Zur Biosynthese des Borrelidins sowie Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus marinen und terrestrischen Mikroorganismen

Dissertation

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

vorgelegt von
Inken Plitzko
aus Buchholz i.d.N

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. H. Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen von Juni 2004 bis Mai 2007 unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Axel Zeeck danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die wertvollen Diskussionen, die den Weg zur vorliegenden Arbeit begleitet haben.

Meinen Eltern

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein

A THEORETISCHER TEIL 1

1 Einleitung 1

1.1 Entwicklungen in der Malariabekämpfung 1

1.1.1 Etablierte Antimalariawirkstoffe 2

1.1.2 Neue Wege in der Malariabekämpfung 5

1.2 Herkunft neuer Leitstrukturen 6

1.3 Die Suche nach neuen Leitstrukturen 8

1.4 Aufgabenstellung 10

2 Biosynthese des Borrelidins 12

2.1 Der Naturstoff Borrelidin 12

2.2 Biosynthese des Borrelidins 13

2.2.1 Biosynthese des Makrolactons 13

2.2.2 Entstehung der Nitrilgruppe 15

2.2.3 Biosynthese der Startereinheit 16

2.2.4 Fütterungsexperimente 18

2.2.5 Diskussion 26

3 Screening endosymbiontisch lebender mariner Pilze 28

3.1 Pilzstämme aus Algen von den Kornaten 28

3.1.1 Chemisches und Biologisches Screening 29

3.1.2 Isolierung der Sekundärmetabolite 31

3.1.3 Acetosellin (**25**) aus *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 1a) 31

3.1.4 Communiol B (**31**) aus *Nodulosporium* sp. (Stamm Kornati 1b) 37

3.1.5 Cerebrosid C (**34**) *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 3a) 41

3.1.6 Sekundärmetabolite aus *Alternaria* sp. (Stamm Kornati 3c) 42

3.1.7 Altertoxin I (**35**) 42

3.1.8 Alternariol (**36**) 44

3.1.9 Allantoin (**38**) 46

3.1.10 Diskussion 47

3.2 Pilzstamm aus Algen von Gozo 48

3.3 Aflatoxine aus *Aspergillus flavus* (Stamm Gozo 14) 48

3.3.1 Sterigmatocystin (**40**) 48

3.3.2 HPLC-DAD-MS-Untersuchung auf Aflatoxine 50

4 Glaukothalin (50) 52

4.1 Rheinheimera baltica (Stamm HP1) 52

4.2 Optimierung der Ausbeute 54

4.2.1 Stammhaltung und Kultivierung 54

4.2.2 Isolierung 57

4.3 Charakterisierung 57

4.4 Versuche zur Kristallisation 67

4.5 Chemische Derivatisierungen 68

4.5.1 Acetylierung mit Acetanhydrid 68

4.5.2 Alkylierung von Heteroatomen 68

4.5.3 Reduktionen 70

4.6 Weitere Substanzen aus Stamm HP1 71

4.6.1 GT2A34 71

4.6.2 Benzolsulfonamid (**51**) 72

5 Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora* 73

5.1 Die Biosynthese von Melaninen in Pilzen 73

5.2 Biochemische Arbeiten 74

5.3 Screening nach Zwischen- bzw. Nebenprodukten der Melaninbiosynthese 74

5.3.1 Vergleich von Wildtyp, Pile 1 und Δpks-Mutante 74

5.3.2 Einsatz von Biosyntheseinhibitoren 76

5.3.3 Isoscleron (**62**) 80

5.3.4 Feroxidin (**63**) 81

5.4 Isolierung von Hexaketiden aus *Sordaria macrospora* 82

5.4.1 Sordariol (**64**) 82

5.4.2 (-)-Cyclosordariolon (**65**) 83

5.4.3 1-(1,3-Dihydro-4-hydroxy-isobenzofuran-1-yl)butan-2,3-diol (**66**) 84

5.5 Zusammenfassung 85

6 Sekundärmetabolite aus Actinomyceten 86

6.1 2-Carboxymethyl-5-(1-oxohex-1-yl)furan (**68**) 86

6.2 Aminobenzoesäuren aus MT5.2 87

6.3 NTK-250 A (**74**/**75**) und B (**76**/**77**) 88

6.3.1 NTK 250A (**74**/**75**) 88

