sup>107</sup> aus 450 kg (Feuchgewicht) des Schwammes *Agela* sp. isoliert.

In den Chromatogrammen war deutlich sichtbar, dass bei der Auftragung großer Extraktmengen Zonen von Metaboliten sichtbar werden, die aufgrund der R<sub>f</sub>-Werte und der Anfärbbarkeit für eine Untersuchung interessant erscheinen. Die verfügbaren Extraktmengen sind für eine Isolierung dieser Substanzen jedoch nicht ausreichend, so dass sich die Frage, ob Tiefseemuschem ein Ausgangspunkt für die Wirkstoffsuche sein können, nicht abschließend beantworten lässt.

Einen alternativen Weg, mit Wirkstoffen aus schwer zugänglichen Organismen zu arbeiten, eröffnet die Gentechnik. Sollte es gelingen, Sekundärstoffbiosynthesegene bei Symbionten zu erkennen und selektiv zu isolieren, könnte man diese durch heterologe Expression nutzen, um die gesuchten Sekundärstoffe in ausreichender Menge zu erhalten.

## V Zusammenfassung der Ergebnisse

### 1. Streptomyceten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 24 Streptomycetenstämme in einem chemischen Screening auf ihre Naturstoffproduktion hin untersucht. Dabei handelte es sich um sieben terrestrische Stämme, drei Stämme mariner Herkunft aus dem Atlantik und 14 Stämme mariner Herkunft aus der Ostsee. Nach dem Screening wurden aus diesen 24 Stämmen sechs zur intensiven Bearbeitung ausgewählt. Außerdem wurde eine im AK Fiedler aus dem Stamm Tü 6252 isolierte Substanz in ihrer Struktur aufgeklärt.

### Ägy-rot

Die Hauptmetabolite aus zwei verschiedenen Nährmedien erwiesen sich als die literaturbekannten Sekundärstoffe 7-Desoxy-13-dihydradaunomycinon (7) und  $\epsilon$ -Rhodomycinon (8). Beide Naturstoffe gehören zu den Hydroxyanthrachinonen und sind Aglykone der Anthracyclin-Antibiotika.

### Z3

Die in zwei verschiedenen Nährmedien auffälligen Substanzen führten zu 2'-Desoxycytidin (20), ein Intermediat des Nucleotidstoffwechsels, und 2,5-Furandimethanol (21), ein Nährmedienbestandteil.

### Z6

Beim Screening unter Zusatz von Oberflächenmaterialien und bei veränderter Temperatur fiel eine Substanz (19) auf, die eine große Ähnlichkeit zu 18 aufwies. Die Struktur von 19 konnte mit den üblichen Methoden nicht aufgeklärt werden. Eine Acetylierung mit Acetanhydrid lieferte 1,3-Dihydroxyaceton-diacetat und somit 1,3-Dihydroxyaceton (22) als Bestandteil von 19. Auch bei 19 handelt es sich um ein Dihydroxyaceton-Oligomer, dessen Bildung als eine besondere Biosyntheseleistung anzusehen ist.

**Z9**

Hauptmetabolite waren die literaturbekannten Naturstoffe Nonactinsäure (**10**), Homononactinsäure (**11**) und Streptenol E (**12**). **10** und **11** sind die Bausteine der Macrotetrolid-Antibiotika Nonactin (**13**) und Tetranactin (**14**), diese konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

**Z12**

2'-Desoxy-5-methylcytidin (**15**), ein Intermediat des Nucleotidstoffwechsels, das Diketopiperazin Cyclo-(phenylalanyl-prolyl) (**16**) und Kitamycin B (**17**), ein Antimycin, konnten isoliert werden. Mit einem 50 L-Fermenter sollten größere Ausbeuten an **17** erhalten werden, was jedoch nicht gelang. Es wurde aber eine neue Substanz (**18**) erhalten. Die Struktur von **18**, ein Dihydroxyaceton-Oligomer, konnte mit Hilfe der bisher angewandten Methoden nicht vollständig aufgeklärt werden. **18** ähnelt der aus dem Stamm Z6 isolierten Substanz (**19**).

**Ku2**

Im chemischen Screening des Stammes trat ein Metabolit auf, der mit Anisaldehyd rosa anfärbte. Es handelt sich dabei um das Alkaloid TM-64 (**24**), das bisher nur aus einem Endosymbionten und einem thermophilen Actinomyceten isoliert wurde.

**Pyridomycinol (**25**)**

Ein Vergleich der NMR-Daten von Pyridomycin (**26**) und dem in einer früheren Arbeit isolierten neuen Metaboliten zeigte große Übereinstimmungen. Allerdings ist eine der Doppelbindungen hydratisiert. Diese Verbindung ist neu und wurde Pyridomycinol (**25**) genannt.

## 2. Pilze

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt acht Pilzstämme mariner Herkunft (aus Bryozoen isoliert) in einem chemischen Screening auf ihre Naturstoffproduktion hin untersucht. Sechs von ihnen stammten aus *Flustra foliacea* und die anderen beiden aus *Tubulipora liliacea*, gesammelt in der Nordsee. Nach dem Screening wurden aus diesen acht Stämmen fünf für die intensivere Bearbeitung ausgewählt.

### A2

Aus dem Stamm A2 konnten drei Hauptmetabolite isoliert werden. Dabei handelt es sich um Adenosin (31) und Uridin (32), zwei Intermediate des Nucleotidstoffwechsels, sowie um Isoscleron (30), ein Trihydroxytetralon.

### A4

Der Hauptmetabolit von A4 erwies sich als O-Galactosylisomaltol (39) und ist wahrscheinlich ein Nährmedienbestandteil der 1158-Nährlösung.

### A5

Aus Kulturen in Schüttelkolben konnte Chaetoviridin A (28) und aus Kulturen in P-Kolben Chaetoviridin B (29) isoliert werden. Dabei wies das Massenspektrum von 29 eine Differenz von 18 Masseneinheiten auf, obwohl die NMR-Daten annähernd 100 %ig übereinstimmten. Es wird die Bildung eines Lactonringes für die Struktur von 29 angenommen.

### MH11

Der Stamm MH11 zeigte nur einen Hauptmetaboliten, Cholsäure (38). 38 ist eine Gallensäure und gehört zu den Steroid-Carbonsäuren.

### MH13

Aus dem Stamm MH13 wurden fünf Substanzen identifiziert. Drei von ihnen gehören zu den Tetralonen, nämlich *cis*-4-Hydroxyscytalon (35), Scytalon (36) und 6-Hydroxyisoscleron (37). Dabei lagen 36 und 37 als Gemisch vor. Bei den



anderen Komponenten handelt es sich um  $\alpha$ -Acetylorcinol (**33**) und Indolessigsäure (**34**).

### **3. Tiefseemuscheln**

Für die sieben Proben aus Kiemengewebe von verschiedenen Tiefseemuscheln wurden mehrere Bearbeitungs- und Isolierungsmethoden ausgearbeitet, trotzdem konnten nur Cholesterin (**40**) und Schwefel (**41**) isoliert und Thymidin anhand des Dünnschichtchromatogramms identifiziert werden. Weitere Zonen waren zwar zu erkennen, aufgrund der zu geringen Mengen jedoch nicht isolierbar. Eine Bewertung der marinen Naturstoffforschung wurde vorgenommen.

## B. Experimenteller Teil

### I Allgemeines

#### 1. Instrumentelle Analytik

**Schmelzpunkte:** Alle Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop der Firma Reichert bestimmt und sind nicht korrigiert.

**Drehwerte:** Polarimeter Perkin-Elmer Modell 241, die Drehwerte sind in [10-1 deg cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>], und die Konzentration (c) in [g / 100 mL] angegeben.

**Circulardichroismus-Spektren:** Jasco J 500. Angabe der molaren Elliptizitäten als  $\lambda_{\max}$ -Werte in [grad cm<sup>2</sup> 10<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>].

**Massenspektren: EI-MS:** Finnigan MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz; **FAB-MS:** Finnigan MAT 8230 (Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol, Glycerin); **DCI-MS:** Finnigan MAT 95A , 200 eV, (Reaktandgas: NH<sub>3</sub>); **ESI-MS:** Finnigan LQC.

**Infrarotspektren:** Alle IR-Spektren wurden mit einem Spektrometer der Firma Perkin-Elmer Modell 1600 aufgenommen; Feststoffe als KBr-Preßlinge, Öle als Film zwischen NaCl-Fenstern. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

**Elektronenspektren:** Kontron Uvikon 860, Varian Modell Cary 3E; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 mL der angegebenen Lösung wurde jeweils ein Tropfen 2 M HCl bzw. 2 M NaOH gegeben.

**<sup>1</sup>H-NMR-Spektren:** Bruker AMX 300 (300 MHz), Varian Unity 300 (300 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz), Varian Inova 600 (600 MHz). Chemische Verschiebungen in  $\delta$ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard. Kopplungskonstanten (J) in [Hz]. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, ddd = Dublett vom Dublett vom

Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multipllett, br = breit. Alle  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

**$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren:** Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Varian Inova 500 (125.7 MHz), Varian Inova 600 (150.8 MHz). Chemische Verschiebungen in  $\delta$ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard.

Abkürzungen: **APT (Attached Proton Test)**: CH/CH<sub>3</sub> stehen nach oben, C/CH<sub>2</sub> stehen nach unten,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Multiplizitäten sind aus HMQC-Experimenten in Verbindung mit APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

**2D-NMR-Spektren:**  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Correlated Spectroscopy), delay- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Long Range-Correlated Spectroscopy), **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

## 2. Chromatographische Methoden

**Lösungsmittel:** Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert, für alle anderen Zwecke fanden analysenreine Lösungsmittel Anwendung.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** DC-Fertigplatten KG 60 F254 (Merck): Schichtdicke 0.25 mm; DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck): Schichtdicke 0.20 mm; HPTLC-Nano-Fertigplatten (10 x 10 cm); Sil G-25/UV254/336 KG 60 (Macherey & Nagel): Schichtdicke 0.25 mm; Nano-Fertigplatten RP-8 F254 (Merck): Schichtdicke 0.25 mm.

**Sprühreagenzien:** Nach Reagenzien Merck, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie<sup>108</sup>. Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100 °C erwärmt.

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

Ehrlich-Reagenz (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung von 25 mL Salzsäure (36 %) in 75 mL Methanol.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120-122): 1 g Eisen(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6% in Ethanol) gemischt.

**Säulenchromatographie und Gelchromatographie**: Kieselgel 60, 0.04 - 0.063 mm (ICN); Sephadex LH-20 (Pharmacia), Sephadex G-10 (Pharmacia).

**Adsorberharze**: Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 (Serva), MCI-Gel CHP 20P (Mitsubishi Chemical Corporation).

**HPLC**: Pumpe: Kontron 322 System; Autosampler: Kontron 360; Detektor Kontron Dioden Array Detektor 440; Mischkammer: Kontron HPLC 360; Datensystem: Kontron Kroma-System 2000 Version 1.60; analytische Aufgabenschleife; Vorsäule: Beckmann Ultrasphere Gold ODS, 4.6 x 45 mm, 5 µm, RP-18; Säule: Grom Ultrasphere 100 RP-18 endc. 4, 100 x 2 mm, Flußrate: 1.0 mL/min, Laufmittelgradient 100 % Wasser zu 100 % Methanol.

Bidestilliertes Wasser und analysenreine organische Lösungsmittel wurden im Ultraschallbad und anschließend durch einen Helium-Strom jeweils 10 min entgast.

### 3. Mikrobiologische Methoden

**Nährmedienbestandteile**: Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

|         |              |                            |                  |
|---------|--------------|----------------------------|------------------|
| Glucose | <u>Merck</u> | Hefeextrakt                | <u>Gibco BRL</u> |
| Stärke  | <u>Merck</u> | Hafermehl (Holo Hafergold) | <u>Neuform</u>   |

|                |              |                     |                        |
|----------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Mannit         | <u>Merck</u> | Corn steep powder   | <u>Marcor</u>          |
| Caseinpepton   | <u>Merck</u> | Sojamehl fettarm    | <u>Henselwerk GmbH</u> |
| Malzextrakt    | <u>Merck</u> | Marine Broth MB2216 | <u>Difco</u>           |
| Fleischextrakt | <u>Merck</u> | Agar-Agar           | <u>Difco</u>           |

### Verwendete Nährmedien:

Hafer: Hafermehl 20 g/L, Spur 11 2.5 mL/L, pH 7.2.