6.3.2 NTK-250 B (**76**/**77**) 95

6.3.3 Diskussion 96

7 Zusammenfassung der Ergebnisse 98

B EXPERIMENTELLER TEIL 102

1 Allgemeines 102

1.1 Instrumentelle Analytik 102

1.2 Chromatographische Methoden 103

1.3 Mikrobiologische Methoden 105

2 Biosynthese von Borrelidin (21) 108

2.1 Stammhaltung 108

2.1.1 Agarplatten 108

2.1.2 Langzeitkonservierung 108

2.2 Kultivierung 108

2.3 Isolierung und Charakterisierung 109

2.4 Fütterung von (isotopenmarkierten) Vorläufern 110

3 Arbeiten an Pilzen von den Kornaten 114

3.1 Isolierung der Pilze 114
3.2 Stammhaltung 114
3.2.1 Agarplatten 114
3.2.2 Langzeitkonservierung 114
3.3 Durchführung des Chemischen Screenings 114
3.4 Chemisches Screening von Kornati 3a auf Acetosellinbildung 115
3.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Metabolite 115
3.5.1 Acetosellin (**25**) 115
3.5.2 Communiol B (**31**) 116
3.5.3 Cerebrosid C (**34**) 117
3.5.4 Altertoxin I (**35**) 118
3.5.5 Alternariol (**36**) 119
3.5.6 Allantoin (**38**) 120
3.5.7 Sterigmatocystin (**40**) 120

4 Arbeiten an *Rheinheimera baltica* (Stamm HP1) 121
4.1 Stammhaltung 121
4.1.1 Agarplatten 121
4.1.2 Langzeitkonservierung 121
4.2 Optimierung der Kultivierungsbedingungen 122
4.2.1 Agarkulturen 122
4.2.2 Flüssigkulturen 122
4.3 Isolierung von Glaukothalin (**50**) 123
4.4 Charakterisierung von Glaukothalin (**50**) 123
4.5 Versuche zur Kristallisation 124
4.6 Chemische Derivatisierungen 125
4.6.1 Acetylierung 125
4.6.2 Alkylierung von Heteroatomen 125

4.6.3 Reduktionen 126

4.7 Isolierung und Charakterisierung weiterer Metabolite 127

4.7.1 GT2A34 127

4.7.2 Benzolsulfonamid (**51**) 127

5 Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora* 128

5.1 Stammhaltung und Langzeitkonservierung 128

5.2 Screening nach Zwischen- bzw. Nebenprodukten der Melaninbiosynthese 128

5.2.1 Vergleich zwischen WT, Pile 1 und Δpks-Mutante 128

5.2.2 Einsatz von Biosyntheseinhibitoren 129

5.3 Isolierung von Sekundärstoffen aus *Sordaria macrospora* 129

5.3.1 Isoscleron (**62**) 129

5.3.2 Feroxidin (**63**) 129

5.3.3 Sordariol (**64**) 130

5.3.4 (-)-Cyclosordariolon (**65**) 131

5.3.5 1-(1,3-Dihydro-4-hydroxy-isobenzofuran-1-yl)butan-2,3-diol (**66**)[121] 132

6 Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten 133

6.1 2-Carboxymethyl-5-(1-Oxohex-1-yl)furan (**68**) 133

6.2 NTK-250 A (**75**/**75**) 133

6.3 NTK-250 B (**76**/**77**) 135

C LITERATURVERZEICHNIS 137

A THEORETISCHER TEIL

1 Einleitung

1.1 Entwicklungen in der Malariabekämpfung

Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts war Malaria eine der Krankheiten, die in der westlichen Medizin am intensivsten erforscht wurden. Heute hingegen muss Malaria zu den sogenannten *neglected deseases*, den von der Forschung bis hin zur Versorgung vernachlässigten Krankheiten, gezählt werden. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe stagniert seit Mitte der 70er Jahre. Obwohl etwa 40% der Weltbevölkerung in Malariagebieten leben und jährlich 300 bis 500 Millionen Neuerkrankungen und 2.5 Millionen Todesopfer zu verzeichnen sind.[2] Der jährliche wirtschaftliche Schaden durch Malaria für die afrikanischen Länder beträgt nach Schätzungen der WHO 12 Mrd $.[3]

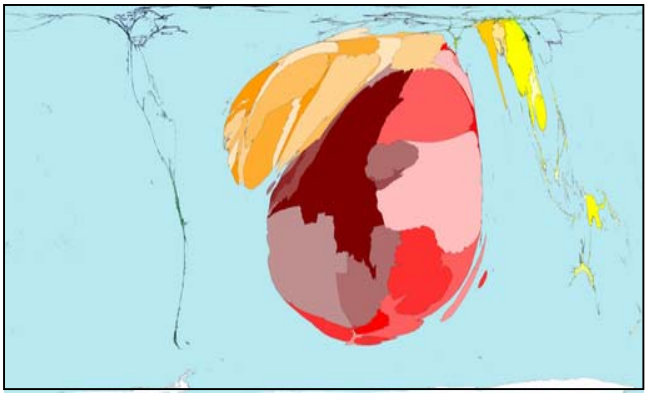


Abbildung 1: Kartogramm, die Fläche eines Landes korrespondiert mit der Zahl der Malaria-Toten im Jahr 2003.[1]

Für den größten Teil der betroffenen Bevölkerung sind die verfügbaren Medikamente nicht bezahlbar. Deswegen bietet das beschränkte Marktpotential nicht genug Anreiz für Pharmafirmen, die hohen Entwicklungskosten aufzuwenden. Nach dem Wegfall der kolonialen und militärischen Interessen an den betroffenen Gebieten und der Ausrottung von Malaria in der westlichen Welt, gingen auch die öffentlichen Fördermittel dieser Länder zurück.[4] Die Forschungsgelder der USA zur Malariabekämpfung nahmen zum Beispiel allein von 2001 bis 2004 um über 40% ab.[5] Die zunehmende Verbreitung von Resistenzen und die damit verbundene weitere Ausbreitung von Malaria[6] erfordern jedoch verstärkte Forschungsaktivitäten. Hier engagieren sich in letzter Zeit hauptsächlich die als *Drug Developement Partnerships* (DDP) bezeichneten Bündnisse. Diese Zusammenschlüsse von öffentlichen und in der Hauptsache privaten Geldgebern dienen dazu, profitorientierte Unternehmen in die Suche nach neuen antiparasitären Wirkstoffen

einzubinden. Die Entwicklungskosten können so vom Verkaufspreis der Medikamente entkoppelt werden.[7] Dies bietet nicht nur einen marktwirtschaftlichen Anreiz für Pharmaunternehmen, sondern erlaubt die medizinische Versorgung auch in ärmeren Ländern zu verbessern.

Plasmodien, die Erreger der Malaria, wechseln im Laufe Ihres Entwicklungszyklus den Wirt. Endwirt ist die *Anopheles*-Mücke, Zwischenwirt der Mensch. Durch den Stich einer infizierten weiblichen Mücke werden die Erreger auf den Menschen übertragen. Sie infizieren zuerst die Leber (symptomfrei) und bilden nach ca. einwöchiger Inkubationszeit Blutstadien (Merozoiten). Ein Teil der Merozoiten entwickelt sich zur Geschlechtsform (Gametocyten), die bei erneutem Stich einer Mücke von dieser aufgenommen werden und sich dort sexuell vermehren. Der größte Teil der Merozoiten befällt jedoch die Erythrozyten des Wirts und vermehrt sich in diesen. Die roten Blutkörperchen platzen und setzen so die Parasiten frei.[8] Dabei gelangen Zellbestandteile, wie zum Beispiel Phospholipide, in die Blutbahn. Der Körper reagiert darauf mit dem Ausstoß von Zytokinen, was einen Fieberanstieg zur Folge hat. Bei hoher Anzahl der Parasiten im Blut kommt es unter anderem zur weiteren Lyse der Erythrozyten, was neben der Zytokinfreisetztung zur Anämie führt. In ihren weiteren Auswirkungen unterscheiden sich die Malariaerreger untereinander. So verbleiben bei Infektion mit P. *ovale* und P. *vivax* (Malaria tertiana) Erreger bis zu mehreren Jahren im Leberstadium. Daher kommt es oft zu Rückfällen, die typisch für diese Form der Malaria sind. P. *falciparum* (Malaria tropica) ist für die meisten tödlichen Infektionen verantwortlich. Im Erythrozyten produziert dieser Erreger spezielle Proteine. Diese lagern sich in die Membran des roten Blutkörperchens ein und verursachen die Bindung an die Endothelzellen der Blutgefäße. Die so entstandene Verengung der Kapillaren schneidet die Umgebung von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ab. Im Zentralen Nervensystem führt dies zur cerebralen Malaria, welche ein lebensbedrohliches Koma einschließen kann.

1.1.1 Etablierte Antimalariawirkstoffe

Zu Beginn des achtzehnten Jahrhunderts wurden Extrakte der Rinde des Chinchona-Baums zur ersten gezielten Malariatherapie angewendet. Nachdem 1820 mit Chinin (**1**) der aktive Bestandteil isoliert und identifiziert war, kam dieser Naturstoff zum breiten Einsatz. Vom Chinin leitet sich eine ganze Klasse von Antimalariawirkstoffen, die 4-Aminochinoline bzw.