M2: Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Glucose 4 g/L, pH = 7.0, für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L (M2).

SM: Sojamehl fettarm 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH = 7.0, für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

SGG: Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke 10 g/L, Corn steep powder 2.5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, CaCO<sub>3</sub> 3 g/L, pH = 7.0.

E2: Glucose 20 g/L, Hafermehl 20 g/L, Sojamehl fettarm 20 g/L, für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

1158: Malzextrakt 20 g/L, Glucose 10 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, Ammoniumhydrogenphosphat 0.5 g/L, pH = 6, für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

G20: Glycerin 20 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L.

1549: Glucose 10 g/L, Maltose 10 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Fleischextrakt 5 g/L, pH = 5.4.

1405: Glucose 30 g/L, Natriumnitrat 3 g/L, Kaliumhydrogenphosphat 1 g/L, Magnesiumsulfat 0.5 g/L, Kaliumchlorid 0.5 g/L, Eisensulfat 0.01 g/L, pH = 7.3.

MB: Marine Broth 2216 37.4 g/L.

Spurenelementlösung Spur 11: CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 3 g/L, Fe(III)-citrat 1 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 25 mg/L, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O 20 mg/L, CoCl<sub>2</sub> 4 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 10 mg/L.

Für alle Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Alle Nährmedien wurden nach Einstellen des pH-Wertes mit 0.5 M NaOH bzw. 0.5 M HCl für 30 min bei 121 °C sterilisiert.

**Zentrifugen:** Sigma 2K1, Sigma 4K15, Sigma 210 M.

**Schüttler:** Braun Inkubationsschüttelschrank BS4, Braun Certomat® RM, Braun Certomat® BS-1, Schüttelbrett Universität Göttingen (100 spm, 28 °C).

**Fermenter mit Belüftungseinstellung:** Fischer & Porter Gasflowmeter (45711 M), The Analytical Development Co Ltd. Kohlendioxid-Analysator, Ingold Sauerstoffelektrode.

Zugabe von 1g/L Niax bei allen Kultivierungen in Fermentern.

#### 4. Biologische Tests

Im Plattendiffusionstest wurden als Testkeime *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* verwendet. Rohprodukte aus 200 mL Kulturlösung (jeweils Mycel- und Kulturfiltratextrakt) wurden in 2 mL Methanol/Wasser (1:1) gelöst, Reinsubstanzen in Konzentrationen von 1 mg/mL (Lösungsmittel Methanol, Aceton oder Dichlormethan). Filterplättchen (Durchmesser: 9 mm, Dicke 0.5 mm) wurden mit den Lösungen getränkt, unter sterilen Bedingungen getrocknet, auf die Testplatten gelegt und 1-2 d bei 37 °C (Bakterien) bzw. 27 °C (Pilze) inkubiert.

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

Medium für *B. subt.*: Glucose 5 g/L, Na-citrat x 2 H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, Agar 15 g/L.

Medium für *Cand. alb.*: Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, Agar 15 g/L, pH = 5.5.

## II Screening von Streptomyceten

### 1. Stammhaltung und Langzeitkultivierung

Die Streptomyceten wurden auf zwei verschiedenen Medien (M2, SM) ausgestrichen und bei 28 °C acht bis zehn Tage inkubiert. Zur Stammhaltung verwendete man das Medium, auf dem das beste Wachstum zu beobachten war. Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert. Die Langzeitlagerung der Stämme erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 2. Durchführung des chemischen Screenings

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in fünf verschiedenen Medien (M2, SM, SGG, HA, MB) in 300 mL-Schüttelkolben (3 Schikanen, Schaumstoffkappe), die jeweils mit 100 mL Nährlösung befüllt waren. Beimpft wurde mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte und bei 28 °C über 72 h inkubiert. Es wurden je zwei Kolben pro Nährmedium angesetzt, die bei gleichem Aussehen und pH-Wert zusammen aufgearbeitet wurden.

Die vereinigte Kulturbrühe (200 mL) wurde zentrifugiert (4500 rpm, 10 min), das Mycel 15 min mit 200 mL Aceton im Ultraschallbad extrahiert. Es folgte eine Filtration, wonach das Filtrat unter Vakuum eingedunstet wurde. Man erhielt den Aceton-Extrakt. Das Kulturfiltrat wurde mit 200 mL Essigester extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingedunstet. Die so erhaltenen Extrakte (Aceton- und Essigester-Extrakt) wurden in je 2 mL Methanol/Wasser (1:1) gelöst und 5 µL dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in Laufmittelgemischen von Chloroform/Methanol (9:1) und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte optisch bei Substanzen mit auffälliger Eigenfarbe, durch UV-Absorption und Fluoreszenz bei 254 und 365 nm sowie mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Orcin, Ehrlichs Reagenz).

### 3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen

Fermentationen im größeren Maßstab wurden analog zu dem unter Kapitel 2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurden zwischen 2 L und 5 L in Schüttelkolben und 50 L im Fermenter kultiviert.

Die Aufarbeitung folgte ebenfalls Kapitel 2, wobei das Mycel dreimal mit je 1 L Aceton und das Kulturfiltrat dreimal mit je 1 L Essigester je Liter Kulturlösung extrahiert wurde.

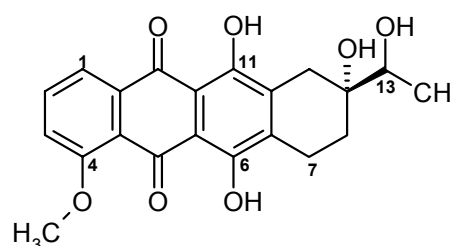
### 4. Metabolite aus Ägy-rot

#### 7-Desoxy-13-dihydrodaunomycinon (**7**)

$C_{21}H_{20}O_7$  (384.39)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.64 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)  
0.85 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** gelblich (Anisaldehyd)  
rot (Orcin)  
rot (Ehrlichs Reagenz).



**Smp.:** 220 °C

**EI-MS:** m/z (%) = 384 (78) [M]<sup>+</sup>, 339 (100) [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O]<sup>+</sup>.

**HREI-MS:** 384.1235 gefunden wie berechnet.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3424, 2925, 1613, 1578, 1407, 1283, 1250, 1211, 1059 cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 235 (0.56), 253 (0.62), 290 (0.16), 494 (0.24) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 211 (0.62), 235 (0.72), 253 (0.81), 290 (0.20), 494 (0.32) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 202 (0.83), 205 (1.13), 236 (0.63), 252 (0.77), 290 (0.18), 499 (0.20) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 338 (-2.30), 241 (+2.42), 249 (-1.38), 333 (-2.40), 342 (+1.15) nm.

$[\alpha]_D^{20}$  = -24.6° (c = 0.57, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_D$  (Literatur<sup>68</sup>) = -108° (c = 0.128, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 1.13 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 14-H<sub>3</sub>), 1.51 (dt, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H, 8-H<sub>a</sub>), 1.88 (m, 1H, 8-H<sub>b</sub>), 2.65 (m, 3H, 10-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>a</sub>), 2.84



(dd,  $J = 19.0, 6.0$  Hz, 1H, 7- $H_b$ ), 3.55 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 13-H), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.60 (s, 1H, 13-OH), 7.59 (dd,  $J = 7.0, 3.0$  Hz, 1H, 3-H), 7.87 (m, 2H, 1-H, 2-H), 13.35 (s, 1H, 11-OH), 13.90 (s, 1H, 6-OH).

**<sup>13</sup>C-NMR (150.8 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta = 17.0$  (q, C-14), 20.1 (t, C-7), 26.0 (t, C-8), 31.9 (t, C-10), 56.5 (q, OCH<sub>3</sub>), 70.2 (s, C-9), 72.1 (d, C-13), 108.9 (s, C-5a), 109.5 (s, C-11a), 118.8 (d, C-1), 119.3 (d, C-3), 120.1 (s, C-4a), 134.8 (s, C-12a), 135.9 (d, C-2), 138.9 (s, C-10a), 155.2 (s, C-11), 155.8 (s, C-6), 160.7 (s, C-4), 185.9 (s, C-12), 186.2 (s, C-5).

C-6a ist nicht detektierbar.

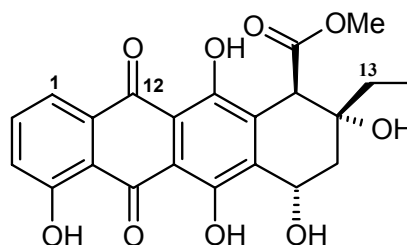
### $\epsilon$ -Rhodomycinon (**8**)

C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> (428.40)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.44 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.68 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** gelblich (Anisaldehyd)  
rot (Orcin)  
rot (Ehrlich).



**Smp.:** 108 °C

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 428 (100) [M]<sup>+</sup>, 392 (19), 360 (21), 339 (27), 322 (32), 294 (19).

**ESI-MS (positive Ionen):**  $m/z$  (%) = 879 (84) [2M+Na]<sup>+</sup>, 857 (100) [2M+H]<sup>+</sup>, 451 (13) [M+Na]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3424, 2962, 1635, 1262, 1098, 1024, 801$  cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 234 (0.63), 253 (0.41), 291 (0.14), 492 (0.20) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 234 (0.60), 253 (0.40), 291 (0.15), 492 (0.23) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 212 (0.39), 238 (0.59), 295 (0.11), 499 (0.18) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 211 (-7.74), 239 (+23.48), 251 (+18.91), 287 (+2.95), 349 (+15.39) nm.

$[\alpha]_D^{20} = +121.0^\circ$  (c = 0.62, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta = 1.03$  (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, 14- $H_3$ ), 1.43 (dq,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, 1H, 13- $H_a$ ), 1.68 (dq,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, 1H, 13- $H_b$ ), 1.99 (dd,

$J = 14.5, 3.5$  Hz, 1H, 8- $H_a$ ), 2.10 (m, 1H, 8- $H_b$ ), 3.62 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.15 (s, 1H, 10-H), 5.52 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, 7-H), 5.33/5.54 (br s, 2H, 9-OH/7-OH), 7.39 (dd,  $J = 8.5, 3.0$  Hz, 1H, 3-H), 7.77 (dd,  $J = 7.5, 3.0$  Hz, 1H, 1-H), 7.82 (dd,  $J = 8.5, 7.5$  Hz, 1H, 2-H), 11.95 (s, 1H, 4-OH), 12.74 (s, 1H, 11-OH), 13.40 (s, 1H, 6-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.8 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 6.6$  (q, C-14), 32.1 (t, C-13), 34.6 (t, C-8), 51.2 (d, C-10), 52.1 (q,  $\text{COOCH}_3$ ), 60.6 (d, C-7), 70.9 (s, C-9), 110.8 (s, C-11a), 110.9 (s, C-5a), 116.0 (s, C-4a), 119.0 (d, C-1), 124.5 (d, C-3), 133.0 (s, C-12a), 133.9 (s, C-6a), 137.2 (s, C-2), 138.6 (s, C-10a), 155.6 (s, C-11), 155.9 (s, C-6), 161.4 (s, C-4), 170.2 (s,  $\text{COOCH}_3$ ), 185.9 (s, C-12), 190.0 (s, C-5).

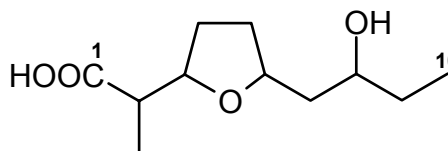
## 5. Metabolite aus Z9

### Homomonactinsäure (11)

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4$  (216.28)

$R_f$ -Wert: 0.34 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)

0.74 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).



Anfärbeverhalten: grau (Anisaldehyd)

graubraun (Orcin)

weiß (Ehrlichs Reagenz).

ESI-MS (positive Ionen):  $m/z$  (%) = 455 (12)  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , 239 (8)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

(negative Ionen):  $m/z$  (%) = 454 (20)  $[2\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ , 216 (61)  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3426, 3308, 2936, 2881, 1735, 1463, 1200, 1068, 1039$   $\text{cm}^{-1}$ .

UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 204 (0.16), 273 (0.10) nm.

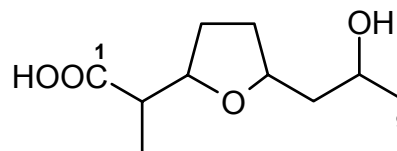
( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 201 (0.18), 271 (0.09) nm.

( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NaOH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 204 (0.23), 282 (0.08) nm.

CD ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-4.32), 298 (+0.65), 325 (+0.57), 334 (-1.76) nm.

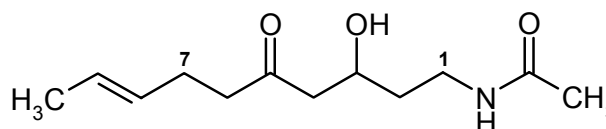
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.92$  (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, 10- $\text{H}_3$ ), 1.16 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.52 (m, 2H, 9- $\text{H}_2$ ), 1.67 (m, 2H, 4- $\text{H}_2$ ), 1.72 (m, 2H, 5- $\text{H}_2$ ), 2.05 (m, 2H, 7- $\text{H}_2$ ), 2.50 (m, 1H, 2-H), 3.78 (m, 1H, 8-H), 4.00 (m, 1H, 3-H), 4.22 (m, 1H, 6-H), 6.00 (br s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10.3$  (q, C-10), 14.0 (q, 2- $\text{CH}_3$ ), 29.5 (t, C-5), 31.6 (t, C-9), 32.3 (t, C-7), 44.1 (t, C-4), 46.9 (d, C-2), 71.3 (d, C-8), 78.0 (d, C-3), 82.0 (d, C-6), 178.8 (s, C-1).

**Nonactinsäure (10)**C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (202.25)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.68 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).**Anfärbeverhalten:** rotbraun (Anisaldehyd)

graubraun (Orcin)

hellviolett (Ehrlichs Reagenz).

**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 427 (14) [2M+Na]<sup>+</sup>, 225 (16) [M+Na]<sup>+</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3427, 3308, 2938, 2882, 1733, 1460, 1202, 1066, 1038 cm<sup>-1</sup>.**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (0.11), 273 (0.02) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 201 (0.17), 271 (0.04) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (0.19), 282 (0.03) nm.**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-4.16), 298 (+0.62), 325 (+0.50), 334 (-1.78) nm.**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 9-H<sub>3</sub>), 1.55 (m, 2H, 4-H<sub>2</sub>), 1.60 (m, 2H, 5-H<sub>2</sub>), 2.00 (m, 2H, 7-H<sub>2</sub>), 2.43 (m, 1H, 2-H), 3.88 (m, 1H, 8-H), 3.96 (m, 1H, 3-H), 4.02 (m, 1H, 6-H).**<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 14.0 (q, 2-CH<sub>3</sub>), 24.1 (q, C-9), 29.5 (t, C-5), 32.3 (t, C-7), 46.2 (t, C-4), 46.9 (d, C-2), 66.2 (d, C-8), 78.0 (d, C-3), 82.0 (d, C-6), 178.9 (s, C-1).**Streptenol E (12)**C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (227.30)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.34 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.61 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).**Anfärbeverhalten:** ocker (Anisaldehyd)

braun (Orcin)

leicht lila (Ehrlichs Reagenz).

**EI-MS:** m/z (%) = 227 (3) [M]<sup>+</sup>, 209 (17) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 150 (22), 116 (60), 72 (100), 43 (84).**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 477 (89) [2M+Na]<sup>+</sup>, 250 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3410, 2932, 1708, 1651, 1634, 1559, 1377 cm<sup>-1</sup>.**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 1.60 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H, 10-H<sub>3</sub>), 1.69-1.50 (m, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 1.96 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.21 (dt, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 2H, 7-H<sub>2</sub>), 2.50 (m,

2H, 6-H<sub>2</sub>), 2.57 (m, 2H, 4-H<sub>2</sub>), 3.23 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 4.05 (dddd,  $J = 8.2, 8.2, 4.2, 4.2$  Hz, 1H, 3-H), 5.50-5.38 (m, 2H, 8-H, 9-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta = 18.0$  (q, C-10), 22.5 (q, NHCOCH<sub>3</sub>), 27.6 (t, C-7), 37.3 (t, C-2), 37.7 (t, C-1), 44.3 (t, C-6), 50.9 (t, C-4), 66.5 (d, C-3), 126.7 (d, C-9), 130.9 (d, C-8), 173.4 (s, NHCOCH<sub>3</sub>), 211.6 (s, C-5).

## 6. Metabolite aus Z12

### 2'-Desoxy-5-methylcytidin (15)

C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (241.25)

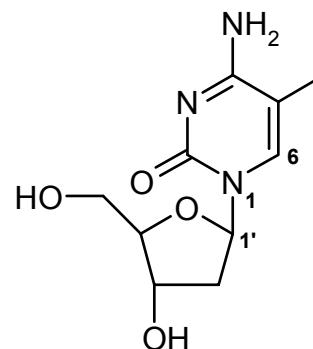
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.39 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.67 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** blau-grün (Anisaldehyd)

blau (Orcin)

blau (Ehrlichs Reagenz).



**DCI-MS:**  $m/z$  (%) = 260 (55) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 242 (19) [M+H]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3407, 1696, 1275, 1091, 1055$  cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 202 (0.42), 267 (0.32) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 205 (0.36), 267 (0.31) nm.

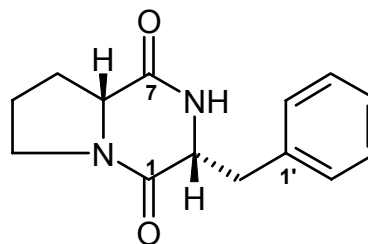
**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 210 (0.41), 267 (0.27) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 204 (+0.62), 216 (-4.01), 227 (-3.58), 238 (-2.90), 272 (+4.06), 333 (-1.51) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11.0^\circ$  (c = 0.98, CH<sub>3</sub>OH).

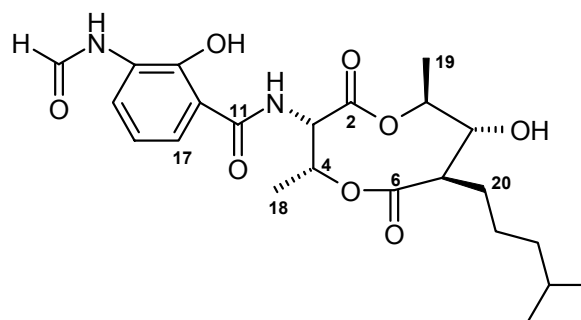
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta = 1.93$  (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>), 2.21 (m, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.29 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 3.70 (dd,  $J = 12.0, 4.0$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.79 (dd,  $J = 12.0, 4.0$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.92 (dt,  $J = 4.0, 3.0$  Hz, 1H, 4'-H), 4.38 (dt,  $J = 4.0, 2.0$  Hz, 1H, 3'-H), 6.25 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 1'-H), 7.79 (s, 1H, 6-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta = 12.5$  (q, 5-CH<sub>3</sub>), 41.2 (t, C-2'), 62.8 (t, C-5'), 72.2 (d, C-3'), 86.2 (d, C-1'), 88.8 (d, C-4'), 111.5 (s, C-5), 138.2 (d, C-6), 152.4 (s, C-2), 166.4 (s, C-4).

**Cyclo-(phenylalanyl-prolyl) (16)**C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (244.30)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.64 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.72 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).**Anfärbeverhalten:** schwach gelb (Ehrlichs Reagenz).**EI-MS:** m/z (%) = 244 (100) [M]<sup>+</sup>, 125 (81).**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 511 (93) [2M+Na]<sup>+</sup>, 268 (76) [M+Na]<sup>+</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3426, 2929, 2363, 1652, 1384 cm<sup>-1</sup>.**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 206 (+1.78), 212 (-2.27), 223 (+3.95), 239 (+2.34) nm.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 1.79 (m, 2H, 4-H<sub>a</sub>, 5-H<sub>a</sub>), 2.08 (m, 2H, 4-H<sub>b</sub>, 5-H<sub>b</sub>), 3.13 (dd, *J* = 14.0, 5.0 Hz, 1H, 10-H<sub>a</sub>), 3.17 (dd, *J* = 14.0, 5.0 Hz, 1H, 10-H<sub>b</sub>), 3.36 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.53 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 4.05 (ddd, *J* = 11.0, 6.5, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 4.43 (m, 1H, 9-H), 7.22 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (150.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 22.8 (t, C-4), 29.4 (t, C-5), 38.2 (t, C-10), 46.0 (t, C-3), 57.7 (d, C-9), 60.1 (d, C-6), 128.1 (d, C-4'), 129.5 (d, C-2', C-6'), 131.1 (d, C-3', C-5'), 137.3 (s, C-1'), 166.9 (s, C-1), 176.9 (s, C-7).

**Kitamycin B (17)**C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub> (464.51)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.69 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.88 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).**Anfärbeverhalten:** hellgelb (Anisaldehyd)

blau (Orcin)

gelb (Ehrlichs Reagenz).

**Smp.:** 137 °C**EI-MS:** m/z (%) = 464 (44) [M]<sup>+</sup>, 436 (36), 220 (100), 135 (84).**HREI-MS:** 464.2189 gefunden wie berechnet.**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 951 (100) [2M+Na]<sup>+</sup>, 488 (78) [M+Na]<sup>+</sup>.**(negative Ionen):** m/z (%) = 464 (100) [M-H]<sup>-</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3393, 2959, 2931, 2362, 1739, 1682, 1644, 1539, 1366, 1257, 1195 cm<sup>-1</sup>.**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 224 (1.60), 322 (0.30) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (1.05), 225 (1.36), 314 (0.31) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 202 (1.12), 224 (1.80), 343 (0.46) nm.

CD (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 207 (-9.47), 228 (-7.35), 240 (+4.63), 289 (-1.09) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +40.0^\circ$  (c = 0.97, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_{\text{D}}$  (Literatur<sup>80</sup>) = +45° (c = 0.01, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.86 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 6H, 24-H<sub>3</sub>, 25-H<sub>3</sub>), 1.26 (m, 5H, 21-H<sub>2</sub>, 22-H<sub>2</sub>, 23-H), 1.31 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.46 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.70 (m, 2H, 20-H<sub>2</sub>), 1.94 (brs, 1H, 8-OH), 2.36 (m, 1H, 7-H), 3.61 (m, 1H, 8-H), 4.85 (m, 1H, 9-H), 5.24 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 3-H), 5.71 (m, 1H, 4-H), 6.92 (dd,  $J$  = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 16-H), 7.15 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 10-NH), 7.27 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 17-H), 8.01 (s, 1H, 14-NH), 8.50 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, 14-NHCHO), 8.55 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 15-H), 12.66 (s, 1H, 13-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 13.9 (q, C-24/C-25\*), 14.0 (q, C-24/C-25\*), 15.0 (q, C-18), 18.4 (q, C-19), 22.5 (t, C-21), 27.2 (t, C-22), 28.9 (t, C-20), 29.1 (d, C-23), 52.1 (d, C-7), 53.7 (d, C-3), 70.7 (d, C-4), 76.8 (d, C-9), 77.2 (d, C-8), 112.6 (s, C-12), 119.0 (d, C-16), 120.3 (d, C-17), 124.8 (d, C-15), 127.3 (s, C-14), 150.6 (s, C-13), 159.1 (d, 14-NHCHO), 169.4 (s, C-11), 170.1 (s, C-2), 174.1 (s, C-6).

### Dihydroxyaceton-Oligomer 18

R<sub>f</sub>-Wert: 0.11 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.34 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

Anfärbeverhalten: blaugrün (Orcin).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3382, 2929, 1735, 1420, 1071, 1002 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-APT-NMR: siehe Abbildung 09 und Abbildung 10.

## 7. Metabolite aus Z3

### 2'-Desoxycytidin (20)

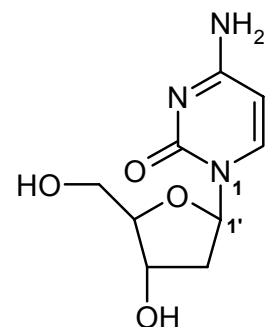
C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (227.22)

R<sub>f</sub>-Wert: 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.057 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

Anfärbeverhalten: blau (Orcin)

helllila (Ehrlichs Reagenz).