Arylaminoalkohole, ab. Chloroquin (**2**), das wichtigste Malaria-Therapeutikum,[9] ist ein 4-Aminochinolinderivat. Seine hohe Wirksamkeit und gute Verträglichkeit sowie die kostengünstige Herstellung führten dazu, dass es bis heute weitverbreitet Anwendung findet. Der Wirkmechanismus wird auf die Störung der Detoxifizierung von freiem Häm zurückgeführt. Die Parasiten nehmen das Cytoplasma der Wirtserythrozyten in ihre Nahrungsvakuole auf. Das darin enthaltene Hämoglobin wird auf drei verschiedenen Wegen (Hämopolymerisation, oxidativer- und glutathionabhängiger Abbau) entgiftet, die alle durch 4-Aminochinoline inhibiert werden.[2] Mefloquin (**3**) ist ein Derivat der Arylaminoalkohole und wirkt auch gegen Chlorquin-resistente Stämme. Der relativ teure Wirkstoff findet auch wegen deutlicher Nebenwirkungen nur begrenzt Anwendung.[8]

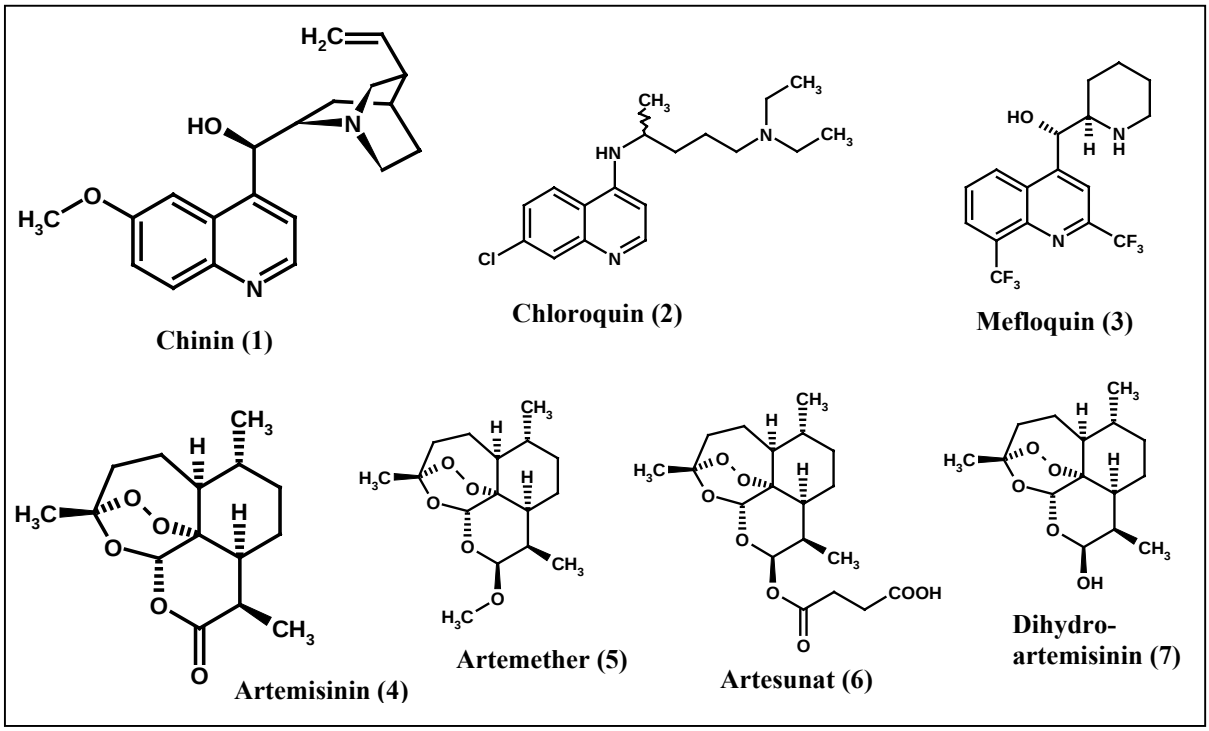


Abbildung 2: Von Cinin (**1**) und Artemisinin (**4**) abgeleitete Antimalariawirkstoffe.

Ebenfalls ethnomedizinischen Ursprungs ist das Artemisinin (**4**).[9] 1972 wurde dieser Wirkstoff aus dem Beifussgewächs *Artemisia annua* isoliert, welches schon seit 2000 Jahren Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin ist. Heute finden neben Artemisinin vor allem halbsynthetische Derivate wie Artemether (**5**) und Artesunat (**6**) Anwendung. Durch den unkontrollierten Gebrauch in Französisch-Guyana und im Senegal haben sich dort Resistenzen schon stark ausgebreitet. Kombinationstherapien sind deswegen angezeigt.[10] Die wirksame Spezies ist der aus diesen Stoffen hervorgehende Metabolit Dihydroartemisinin (**7**), welcher auch selber angewendet wird. Dem Wirkmechanismus liegt die Hemmung der

oxidativen Entgiftung des Häms zugrunde. Außerdem wird vermutet, dass eine Schädigung des Parasiten durch die Alkylierung wesentlicher Proteine eintritt. Besondere Vorteile dieser Wirkstoffklasse sind die schnelle Wirkung und die Aktivität gegen die sexuellen Parasitenstadien, die für die Übertragung der Krankheit verantwortlich sind.[2]

Die Kombinationstherapie mit Sulfadoxin (**8**) und Pyrimethamin (**9**) (Fansidar) wird heute nach Chloroquin am häufigsten eingesetzt. Beide Wirkstoffe hemmen jeweils ein Enzym des Folatstoffwechsels. Neben der schnellen Entwicklung von Resistenzen stellen die häufigen Hypersensitivitätsreaktionen ein Problem dar. In mehreren Industriestaaten ist diese Antifolat-Kombination nicht mehr zugelassen.[11] Ein weiteres Therapeutikum, welches den Folatstoffwechsel stört, ist Proguanil (**10**). Da es nur eine geringe Wirkstärke aufweist, wird es größtenteils in Kombinationspräparaten mit Chloroquin eingesetzt.[8]

Auch verschiedene antibakterielle Wirkstoffe kommen in der Malariatherapie zum Einsatz. Vor allem Doxycyclin (**11**)[12] und Clindamycin (**12**) sind dabei von praktischer Bedeutung. Sie werden wegen ihrer langsamen Wirkung zumeist in Kombination mit Artesunat oder Chinin verwendet. Die Wirkung der Antibiotika geht darauf zurück, dass sie die Replikation der Apicoplasten hemmen. Können diese, den Plastiden ähnlichen Zellorganellen der Malariaerreger, ihre vielfältige Stoffwechselfunktionen nicht mehr erfüllen, sterben die Parasiten ab.

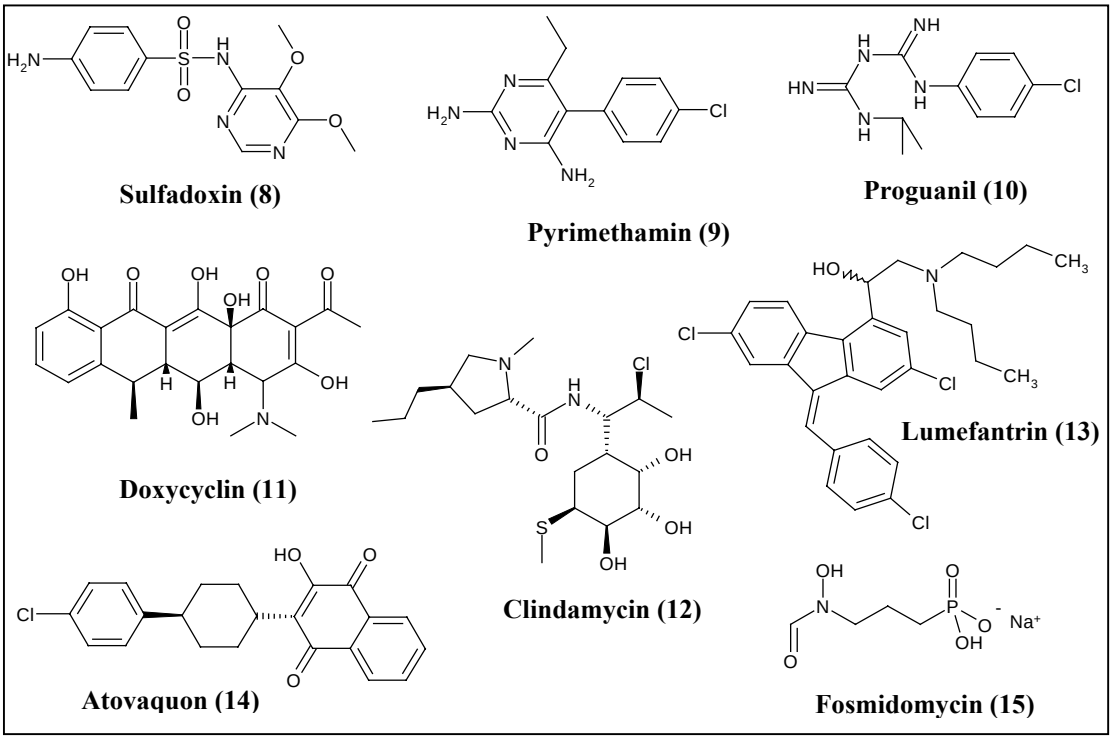


Abbildung 3: Etablierte Antimalariawirkstoffe und Fosmidomycin (**15**).