**ESI-MS (positive Ionen):**  $m/z$  (%) = 501 (53)  $[2M-H+2Na]^+$ , 479 (92)  $[2M+Na]^+$ ,  
251 (100)  $[M+Na]^+$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 1697, 1471, 1274, 1091, 1053  $\text{cm}^{-1}$ .

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 205 (0.43), 262 (0.45) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 206 (0.38), 261 (0.43) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (0.65), 261 (0.35) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 221 (-3.25), 237 (-3.90), 269 (+7.84) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = 32.0° (c = 1.00, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 2.20 (m, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.29 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 3.70 (dd,  $J$  = 12.0, 4.0 Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.79 (dd,  $J$  = 12.0, 4.0 Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.92 (dt,  $J$  = 4.0, 3.0 Hz, 1H, 4'-H), 4.38 (dt,  $J$  = 4.0, 2.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.68 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 6.25 (t,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, 1'-H), 7.98 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 6-H).

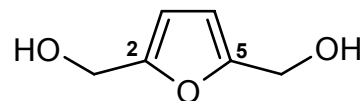
**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 41.4 (t, C-2'), 62.8 (t, C-5'), 72.3 (d, C-3'), 86.6 (d, C-1'), 89.0 (d, C-4'), 102.6 (d, C-5), 142.5 (d, C-6), 152.3 (s, C-2), 166.3 (s, C-4).

### 2,5-Furandimethanol (**21**)

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (128.13)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.65 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).



**Anfärbeverhalten:** baun (Anisaldehyd).

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 128 (60)  $[M]^+$ , 97 (100)  $[M-CH_3O]^+$ , 69 (26), 41 (31).

**HREI-MS:** 128.0473 gefunden wie berechnet.

**ESI-MS (positive Ionen):**  $m/z$  (%) = 279 (100)  $[2M+Na]^+$ , 151 (38)  $[M+Na]^+$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3422, 2924, 2854, 1650, 1457, 1011  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 4.37 (s, 4H, 2-CH<sub>2</sub>OH, 5-CH<sub>2</sub>OH), 5.10 (s, 2H, 2-CH<sub>2</sub>OH, 5-CH<sub>2</sub>OH), 6.19 (s, 2H, 3-H, 4-H).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 4.45 (s, 4H, 2-CH<sub>2</sub>OH, 5-CH<sub>2</sub>OH), 6.21 (s, 2H, 3-H, 4-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 54.4 (t, 2-CH<sub>2</sub>OH, 5-CH<sub>2</sub>OH), 109.1 (d, C-3, C-4), 155.7 (q, C-2, C-5).

## 8. Metabolite aus Z6

### Dihydroxyaceton-Oligomer 19

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.11 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.34 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** blaugrün (Orcin).

**FAB-MS:** siehe Abbildung 13.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3380, 2934, 1733, 1421, 1071, 1002 cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 276 (0.02) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 275 (0.03) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (0.16), 295 (0.27) nm.

**<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-APT-NMR:** siehe Abbildung 09 und Abbildung 10.

### 8.1. Derivatisierung von 19

#### Derivatisierungen im Tüpfelmaßstab

##### a) Acetylierung mit Acetanhydrid

3.0 mg 19 wurden in 0.4 mL Dichlormethan gelöst, mit 0.2 mL Pyridin versetzt und die Mischung unter Rühren auf 0 °C abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 0.2 mL Acetanhydrid. Im Abstand von 30 min wurde je ein Tropfen der Reaktionslösung auf ein Dünnschichtchromatogramm aufgetüpfelt, im Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (4:1) entwickelt und mit Orcin angefärbt. So ließ sich der Reaktionsverlauf beobachten. Die Zone von 19 nahm immer mehr ab, dafür wurden die Zonen eines Hauptprodukts und mehrerer Nebenprodukte immer deutlicher sichtbar. Nach 4 h war das Edukt nicht mehr zu erkennen und die Reaktion wurde abgebrochen.

##### b) Acetylierung mit Essigsäure

In 0.4 mL Essigsäure wurden 3.0 mg 19 gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Wie unter a) beschrieben, wurde der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Auch nach 4 h konnte keine Reaktion beobachtet werden. Das Experiment wurde abgebrochen.



## c) Methylierung mit Methanol

0.3 mg **19** wurden in 0.4 mL reinem Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze FeCl<sub>3</sub> versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde wie unter a) beschrieben mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Nach 1 h war das Edukt nicht mehr detektierbar, aber mehrere neue Zonen zu sehen, unter denen sich jedoch kein Hauptprodukt ausmachen ließ.

**Acetylierung von 19**

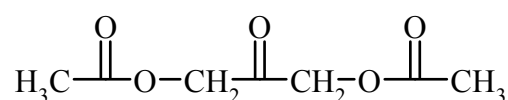
20 mg **19** wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Pyridin versetzt. Die Mischung wurde unter Rühren auf 0 °C abgekühlt und anschließend mit 1 mL Acetanhydrid versetzt. Nach 4 h beendete man die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Eis/Wasser. Es folgte die dreimalige Extraktion des Reaktionsgemisches mit jeweils 20 mL Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt und mit Toluol koevaporiert. Die dünnschichtchromatographische Analyse des Rohprodukts (35.9 mg) zeigte ein Hauptprodukt und 4 - 5 Nebenprodukte. Durch die Auftrennung an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanolgemisch (95:5) und anschließende Chromatographie an Sephadex LH-20 (Dichlormethan) konnte das Hauptprodukt **22** (15.0 mg) als farbloses Öl isoliert werden.

**1,3-Diacetoxyacetondiacetat (22)**

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (174.15)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.76 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.90 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).



**Anfärbeverhalten:** blaugrün (Orcin).

**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 372 (25) [2M+H+Na]<sup>2+</sup>, 371 (30) [2M+Na]<sup>+</sup>,  
197 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.

**DCI-MS:** m/z = 192 (100) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** δ = 2.13 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 4.75 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>).

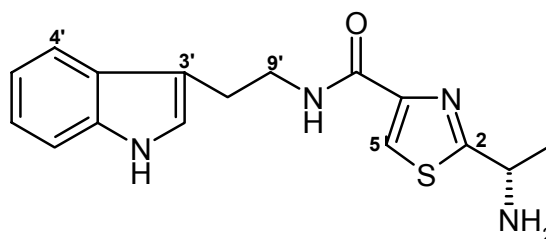
**<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** δ = 20.4 (t, 2xCH<sub>3</sub>), 66.5 (d, 2xCH<sub>2</sub>), 170.2 (q, 2xCO-Acetat), 198.3 (q, CO-Keton).

## 9. Metabolite aus Ku2

## Alkaloid TM-64 (24)

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OS (314.41)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.39 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)  
0.45 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).



**Anfärbeverhalten:** rosa (Anisaldehyd)  
blau (Ehrlichs Reagenz).

Smp.: 119 °C

**EI-MS:** m/z (%) = 314 (2) [M]<sup>+</sup>, 143 (100) [C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N]<sup>+</sup>, 130 (80) [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>.

**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 338 (100) [M+Na]<sup>+</sup>, 315 (12) [M+H]<sup>+</sup>.

(negative Ionen): m/z (%) = 313 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3415, 1650, 1635 cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 221 (0.48) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 221 (0.46) nm.

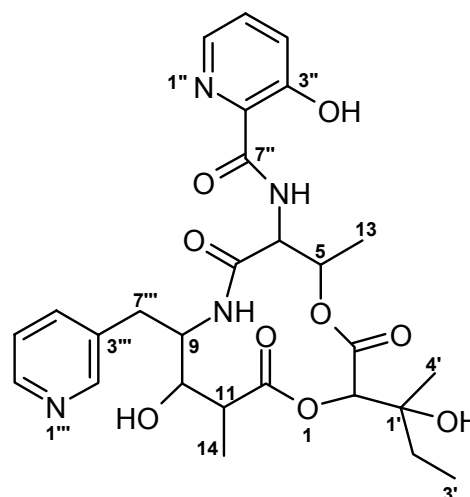
(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 221 (0.49) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 214 (-5.90), 303 (+1.31), 214 (-5.90), 303 (+1.31), 334 (-2.00) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +14.0° (c = 1.00, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  (Literatur) = +11.25° (c = 0.8, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 1.52 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2-CHCH<sub>3</sub>), 3.08 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, 8'-H<sub>2</sub>), 3.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, 9'-H<sub>2</sub>), 4.32 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, 2-CHCH<sub>3</sub>), 7.00 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.10 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.14 (s, 1H, 2'-H), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 7'-H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4'-H), 8.09 (s, 1H, 5-H).

10. Pyridomycinol (25)C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (558.59)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.32 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5)**Anfärbeverhalten:** grau (Orcin)  
weiß (Ehrlich).**Smp.:** 108 °C**EI-MS:** m/z (%) = 558 (100) [M]<sup>+</sup>, 205 (48), 93 (56).**HREI-MS:** 558.2327 gefunden wie berechnet.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3420, 2925, 1737, 1650, 1520, 1452, 1293, 1255, 1023 cm<sup>-1</sup>.**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 256 (0.14), 262 (0.15), 303 (0.25) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 265 (0.22), 303 (0.28) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 261 (0.18), 268 (0.12), 335 (0.27) nm.**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 208 (-1.79), 326 (+1.25), 335 (-2.39), 343 (+1.47) nm. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -52.0° (c = 1.00, CH<sub>3</sub>OH).**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, 3'-H<sub>3</sub>), 1.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 13-H<sub>3</sub>), 1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 14-H<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, 4'-H<sub>3</sub>), 1.65 (dq, *J* = 13.5, 7.0 Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 1.82 (dq, *J* = 13.5, 7.0 Hz, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.47 (dq, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 1H, 11-H), 2.96 (dd, *J* = 13.0, 10.0 Hz, 1H, 7''-H<sub>a</sub>), 3.08 (dd, *J* = 13.0, 4.0 Hz, 1H, 7''-H<sub>b</sub>), 3.61 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 10-H), 4.14 (m, 1H, 9-H), 4.64 (s, 1H, 2-H), 4.81 (dd, *J* = 7.0, 6.0 Hz, 1H, 6-H), 5.81 (dq, *J* = 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5-H), 7.26 (m, 1H, 5''-H), 7.32 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H, 5''-H), 7.43 (dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 8.08 (dd, *J* = 4.5, 1.0 Hz, 1H, 6''-H), 8.36 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, 6''-H), 8.43 (s, 1H, 2''-H), 8.82 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 8''-NH), 11.60 (br s, 1H, 3''-OH).**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8.4 (q, C-3'), 12.4 (q, C-13), 17.1 (q, C-14), 22.5 (q, C-4'), 32.4 (t, C-2'), 35.8 (t, C-7'''), 46.2 (d, C-11), 54.4 (d, C-6), 55.7 (d, C-9), 70.5 (d, C-5), 71.5 (d, C-10), 73.7 (s, C-1'), 78.9 (d, C-2), 124.3 (d, C-5''), 126.0 (d, C-5'''), 129.0 (d, C-4''), 130.8 (s, C-3'''), 134.6 (s, C-2''), 138.5 (d, C-4'''), 140.1 (d, C-6''), 146.7 (d, C-6'''), 149.6 (d, C-2'''), 157.7 (s, C-3''), 166.1 (s, C-7), 167.0 (s, C-3), 168.4 (s, C-7''), 173.0 (s, C-12).

### III Screening von Pilzen

#### 1. Stammhaltung und Langzeitkultivierung

Die Pilze wurden auf zwei verschiedenen Medien (E2, 1158) ausgestrichen und bei 25 °C acht bis zehn Tage inkubiert. Zur Stammhaltung verwendete man das Medium, auf dem das beste Wachstum zu beobachten war. Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert. Die Langzeitlagerung der Stämme erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### 2. Durchführung des chemischen Screenings

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in acht verschiedenen Medien (E2, 1158, SM, SGG, G20, 1549, 1405a, MB) in 1 L-Schüttelkolben (ohne Schikanen, Flieskappe), die jeweils mit 150 mL Nährlösung befüllt waren. Beimpft wurde mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte und bei 28 °C über 96 und 144 h inkubiert. Es wurden je zwei Kolben pro Nährmedium angesetzt, die bei gleichem Aussehen und pH-Wert zusammen aufgearbeitet wurden.