Neuere Antimalariawirkstoffe kamen nur als Kombinationstherapeutika in die klinische Anwendung. So wurden in letzter Zeit Benflumethol, eine feststehende Kombination aus Lumefantrin (**13**) und Artemether, sowie Malarone, bestehend aus Atovaquon (**14**) und Proguanil, zugelassen. Die letztere Kombination wirkt vor allem auf die Parasiten im Leberstadium, wodurch die Infektion der Erythrozyten verhindert werden kann.[2]

1.1.2 Neue Wege in der Malariabekämpfung

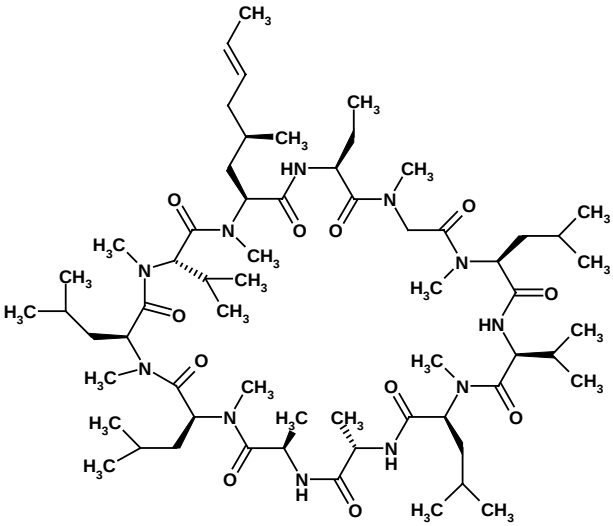
Wirkstoffe, die sich momentan in klinischen Studien befinden zielen neben den schon beschriebenen Zellfunktionen auf die Fettsäuresynthese, die Protein-Farnesylierung[13] und die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese ab. Fosmidomycin (**15**) greift das letztgenannte Target an und ist einer der vielversprechendsten Kandidaten.[14] Es sticht durch seine geringe Toxizität und vor allem durch seine Aktivität gegen multiresistente *Plasmodium*-Stämme hervor. Die hohe Rückfallrate erfordert jedoch eine Kombinationstherapie. Dabei hat sich offenbart, dass mit Clindamycin synergistische Effekte erzielt werden können.
Mit den Ionophoren ist eine weitere Klasse von potentiellen Chemotherapeutika in den Blick der Forschung gerückt.[15,16] Sie stören das vom Parasiten veränderte Ionenverhältnis im Erythrozyten.[17]
Auch Mikrotubuli-Inhibitoren werden auf ihre Wirkung auf Malariaerreger untersucht. Solche Stoffe, die an die *Vinca*Domäne des Tubulins binden, scheinen ein hohes Potential in sich zu bergen.[18]

Ein ganz anderer Ansatz zielt auf eine Impfung mit Plasmodien, die in ihrer Entwicklung gehindert sind, ab. Eine solche Impfung mit durch Bestrahlung abgeschwächten Parsiten hatte bereits ihre Wirksamkeit bewiesen. Durch die Entschlüsselung der *Plasmodium*-Gensequenz[19] können nun gezielte genetische Manipulationen durchgeführt werden, um sterile Mutanten zu erzeugen. So ist zum Beispiel durch Deletion eines Gens (*UIS3*), das für die Entwicklung der frühen Leberstadien essentiell ist, eine Mutante erzeugt worden, welche nicht die Blutstadien bilden kann. Die Krankheit bricht also nicht aus. Tierversuche mit Mäusen zeigten, dass eine Impfung mit diesen Plasmodien einer natürlichen Infektion vorbeugte.[20]

1.2 Herkunft neuer Leitstrukturen

Aus dem vorhergehenden Kapitel wird deutlich, dass pharmakologisch interessante Substanzen aus verschiedenen Quellen hervorgehen. Die Antifolat-Wirkstoffe stammen aus der chemischen Synthese vor dem Hintergrund von biomolekularen Kenntnissen des Folatstoffwechsels. Die Wirkstoffe Chinin und Artemisinin sind Pflanzensekundärstoffe, während die erwähnten Antibiotika mikrobiellen Ursprungs sind. Aus den Naturstoffen gingen dann durch Abwandlung des Grundgerüsts verschiedene Wirkstoffe einer zweiten Generation hervor.