Die vereinigte Kulturbrühe (300 mL) wurde zentrifugiert (4500 rpm, 10 min), das Mycel 15 min mit 300 mL Aceton im Ultraschallbad extrahiert. Es folgte eine Filtration, wonach das Filtrat unter Vakuum eingengt wurde. Man erhielt den Aceton-Extrakt. Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 (50 mL) adsorbiert und das Adsorberharz anschließend mit 150 mL Wasser gewaschen. Es folgte die Eluation mit 150 mL Methanol mit anschließender Einengung des Lösungsmittels im Vakuum. Die so erhaltenen Extrakte (Aceton- und Methanol-Extrakt) wurden in je 3 mL Methanol/Wasser (1:1) gelöst und 5 µL dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in Laufmittelgemischen von Chloroform/Methanol (9:1) und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte optisch bei Substanzen mit auffälliger Eigenfarbe, durch UV-Absorption und Fluoreszenz bei 254 und 365 nm sowie mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Orcin, Ehrlichs Reagenz).

### 3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen

Fermentationen im größeren Maßstab wurden analog zu dem unter Kapitel II2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurden 4.8 L in Schüttelkolben und 1 L Ruhekolben kultiviert.

Die Aufarbeitung folgte ebenfalls Kapitel II2, wobei das Mycel dreimal mit je 1.5 L Aceton extrahiert und das Kulturfiltrat an XAD-2 (1 L) mit 1.5 L Methanol je Liter Kulturlösung eluiert wurde.

### 4. Metabolite aus A5

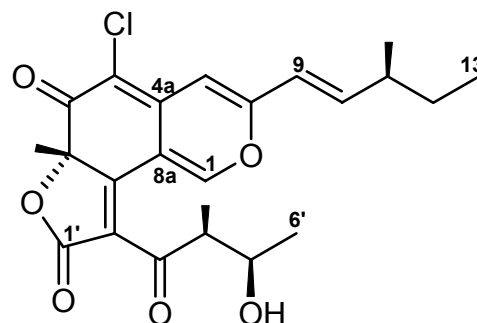
#### Chaetoviridin A (28)

C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>ClO<sub>6</sub> (432.90)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.62 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.95 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** leuchtend gelbe Eigenfarbe  
orange-gelb (Anisaldehyd)  
braun (Orcin)  
gelb-grün (Ehrlichs Reagenz).



**Smp.:** 121 °C

**EI-MS:** m/z (%) = 432 (6) [M]<sup>+</sup>, 389 (24), 332 (100).

**HREI-MS:** 432.1349 gefunden wie berechnet.

**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 455 (100) [M+Na]<sup>+</sup>, 433 (35) [M+H]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3445, 2947, 1770, 1676, 1624, 1243 cm<sup>-1</sup>.

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 304 (0.42), 365 (0.36), 451 (0.66) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 305 (0.46), 367 (0.40), 451 (0.69) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 303 (0.43), 366 (0.34), 443 (0.54) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +90° (c = 0.9, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{30}$  (Literatur<sup>89</sup>) = +98° (c = 0.05, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 13-H<sub>3</sub>), 1.10 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 11-CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 4'-CH<sub>3</sub>), 1.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 6'-CH<sub>3</sub>), 1.45 (m, 2H, 12-H<sub>2</sub>), 1.70 (s, 3H, 7-CH<sub>3</sub>), 2.28 (br s, 1H, 5'-OH), 2.30 (m, 1H, 11-H), 3.61 (m, 1H, 4'-H), 3.86 (m, 1H, 5'-H), 6.10 (d, *J* = 15.7 Hz,

<sup>1</sup>H, 9-H), 6.56 (s, 1H, 4-H), 6.60 (dd, *J* = 15.7, 8.3 Hz, 1H, 10-H), 8.80 (s, 1H, 1-H).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.6 (q, C-13), 13.5 (q, C-6'), 19.3 (q, 11-CH<sub>3</sub>), 21.5 (q, 4'-CH<sub>3</sub>), 26.3 (q, 7-CH<sub>3</sub>), 29.1 (t, C-12), 39.0 (d, C-11), 50.9 (d, C-4'), 70.9 (d, C-5'), 87.6 (s, C-7), 105.4 (d, C-4), 108.9 (s, C-5), 110.4 (s, C-8a), 119.7 (d, C-9), 125.0 (s, C-2'), 139.7 (s, C-4a), 148.1 (d, C-10), 151.5 (d, C-1), 157.0 (s, C-3), 162.8 (s, C-8), 167.9 (s, C-1'), 183.4 (s, C-6), 201.1 (s, C-3').

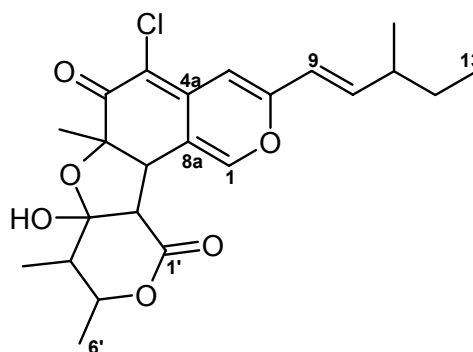
### Chaetoviridin B (29)

C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClO<sub>6</sub> (434.92)

R<sub>f</sub>-Wert: 0.59 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.93 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

Anfärbeverhalten: gelb-orange Eigenfarbe  
gelb (Anisaldehyd)  
braun (Orcin)  
gelb-grün (Ehrlichs Reagenz).



Smp.: 110 °C

EI-MS: *m/z* (%) = 434 (65) [M]<sup>+</sup>, 83 (100).

DCI-MS: *m/z* (%) = 196 (20) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 179 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

ESI-MS (positive Ionen): *m/z* (%) = 452 (26) [M+Na]<sup>+</sup>, 435 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

(negative Ionen): *m/z* (%) = 433 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3426, 2964, 1721, 1620, 1562, 1520, 1245 cm<sup>-1</sup>.

UV (CH<sub>3</sub>OH): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 224 (0.39), 384 (0.57), 429 (0.20) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/HCl): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 223 (0.58), 384 (0.62), 401 (0.53) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/NaOH): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 220 (0.45), 385 (0.55), 401 (0.49) nm.

CD (CH<sub>3</sub>OH): λ<sub>max</sub> (Δε) = 218 (-11.10), 240 (+6.32), 254 (+2.31), 271 (-10.04),  
291 (+1.87), 334 (-7.82) nm.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -88° (c = 0.9, CH<sub>3</sub>OH).

[α]<sub>D</sub><sup>30</sup> (Literatur<sup>89</sup>) = -104° (c = 0.13, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 13-H<sub>3</sub>), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 11-CH<sub>3</sub>), 1.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, 4'-CH<sub>3</sub>), 1.40 (s, 3H, 7-CH<sub>3</sub>), 1.41 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 1.43 (m, 2H, 12-H<sub>2</sub>), 1.86 (brs, 1H, 5'-OH), 1.91 (m, 1H, 4'-H), 2.26 (m, 1H, 11-H), 3.01 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, 8-H), 3.07 (d,

$J = 10.1$  Hz, 1H, 2'-H), 3.19 (brs, 1H, 3'-OH), 4.32 (m, 1H, 5'-H), 6.06 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, 9-H), 6.53 (dd,  $J = 15.7, 8.0$  Hz, 1H, 10-H), 6.55 (s, 1H, 4-H), 7.30 (s, 1H, 1-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8.7$  (q, 4'- $\text{CH}_3$ ), 11.6 (q, C-13), 18.6 (q, C-6'), 19.3 (q, 11- $\text{CH}_3$ ), 23.3 (q, 7- $\text{CH}_3$ ), 29.7 (t, C-12), 38.8 (d, C-11), 44.9 (d, C-4'), 50.2 (s, C-8), 58.1 (d, C'-2), 77.4 (d, C-5'), 83.6 (s, C-7), 104.0 (s, C-3'), 104.9 (d, C-4), 109.9 (s, C-5), 114.3 (s, C-8a), 120.1 (d, C-9), 140.5 (s, C-4a), 145.6 (d, C-1), 146.7 (d, C-10), 157.7 (s, C-3), 170.8 (s, C-1'), 189.1 (s, C-6).

## 5. Metabolite aus A2

### Adenosin (31)

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$  (267.24)

**$R_f$ -Wert:** 0.13 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)  
0.46 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** blau (Anisaldehyd)  
blau (Orcin).

**Smp.:** 209 °C

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 267 (6)  $[\text{M}]^+$ , 178 (30), 164 (86), 135 (100), 108 (16).

**HREI-MS:** 267.0970 gefunden wie berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3422, 3178, 2920, 2362, 1666, 1650, 1302, 1056$   $\text{cm}^{-1}$ .

**UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 201 (0.43), 259 (0.22) nm.

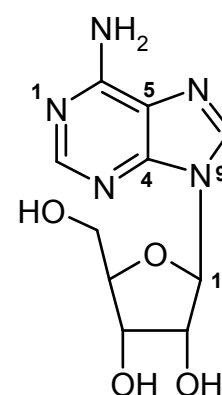
**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 206 (0.48), 258 (0.27) nm.

**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NaOH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 206 (0.36), 259 (0.20) nm.

**CD ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 207 (+2.79), 216 (-2.63), 227 (+0.99), 242 (-3.05), 262 (-3.59) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.0^\circ$  ( $c = 1.04$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta = 3.55$  (dd,  $J = 13.0, 6.0$  Hz, 1H, 5'- $\text{H}_a$ ), 3.65 (dd,  $J = 13.0, 6.0$  Hz, 1H, 5'- $\text{H}_b$ ), 3.95 (dt,  $J = 6.0, 3.0$  Hz, 1H, 4'-H), 4.14 (dd,  $J = 5.0, 3.0$  Hz, 1H, 3'-H), 4.59 (dd,  $J = 6.0, 5.0$  Hz, 1H, 2'-H), 5.43-5.81 (br s, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH), 5.87 (s, 1H, 1'-H), 7.26 (s, 2H, 6- $\text{NH}_2$ ), 8.12 (s, 1H, 2-H), 8.33 (s, 1H, 8-H).



**$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  = 61.6 (t, C-5'), 70.6 (d, C-3'), 73.4 (d, C-2'), 85.5 (d, C-4'), 87.9 (d, C-1'), 119.3 (s, C-5), 139.8 (d, C-6), 149.0 (s, C-4), 152.3 (d, C-2), 156.0 (s, C-8).

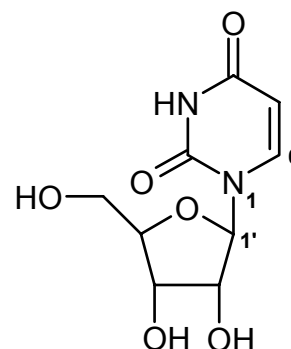
### Uridin (32)

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$  (244.20)

**$R_f$ -Wert:** 0.14 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)

0.49 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** gelb-grün (Anisaldehyd)  
blau (Orcin)  
weiß (Ehrlichs Reagenz).



**Smp.:** 138 °C

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 244 (10)  $[\text{M}]^+$ , 133 (71), 113 (100).

**HREI-MS:** 244.0695 gefunden wie berechnet.

**DCI-MS:**  $m/z$  (%) = 506 (5)  $[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 262 (100)  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 245 (14)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3396, 1700, 1681, 1269, 1096, 1052  $\text{cm}^{-1}$ .

**UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 206 (0.57), 261 (0.59) nm.

**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 205 (0.57), 261 (0.56) nm.

**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NaOH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 204 (0.91), 261 (0.48) nm.