Die wichtige Rolle der Naturstoffe in der pharmazeutischen-, medizinischen-, und biomolekularen Forschung wird heutzutage zunehmend wieder anerkannt.[21] Die unangefochtene Diversität zum Teil sehr komplexer Strukturen macht Naturstoffe zu einer unverzichtbaren Quelle neuer Leitstrukturen. Zudem weisen diese Substanzen durch ihre evolutionäre Entwicklung und die Biosynthese in lebenden Organismen sogenannte *priviligierte Strukturen* auf. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese an Enzyme binden und biologische Schranken überwinden können, ist daher äußerst hoch.[22,23] Dies spiegelt sich auch darin wieder, dass zwischen 2000 und 2005 über 20 neue Medikamente auf den Markt kamen, die ihren Ursprung in terrestrischen oder marinen Organsimen haben. Im Zeitraum von 1981 bis 2002 waren von den zugelassenen Wirkstoffen 52% Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Substanzen.[24]



Cyclosporin A (16)

Aus terrestrischen Mikroorganismen sind bereits viele antibakterielle Therapeutika einschließlich der Penicilline, Aminoglykoside, Tetracycline und Makrolide hervorgegangen. Daneben konnten z.B. auch antitumor aktive Substanzen, wie Actinomycin D, Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A **(16)**[25] oder cholesterinsenkenden Arzneien (Lovastatin, Mevastatin) aus terrestrischen Mikroorganismen isoliert werden.

Die Geschichte der marinen Naturstoffe in der medizinischen Forschung ist deutlich jünger, inzwischen sind hier aber bereits mehrere tausend neue Strukturen beschrieben[26]. Die

immense ökologische Diversität dieses Lebensraums spiegelt sich in den bisher isolierten Naturstoffen wieder und schürte das Interesse der Naturstoffforscher an marinen Organismen. Für viele der bisher isolierten Substanzen konnte die biologische Funktion als Waffe bestätigt werden. Wird berücksichtigt, dass diese Stoffe im Wasser stark verdünnt vorliegen, müssen die Wirkstoffe äußerst potent sein, um überhaupt einen Effekt zu erzielen.[26]

Cytarabin (**17**) ist ein Therapeutikum marinen Ursprungs, das als Zytostatikum in der Antitumortherapie und als antiviraler Wirkstoff eingesetzt wird. Mit Ziconotid (**18**) ist ein weiterer mariner Wirkstoff in der Anwendung. Dieses Gift der Kegelschnecke gehört zur Familie der ω-Conotoxine und wird zur Therapie chronischer Schmerzen eingesetzt.[24]

In klinischen Phasen befindliche Naturstoffe marinen Ursprung sind zum Beispiel Aplidin (**19**) und Bryostatin I (**20**). Aplidin ist ein Cyclodepsipeptid, aus der Seescheide *Aplidium alpicans* und zeigt Aktivität gegen verschiedene Tumortypen. Dabei weist es mehrere interessante Angriffspunkte auf. Es unterbindet die Angiogenese und kann den Zellzyklus sowohl in der G_1 als auch der G_2 Phase arretieren.[27] Bryostatin I stammt aus Moostierchen (*Bulgula neritina)*. Es bindet anstelle des Tumorpromoters Phorbolester an dessen Rezeptor, was die Hemmung des Wachstums und der Zelldifferenzierung zur Folge hat und auch zur Apoptose führen kann.[24]