**CD ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 220 (-4.32), 238 (-4.46), 271 (+7.24) nm.

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  = 3.55 (dd,  $J$  = 13.0, 6.0 Hz, 1H, 5'- $\text{H}_a$ ), 3.65 (dd,  $J$  = 13.0, 6.0 Hz, 1H, 5'- $\text{H}_b$ ), 3.82 (dt,  $J$  = 6.0, 3.0 Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (dd,  $J$  = 6.0, 5.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.02 (dd,  $J$  = 5.0, 3.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.00 – 5.30 (br s, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH), 5.61 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 5.79 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, 1'-H), 7.85 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 11.20 (br s, 1H, 3-NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  = 60.9 (t, C-5'), 69.9 (d, C-3'), 73.6 (d, C-2'), 84.8 (d, C-4'), 87.7 (d, C-1'), 101.8 (d, C-5), 140.7 (d, C-6), 150.8 (s, C-2), 163.2 (s, C-4).

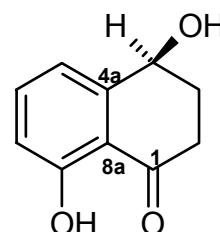
### Isoscleron (30)

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$  (178.19)

**$R_f$ -Wert:** 0.61 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)

0.92 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** braun (Anisaldehyd)





blaugrau (Orcin)  
hellgrau (Ehrlichs Reagenz).

**Smp.:** 74 °C

**DCI-MS:**  $m/z$  (%) = 196 (20)  $[M+NH_4]^+$ , 179 (100)  $[M+H]^+$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3425, 2927, 1636, 1455, 1341, 1245, 1163, 808, 746  $cm^{-1}$ .

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 214 (1.38), 258 (0.72), 331 (0.30) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 214 (1.56), 258 (0.68), 331 (0.28) nm.

**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 215 (1.17), 258 (0.67), 334 (0.28) nm.

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 210 (+21.92), 229 (-3.33), 259 (-9.68) nm.

$[\alpha]_D^{20}$  = +17.1° (c = 0.8, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_D^{15}$  (Literatur<sup>93</sup>) = +19° (c = 0.34, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 2.17 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.33 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 2.63 (m, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 2.98 (m, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 4.89 (dd,  $J$  = 5.9, 3.7 Hz, 1H, 4-H), 6.90 (dd,  $J$  = 8.3, 1.8 Hz, 1H, 7-H), 7.00 (dd,  $J$  = 7.4, 1.8 Hz, 1H, 5-H), 7.47 (dd,  $J$  = 8.3, 7.4 Hz, 1H, 6-H), 12.40 (s, 1H, 8-OH).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 32.5 (t, C-3), 35.9 (t, C-2), 68.2 (d, C-4), 116.5 (s, C-8a), 117.7 (d, C-5), 118.8 (d, C-7), 137.9 (d, C-6), 148.5 (s, C-4a), 163.7 (s, C-8), 206.2 (s, C-1).

## 6. Metabolite aus MH13

### $\alpha$ -Acetylorscinol (**33**)

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (166.18)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.54 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.92 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** dunkelbraun (Anisaldehyd)

blaugrau (Orcin)

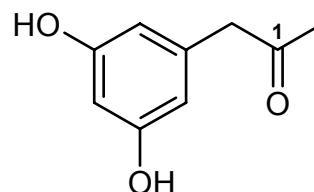
lila (Ehrlichs Reagenz).

**ESI-MS (positive Ionen):**  $m/z$  (%) = 355 (100)  $[2M+Na]^+$ , 189 (30)  $[M+Na]^+$ .

**DCI-MS:**  $m/z$  (%) = 350 (34)  $[2M+NH_4]^+$ , 201 (12)  $[M+NH_3+NH_4]^+$ , 184 (100)  $[M+NH_4]^+$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3394, 1704, 1618, 1603, 1457, 1355, 1308, 1163  $cm^{-1}$ .

**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 201 (1.70), 282 (0.17) nm.



(CH<sub>3</sub>OH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 202 (1.96), 283 (0.15) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 207 (1.55), 293 (0.19) nm.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 2.16 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.59 (s, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 6.20 (m, 3H, 4-H, 6-H, 8-H).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 29.0 (q, COCH<sub>3</sub>), 51.7 (t, C-2), 102.3 (d, C-6), 108.9 (d, C-4, C-8), 137.9 (s, C-3), 159.9 (s, C-5, C-7), 209.7 (s, C-1).

### **cis-4-Hydroxyscytalon (35)**

C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (210.19)

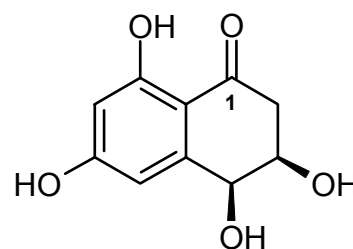
R<sub>f</sub>-Wert: 0.40 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

0.91 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).

Anfärbeverhalten: dunkelbraun (Anisaldehyd)

blau (Orcin)

lila (Ehrlichs Reagenz).



Smp.: 92 °C

ESI-MS (negative Ionen): m/z (%) = 419 (42) [2M-H]<sup>-</sup>, 209 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3424, 1631, 1381, 1266, 1167 cm<sup>-1</sup>.

UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 215 (1.32), 232 (0.74), 282 (0.99) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 215 (1.25), 232 (0.72), 282 (1.00) nm.

(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 216 (1.02), 254 (0.43), 333 (1.95) nm.

CD (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 211 (+18.74), 233 (-4.99), 247 (-0.67), 279 (-10.81), 304 (+3.95) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = -11.0° (c = 1.00, CH<sub>3</sub>OH).

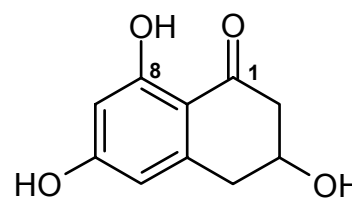
$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  (Literatur<sup>98</sup>) = -56° (c = 0.25, 95% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = 2.83 (d, J = 5.0 Hz, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 4.28 (m, 1H, 3-H), 4.76 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4-H), 6.19 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 7-H), 6.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 5-H), 12.64 (s, 2H, 6-OH, 8-OH).

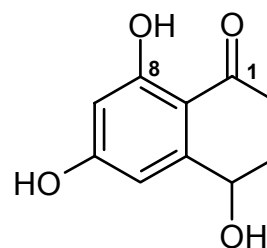
<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = 41.9 (t, C-2), 68.6 (d, C-3), 69.2 (d, C-4), 100.5 (d, C-7), 106.8 (d, C-5), 108.2 (s, C-8a), 146.5 (s, C-4a), 164.2 (s, C-8/C-6), 204.9 (s, C-1).

**Scytalon (36)**C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (194.19)

**Anfärbeverhalten:** baun (Anisaldehyd)  
 helllila (Orcin)  
 helllila (Ehrlichs Reagenz).

**ESI-MS (negative Ionen):** m/z (%) = 193 (100) [M-H]<sup>-</sup>.**DCI-MS:** m/z (%) = 229 (13) [M+NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 212 (95) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 195 (100) [M+H]<sup>+</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3442, 2926, 2363, 1634, 1383 cm<sup>-1</sup>.**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 215 (0.58), 282 (0.42), 317 (0.20) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 215 (0.65), 282 (0.47), 316 (0.21) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 203 (1.01), 220 (0.56), 332 (0.80) nm.**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 2.58 (m, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 2.84 (m, 2H, 4-H<sub>a</sub>, 2-H<sub>b</sub>), 3.08 (m, 1H, 4-H<sub>b</sub>), 4.24 (m, 1H, 3-H), 6.10 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, 7-H), 6.22 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, 5-H).**<sup>13</sup>C-NMR (150.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 39.1 (t, C-4), 47.4 (t, C-2), 66.9 (d, C-3), 101.6 (d, C-7), 109.4 (d, C-5), 110.4 (s, C-8a), 146.0 (s, C-4a), 166.6 (s, C-8), 166.7 (s, C-6), 202.5 (s, C-1).**6-Hydroxyisoscлерon (37)**C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (194.19)

**Anfärbeverhalten:** baun (Anisaldehyd)  
 helllila (Orcin)  
 helllila (Ehrlichs Reagenz).

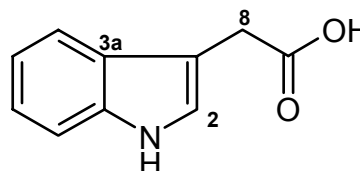
**ESI-MS (negative Ionen):** m/z (%) = 193 (100) [M-H]<sup>-</sup>.**DCI-MS:** m/z (%) = 229 (13) [M+NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 212 (95) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 195 (100) [M+H]<sup>+</sup>.**IR (KBr):** siehe Scytalon (36).**UV (CH<sub>3</sub>OH):** siehe Scytalon (36).**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 2.02 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.23 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 2.60 (m, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 2.76 (m, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 4.72 (dd,  $J$  = 8.5, 4.0 Hz, 1H, 4-H), 6.16 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, 7-H), 6.55 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, 5-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150.8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta = 32.7$  (t, C-3), 35.7 (t, C-2), 68.5 (d, C-4), 102.5 (d, C-7), 107.4 (d, C-5), 110.4 (s, C-8a), 151.3 (s, C-4a), 166.8 (s, C-8), 166.9 (s, C-6), 203.7 (s, C-1).

### Indolessigsäure (34)

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$  (175.19)

**$R_f$ -Wert:** 0.40 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)  
0.93 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).



**Anfärbeverhalten:** rosa (Anisaldehyd)  
blau (Orcin)  
blau (Ehrlichs Reagenz).

**ESI-MS (negative Ionen):**  $m/z$  (%) = 174 (100)  $[\text{M-H}]^-$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3411, 2928, 1707, 1620, 1458, 744 \text{ cm}^{-1}$ .

**UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 219 (3.39), 281 (0.72), 289 (0.63) nm.

**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 219 (3.65), 279 (0.75), 289 (0.64) nm.

**( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NaOH}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 222 (3.29), 281 (0.69), 290 (0.61) nm.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta = 3.70$  (s, 2H, 8- $\text{H}_2$ ), 7.00 (ddd,  $J = 7.5, 7.0, 1.0$  Hz, 1H, 5-H/6- $\text{H}^*$ ), 7.08 (ddd,  $J = 7.5, 7.0, 1.0$  Hz, 1H, 5-H/6- $\text{H}^*$ ), 7.19 (s, 1H, 2-H), 7.32 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 7-H), 7.54 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 4-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta = 32.0$  (t, C-8), 109.0 (s, C-3), 112.2 (d, C-7), 119.4 (d, C-4/C-5\*), 119.8 (d, C-4/C-5\*), 122.4 (d, C-6), 124.6 (d, C-2), 128.7 (s, C-3a), 138.0 (s, C-7a), 176.6 (s, C-9).

\*: (x/y) Zuordnung nicht möglich

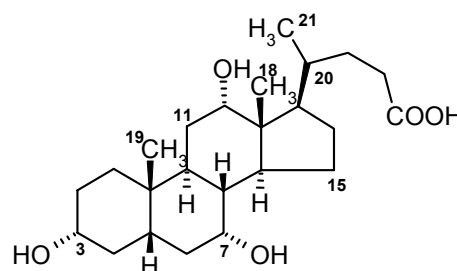
## 7. Metabolite aus MH11

### Cholsäure (38)

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$  (408.58)

**$R_f$ -Wert:** 0.19 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1)  
0.89 ( $\text{BuOH}/\text{Eisessig}/\text{H}_2\text{O}$  4:1:5).

**Anfärbeverhalten:** ocker (Anisaldehyd)  
dunkelgelb (Orcin)  
schwach weiß (Ehrlich).



**Smp.:** 71 °C

**ESI-MS (positive Ionen):**  $m/z$  (%) = 862 (82)  $[2M-H+2Na]^+$ , 840 (53)  $[2M+Na]^+$ ,  
432 (7)  $[M+Na]^+$ .

**(negative Ionen):**  $m/z$  (%) = 408 (100)  $[M-H]^-$ .

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3422, 2934, 2858, 2363, 1703, 1382, 1077, 1041  $\text{cm}^{-1}$ .

**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 209 (-8.25), 219 (-9.30), 241 (+0.68), 261 (-1.60), 297  
(-2.75), 316 (-2.87), 344 (+1.36) nm.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +19.0° (c = 1.01, CH<sub>3</sub>OH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  (Literatur<sup>69</sup>) = +27.5 (c = 0.75, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 0.72 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>),  
0.99 (m, 1H, 1-H<sub>a</sub>), 1.02 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 1.12 (m, 1H, 15-H<sub>a</sub>), 1.32  
(m, 1H, 16-H<sub>a</sub>), 1.35 (m, 1H, 22-H<sub>a</sub>), 1.38 (m, 1H, 5-H), 1.43 (m, 1H, 20-H), 1.45  
(m, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 1.53 (m, 1H, 6-H<sub>a</sub>), 1.55 (m, 1H, 8-H), 1.58 (m, 2H, 11-H<sub>2</sub>), 1.59  
(m, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 1.66 (m, 1H, 4-H<sub>a</sub>), 1.76 (m, 1H, 15-H<sub>b</sub>), 1.79 (m, 1H, 22-H<sub>b</sub>),  
1.81 (m, 1H, 1-H<sub>b</sub>), 1.86 (m, 1H, 17-H), 1.90 (m, 1H, 16-H<sub>b</sub>), 1.95 (m, 1H, 6-H<sub>b</sub>),  
2.00 (m, 1H, 14-H), 2.21 (m, 1H, 23-H<sub>a</sub>), 2.25 (m, 1H, 9-H), 2.25 (m, 1H, 4-H<sub>b</sub>),  
2.37 (m, 1H, 23-H<sub>b</sub>), 3.37 (m, 1H, 3-H), 3.80 (m, 1H, 7-H), 3.79 (m, 1H, 12-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 13.0 (q, C-18), 17.6 (q, C-21), 23.2 (q, C-  
19), 24.2 (t, C-15), 27.9 (d, C-9), 28.7 (t, C-1), 29.6 (t, C-11), 31.2 (t, C-2), 32.4  
(s, C-13), 32.5 (C-23), 35.8 (s, C-10), 35.9 (t, C-6), 36.5 (t, C-22), 36.8 (d, C-  
20), 40.5 (t, C-4), 41.0 (d, C-8), 43.0 (d, C-14), 43.2 (d, C-5), 47.5 (t, C-16), 48.1  
(d, C-17), 69.1 (d, C-7), 72.9 (d, C-3), 74.0 (d, C-12), 178.8 (s, C-24).

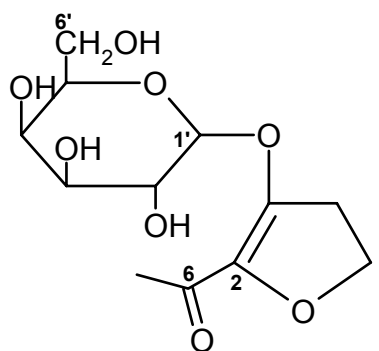
**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>):**  $\delta$  = 12.7 (q, C-18), 17.3 (q, C-21), 22.9 (q,  
C-19), 23.4 (t, C-15), 27.1 (d, C-9), 27.8 (t, C-1), 29.4 (t, C-11), 31.4 (t, C-2),  
31.7 (s, C-13), 31.9 (t, C-23), 35.0 (s, C-10), 35.5 (t, C-6), 35.7 (t, C-22), 35.9  
(d, C-20), 40.4 (t, C-4), 40.7 (d, C-8), 42.2 (d, C-14), 42.4 (d, C-5), 46.6 (t, C-  
16), 47.0 (d, C-17), 67.4 (d, C-7), 71.6 (d, C-3), 72.1 (d, C-12), 176.5 (s, C-24).

## 8. Metabolite aus A4

**O-Galactosylisomaltol (39)**C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> (288.25)**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.15 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)0.46 (BuOH/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:5).**Anfärbeverhalten:** gelb (Anisaldehyd)

schwach beige (Orcin)

schwach blau (Ehrlichs Reagenz).

**Smp.:** 76 °C**ESI-MS (positive Ionen):** m/z (%) = 599 (92) [2M+Na]<sup>+</sup>, 311 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.**(negative Ionen):** m/z (%) = 547 (28) [2M-H]<sup>-</sup>, 287 (19) [M-H]<sup>-</sup>.**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3426, 2932, 1652, 1588, 1456, 1274, 1104, 1021 cm<sup>-1</sup>.**UV (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 200 (0.11), 276 (0.48) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/HCl):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 201 (0.31), 276 (0.56) nm.**(CH<sub>3</sub>OH/NaOH):**  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 204 (0.45), 276 (0.53) nm.**CD (CH<sub>3</sub>OH):**  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) = 204 (+16.05), 232 (+9.17), 276 (-4.29), 299 (+8.02), 317 (+8.42), 334 (+9.35) nm. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = +59.0 (c = 0.99, CH<sub>3</sub>OH).**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 2.48 (s, 3H, 7-H<sub>3</sub>), 3.42 (dd, *J* = 10.0, 9.0 Hz, 1H, 4'-H), 3.57 (m, 1H, 5'-H), 3.60 (dd, *J* = 10.0, 3.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.68 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H, 6'-H<sub>a</sub>), 3.74 (dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6'-H<sub>b</sub>), 3.83 (dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.56 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1'-H), 6.76 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5-H).**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 27.4 (q, C-7), 62.2 (t, C-6'), 71.2 (d, C-4'), 72.9 (d, C-2'), 74.8 (d, C-3'), 75.5 (d, C-5'), 101.4 (d, C-1'), 105.9 (t, C-4), 139.3 (s, C-3), 148.6 (t, C-5), 154.4 (s, C-2), 187.5 (s, C-6).

## IV Screening der Tiefseemuschelein

### 1. Metabolite aus *Acharax* sp.

#### Cholesterin (40)

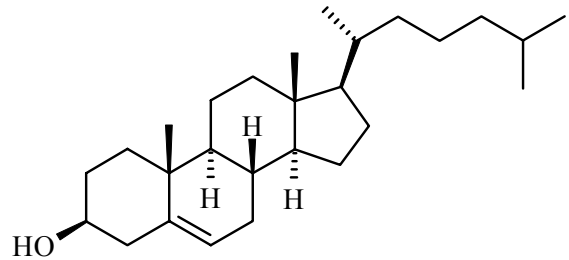
$C_{27}H_{46}O$  (286.66)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.78 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1).

**Anfärbeverhalten:** gelb (Anisaldehyd).

**Smp.:** 147 °C

**EI-MS:** m/z (%) = 386 (100) [M]<sup>+</sup>, 368 (22), 301 (19), 275 (26).



### 2. Metabolite aus *Calyptogena* sp.

#### Schwefel (41)

S<sub>8</sub> (256.48)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.95 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1)

**Anfärbeverhalten:** weiß (Anisaldehyd)

**EI-MS:** m/z (%) = 256 (100) [S<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 192 (19) [S<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 160 (38) [S<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 128 (42) [S<sub>4</sub>]<sup>+</sup>,  
96 (17) [S<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 64 (57) [S<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**DCI-MS:** m/z (%) = 256 (100) [S<sub>8</sub>]<sup>+</sup>, 224 (18) [S<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 192 (58) [S<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 160 (41) [S<sub>5</sub>]<sup>+</sup>.

## C.Literaturverzeichnis

- 1) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* 2000, 17, 215-234.
- 2) Zeeck, G. Bach, H. Terlau, *Internist* 2001, 42, 1422-1427.
- 3) L. J. Nisbet, M. Moore, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 707-712.
- 4) T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* 1999, 111, 688-691.
- 5) K. Katano, H. An, Y. Aoyagi, M. Overhand, S. J. Sucheck, W. C. Stevens, C. D. Hess, X. Zhou, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 11285-11296.
- 6) J. Endo, Y. Negishi, T. Iwashita, K. Mizukawa, M. Hirama, *J. Antibiot.* 1985, 38, 444-448.
- 7) J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chem. Biol.* 1998, 5, 245-249.
- 8) Autorenkollektiv, *Extremophile: Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen* (Editor: K. Hausmann, B. P. Kremer), VCH-Verlag, Weinheim, 1994.
- 9) <http://16w.gwdg.de/~ucoc/zeeck/hom3.html>.
- 10) D. J. Faulkner, *Tetrahedron* 1977, 33, 1421-1443.
- 11) P. J. Scheuer, *Fortschr. Chem. Org. Nat.* 1964, 22, 265-278.
- 12) W. A. Gallimore, M. Kelly, P. J. Scheuer, *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 741-744.
- 13) T. Goto, Y. Kishi, S. Takahashi, Y. Hirata, *Tet. Lett.* 1964, 13-4, 779-786.
- 14) T. Yasumoto, M. Yotsu, A. Endo, *Pure Appl. Chem.* 1989, 61, 505-508.
- 15) M. Yotsu, T. Yamazaki, Y. Meguro, A. Endo, M. I. Murata, H. Naoki, T. Yasumoto, *Toxicon* 1987, 25, 225-228.
- 16) T. Yasumoto, D. Yasumura, M. Yotsu, T. Michishita, A. Endo, Y. Kotaki, *Agric. Biol. Chem.* 1986, 50, 793-795.
- 17) T. Noguchi, J. K. Jeon, O. Arakawa, H. Sugita, Y. Deguchi, Y. Shida, K. Hashimoto, *J. Biochem.* 1986, 99, 331-334.
- 18) D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* 1984, 1, 551-598.
- 19) G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 6846-6848.



- 
- <sup>20)</sup> R. Mutter, M. Wills, *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1841-1860.
- <sup>21)</sup> K. J. Hale, M. G. Hummersone, S. Manaviazar, M. Frigerio, *Nat. Prod. Rep.* 2002, 19, 413-453.
- <sup>22)</sup> R. G. Kerr, J. Lawry, K. A. Gush, *Tet. Lett.* 1996, 37, 8305-8308.
- <sup>23)</sup> M. G. Haygood, S. K. Davidson, *Appl. Environ. Microb.* 1997, 63, 4612-4616.
- <sup>24)</sup> S. K. Davidson, S. W. Allen, G. E. Lim, C. M. Anderson, M. G. Haygood, *Appl. Environ. Microb.* 2001, 67, 4531-4537.
- <sup>25)</sup> D. Mendola, *Drugs from the Sea*, Basel, 2000, 20.
- <sup>26)</sup> B. M. Olivera, J. Rivier, C. Clark, C. A. Ramilo, G. P. Corpuz, F. C. Abogadie, E. E. Mena, S. R. Woodward, D. R. Hillyard, L. J. Cruz, *Science* 1990, 249, 257-263.
- <sup>27)</sup> R. A. Meyers, L. J. Cruz, J. E. Rivier, B. M. Olivera, *Chem. Rev.* 1993, 93, 1923-1936.
- <sup>28)</sup> H. Terlau, K. Shon, M. Gilley, M. Stocker, W. Stühmer, B. M. Olivera, *Nature* 1996, 381, 148-151.
- <sup>29)</sup> R. B. Jacobsen, A. D. Koch, B. Lange-Malecki, M. Stocker, J. Verhey, R. M. Van Wagoner, A. Vyazovkina, B. M. Olivera, H. Terlau, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 24639-24644.
- <sup>30)</sup> Harvey, *Drug Disc. Today* 2000, 5, 294-300.
- <sup>31)</sup> A. Bewley, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4849-4852.
- <sup>32)</sup> M. Kobayashi, K. Kanzaki, S. Katayama, K. Ohashi, H. Okada, S. Ikegami, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, 1410-1415.
- <sup>33)</sup> Y. Nakao, A. Masuda, S. Matsunga, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 2425-2431.
- <sup>34)</sup> M. C. Roy, I. I. Ohtani, T. Ichiba, J. Tanaka, R. Satari, T. Higa, *Tetrahedron* 2000, 56, 9079-9092.
- <sup>35)</sup> D. P. Clark, J. Carroll, S. Naylor, P. Crews, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 8757-8764.
- <sup>36)</sup> P. W. Ford, K. R. Gustafson, T. C. McKee, N. Shigematsu, L. K. Maurizi, L. K. Pannell, D. E. Williams, E. D. de Silva, P. Lassota, T. M. Allen, R. Van Soest, R. J. Andersen, M. R. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5899-5909.

- 
- <sup>37)</sup> M. Kobayashi, J. Tanaka, T. Katori, M. Matsuura, I. Kitawaga, *Tet. Lett.* 1989, 30, 2963-2966.
- <sup>38)</sup> S. Carmely, Y. Kashman, *Tet. Lett.* 1985, 26, 511-514.
- <sup>39)</sup> M. Kobayashi, J. Tanaka, T. Katori, I. Kitawaga, *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 2960-2966.
- <sup>40)</sup> Umeyama, N. Shoji, M. Enoki, S. Arihara, *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 296-298.
- <sup>41)</sup> M. Kobayashi, K. Kawazoe, T. Katori, I. Kitawaga, *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40, 1773-1778.
- <sup>42)</sup> Qureshi, D. J. Faulkner, *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 841-842.
- <sup>43)</sup> S. Matsunaga, S. Nishimura, N. Fusetani, *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 816-818.
- <sup>44)</sup> L. Minale, R. Riccio, G. Sodano, *Tet. Lett.* 1974, 38, 3401-3404.
- <sup>45)</sup> W. E. Müller, M. Böhm, R. Batel, S. De Rosa, G. Tommonaro, I. M. Müller, H. C. Schröder, *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1077-1081.
- <sup>46)</sup> W. E. Müller, Vortrag, 3rd European Conference on Marine Natural Products, 2002.
- <sup>47)</sup> M. Murata, H. Naoki, S. Matsunga, M. Satake, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 7098-7107.
- <sup>48)</sup> M. Murata, T. Yasumoto, *Nat. Prod. Rep.* 2000, 17, 293-314.
- <sup>49)</sup> M. Murata, A.-M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4380-4386.
- <sup>50)</sup> Yokoyama, M. Murata, Y. Oshima, T. Iwashita, T. Yasumoto, *J. Biochem.* 1998, 104, 184-187.
- <sup>51)</sup> M. Murata, H. Naoki, T. Iwashita, S. Matsunaga, M. Sasaki, A. Yokoyama, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 2060-2062.
- <sup>52)</sup> M. Takahashi, Y. Ohizumi, T. Yasumoto, *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 7287-7289.
- <sup>53)</sup> T. J. Mincer, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical, *Appl. Environ. Microb.* 2002, 68, 5005-5011.
- <sup>54)</sup> R. H. Felting, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 355-357.
- <sup>55)</sup> S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* 1949, 109, 305-307.

- 
- <sup>56)</sup> S. Omura, *The Search for bioactive microbial compounds from microorganisms*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1992.
- <sup>57)</sup> R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000, 4, 445-451.
- <sup>58)</sup> S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuna, Y. Horiyuchi, T. Usi, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* 1970, 40, 953-956.
- <sup>59)</sup> H. Zähner, H. Drautz, W. Weber, *Bioactiv Microbial Product-Search and Discovery*, Eds.: J. D. Bullock, L. J. Nisbet, D. J. Winstley, Academic Press, London, New York 1982, 51-71.
- <sup>60)</sup> S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, *The Chemical Screening Approach in Drug Discovery from Nature*, edited by S. Grabley, R. Thiericke, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1999, 124-149.
- <sup>61)</sup> L. Krasu, A. Kocj, S. Hoffstetter-Kuhn, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1995.
- <sup>62)</sup> H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* 1993, 2, 119-128.
- <sup>63)</sup> W. Ihn, S. Heinze, U. Gräfe, *Biospektrum* 1997, 3, 39-42.
- <sup>64)</sup> M. Stadler, T. Henkel, H. Mueller, K. Weber, H. Schlecker, *J. Chromatogr.* 1998, 818, 187-195.
- <sup>65)</sup> G. Brinkmann, K. Messer, M. Wohlfahrt, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* 1999, 71, 2678-2686.
- <sup>66)</sup> G. G. Yarbrough, D. P. Taylor, R. T. Rowlands, M. S. Crawford, L. L. Lasure, *J. Antibiot.* 1993, 46, 535-544.
- <sup>67)</sup> H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank Antibase*, Chemical Concepts, Weinheim 2000.
- <sup>68)</sup> R. A. Russel, R. W. Irvine, R. N. Warrenner, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 1595-1599.
- <sup>69)</sup> Autorenkollektiv, *Dictionary of Natural Products on CD-Rom*, Version 11:1 1982-2003, Chapman & Hall, London, 2003.
- <sup>70)</sup> *Römpp Lexikon, Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997.
- <sup>71)</sup> H. Brockmann, B. Franck, *Chem. Berichte* 1955, 88, 1792-1818.
- <sup>72)</sup> H. Brockmann, H. Brockmann JR., *Chem. Berichte* 1961, 94, 2681-2694.
- <sup>73)</sup> K. Krohn, M. Klimars, H.-J. Köhle, E. Ebeling, *Tetrahedron* 1984, 40, 3677-3694.
- <sup>74)</sup> C. Puder, S. Loya, A. Hizi, A. Zeeck, *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 42-45.

- <sup>75)</sup> M. J. Arco, M. H. Trammell, J. D. White, *J. Org. Chem.* 1976, 41, 2075-2083.
- <sup>76)</sup> D. M. Ashworth, C. A. Clark, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1989, 1461-1467.
- <sup>77)</sup> U. Schmidt, J. Werner, *Synthesis* 1986, 986-992.
- <sup>78)</sup> R. Saladino, E. Mincione, C. Crestini, M. Mezzetti, *Tetrahedron* 1996, 52, 6759-6780.
- <sup>79)</sup> M. Adamczeski, A. R. Reed, P. Crews, *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 201-208.
- <sup>80)</sup> K.-I. Hayashi, H. Nozaki, *J. Antibiot.* 1999, 52, 325-328.
- <sup>81)</sup> Z. Wang, D. R. Prudhomme, J. R. Buck, M. Park, C. J. Rizzo, *J. Org. Chem.* 2000, 65, 5969-5985.
- <sup>82)</sup> R. Katritzky, K. W. Law, *Magn. Reson. Chem.* 1988, 26, 129-133.
- <sup>83)</sup> Puder, Dissertation (ISBN 3-89712-378-9), Universität Göttingen, 1998.
- <sup>84)</sup> P. Krastel, Dissertation (ISBN 3-89873-110-3), Universität Göttingen, 2000.
- <sup>85)</sup> S. Omura, Y. Suzuki, C. Kitao, Y. Takahashi, Y. Konda, *J. Antibiot.* 1975, 28, 609-610.
- <sup>86)</sup> Y. Konda, Y. Suzuki, S. Omura, M. Onda, *Chem. Pharm. Bull.* 1976, 24, 92-96.
- <sup>87)</sup> M. Holzenkämpfer, Dissertation (ISBN 3-89873-363-7), Universität Göttingen, 2001.
- <sup>88)</sup> R. J. Cole, R. H. Cox, *Handbook of Toxic and Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco, 1981.
- <sup>89)</sup> M. Takahashi, K. Koyama, S. Natori, *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 625-628.
- <sup>90)</sup> H. Tomoda, C. Matsushima, N. Tabata, I. Namatame, H. Tanaka, M. J. Bamberger, H. Arai, M. Fukazawa, K. Inoue, S. Omura, *J. Antibiot.* 1999, 52, 160-170.
- <sup>91)</sup> ACD/Labs 6.00.
- <sup>92)</sup> Y. Fujimoto, E. Yokoyama, T. Takahashi, J. Uzawa, N. Morooka, H. Tsunoda, T. Tatsuno, *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 1497-1500.
- <sup>93)</sup> T. Morita, H. Aoki, *Agr. Biol. Chem.* 1974, 38, 1501-1505.

- 
- <sup>94)</sup> M.-T. Chenon, R. J. Pugmire, D. M. Grant, R. P. Panzica, L. B. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 4627-4636.
- <sup>95)</sup> T. R. Krugh, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 4761-4762.
- <sup>96)</sup> M. Nukina, S. Marumo, *Agric. Biol. Chem.* 1977, 41, 717.
- <sup>97)</sup> J. Baiocchi, *J. Het. Chem.* 1988, 25, 1905.
- <sup>98)</sup> U. Sankawa, H. Shimada, T. Sato, T. Kinoshita, K. Yamasaki, *Chem. Pharm. Bull.* 1981, 29, 3536-3542.
- <sup>99)</sup> D. C. Aldridge, A. B. Davies, M. R. Jackson, W. B. Turner, *J.C.S. Perkin I* 1974, 1540-1541.
- <sup>100)</sup> S. Iwasaki, H. Muro, K. Sasaki, S. Nozoe, S. Okuda, *Tet. Lett.* 1973, 37, 3537-3542.
- <sup>101)</sup> A. Bell, R. D. Stipanovic, J. E. Puhalla, *Tetrahedron* 1976, 32, 1353-1356.
- <sup>102)</sup> Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spektre 1992, 3, 594B.
- <sup>103)</sup> D. N. Kirk, H. C. Toms, C. Douglas, K. A. White, *J.C.S. Perkin 2* 1990, 1567-1594.
- <sup>104)</sup> R. C. Fox, P. D. Taylor. *Synth. Com.* 1999, 29, 989-1001.
- <sup>105)</sup> F. J. Morale, A. Arnoldi, *Food Chem.* 1999, 67, 185-191.
- <sup>106)</sup> Prof. Dr. J. F. Imhoff, Universität Kiel, persönliche Mitteilung, 1999.
- <sup>107)</sup> G. P. Pettit, *Chem. Commun.* 1999, 915-916.
- <sup>108)</sup> Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie, Merck, Darmstadt, 1980.

## Danksagung

Bei Hans-Peter Kroll, Martin Weitemeyer und Jutta Gerber-Nolte möchte ich mich für deren hervorragende experimentelle Mitarbeit bedanken und bei Michaela Klingebiel für die vielen mit Freude gemessenen Spektren und Schmelzpunkte.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich Herrn R. Machinek, Frau C. Zolke, C. Siebert und nochmals Martin Weitemeyer. Aus unserer Abteilung sei Diana Wolff, Sven Meyer, Oliver Schlörke, Jens Bitzer, Moritz Arnold, Tim Schumann und Stefanie Grond gedankt. Für die Aufnahme der Massenspektren danke ich Herrn G. Remberg, Herrn H. Frauendorfer, Frau G. Udvarnoki und Karsten Ströch.

Den Computerbeauftragten der Abteilung, Jens Bitzer und Gerald Thormann, sei auf diesem Weg gedankt für die Betreuung, Wartung und Reparatur der Rechner und für die Hilfe bei Computerfragen.

Für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen möchte ich mich bei Diana Wolff und Karsten Ströch bedanken.

Bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und für die vielen netten Stunden im Kaffeeraum.

Bei Diana möchte ich mich für die schöne Zeit in Japan, auf Schloss Elmau, die Spielerabende, die Idee mit dem Reitsport anzufangen und die verquatschten Stunden im Labor bedanken.

Für die vielen Videoabende mit Pizzaservice, Diskussionen über Action- und Gruselfilme und die ausgeliehenen Fantasybücher sag ich einfach: Danke Martin!

Mein besonderer Dank gilt Jörg Weber, der mir immer zur Seite steht, sei es bei Computerfragen oder wenn mein Auto kaputt ist. Ich danke ihm für die schönen Wochenendausflüge und dafür, dass er einfach für mich da ist.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich immer auf meinem Weg unterstützt haben.

## **Lebenslauf**

Am 1. April 1975 wurde ich als Tochter von Sigrid Schulze, geborene Bar und Rainer Schulze in Dessau geboren.

Von August 1981 bis Juni 1990 besuchte ich die Polytechnische Oberschule Walter Nicolai in Wittenberg. Ab August 1990 war ich Schüler des Martin Luther Gymnasium, welches ich im Juni 1993 mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Im Wintersemester 1993/94 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg August Universität in Göttingen, und legte im Juli 1996 die Diplom-Vorprüfung ab. In der Zeit von April 1998 bis März 1999 fertigte ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel „Beiträge zur Isolierung und Strukturaufklärung von Cladospiron und Mutolid aus Mutanten des Pilzes F24'707“ an und legte im Mai 1999 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab.

Von Juni 1999 bis März 2003 fertigte ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck meine Dissertation mit dem Titel „Metabolite aus marinen und terrestrischen Bakterien und Pilzen sowie Untersuchungen von Invertebraten der Tiefsee“ an und legte im Mai 2003 die Promotionsprüfung ab.

Ich habe die deutsche Staatsbürgerschaft.

Göttingen, 25. März 2003