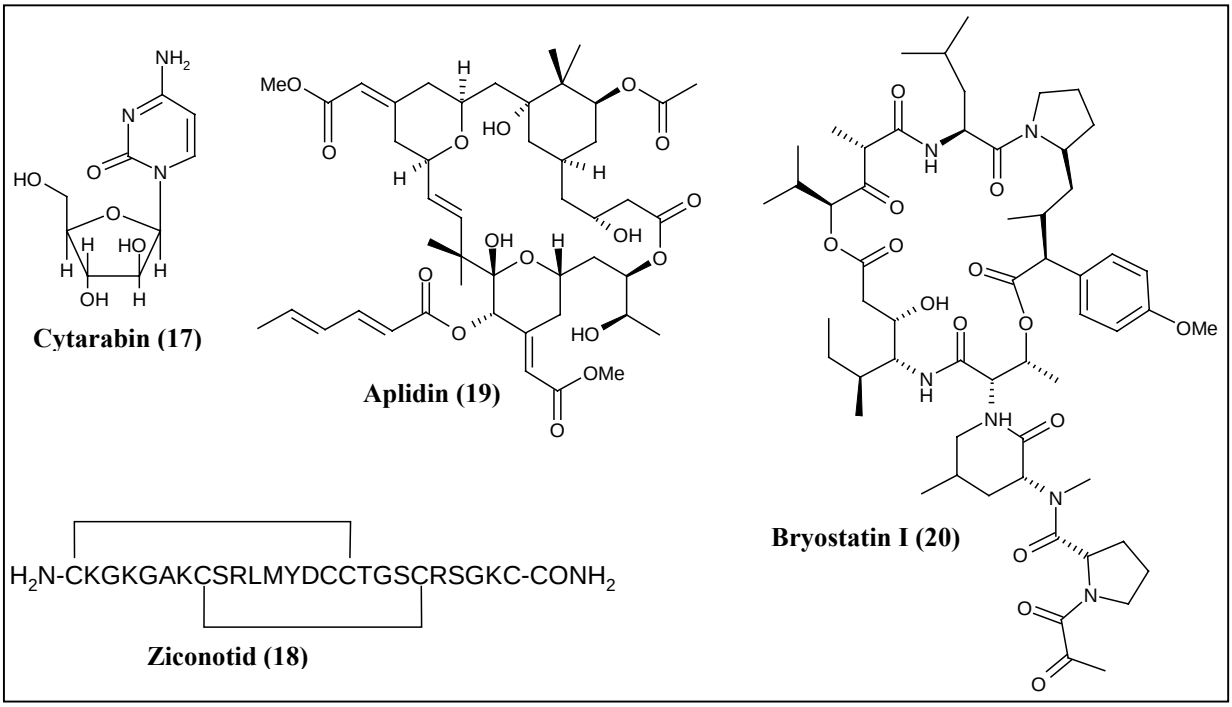


Abbildung 4: Beispiele von Naturstoffen marinen Ursprungs in klinischer Anwendung (**18**, **17**) und in klinischen Tests (**19**, **20**).

Bei einigen Naturstoffen, die aus marinen Invertebraten stammen, ist bereits bewiesen worden, dass sie von assoziierten Mikroorganismen produziert werden. Von vielen weiteren wird dies vermutet.[26] Dies bietet zwei wichtige Chancen. Zunächst sollten marine Organismen wie z.B. Schwämme aus ökologischen Gesichtspunkten nicht zur Gewinnung von Wirkstoffen in großem Maßstab genutzt werden. Durch die Kultivierung der symbiontischen Mikroorganismen, falls möglich (s. unten), wäre eine erneuerbare Quelle geschaffen. Außerdem sind molekulargenetische Arbeiten, wie sie für die Suche nach Leitstrukturen angewendet werden, mit Mikroorganismen deutlich einfacher und erfolgsversprechender (Metagenomforschung).

1.3 Die Suche nach neuen Leitstrukturen

Klassischer Weise werden neue Naturstoffe durch das Screening von Extrakten verschiedener Organismen gesucht. Dies kann sich unterschiedlicher Ansätze bedienen. Im Biologischen Screening werden Extrakte in biologischen Testsystemen untersucht, worauf sich eine wirkungsorientierte Isolierung anschließt. Große Bedeutung hat hierbei das Target-orientierte Screening. Spezifische Wechselwirkungen mit einem einzelnen molekularen Target, zum Beispiel einem bestimmten Enzym, dienen als Auswahlkriterium. Dieser Ansatz lässt sich gut im industriellen High-Throughput-Screening (HTS) verwirklichen.[25]

Das Chemische Screening hat den Anspruch alle neuen Strukturen, ungeachtet ihrer primären biologischen Aktivität, zu isolieren. Problematisch ist dabei die häufige Isolierung bereits bekannter Metabolite. Dies lässt sich jedoch weitgehend durch Unterstützung des Screenings mit physikochemischen Methoden vermeiden. Mit Hilfe von HPLC und daran gekoppelten analytischen Instrumenten wie DADs (**D**iode **A**rray **D**etector), NMR- oder Massenspektrometern können in Verbindung mit guten Datenbanken bekannte Substanzen schon im Extrakt identifiziert werden.

Ein großes Potential an neuen Strukturen aus dem klassischen Sreening haben Mikroorganismen aus wenig untersuchten Habitaten mit extremen Umweltbedingungen.[28] Aber auch bereits untersuchte Mikroorganismen bergen noch viele *stille* Biosynthesewege. Diese zu aktivieren ist das Ziel des OSMAC-Ansatzes (**o**ne **s**train/**ma**ny **c**ompounds). Hierzu werden verschiedene Kultivierungsparameter, wie Nährmedium, Temperatur, Belüftung,

Zusatz von Fremdstoffen u.a. variiert. Die Vielfalt der Sekundärstoffe, die von einem begabten Produzenten zu erhalten sind, kann so deutlich gesteigert werden. [29]

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Molekulargenetik eröffnen weiterte Ansätze bei der Suche nach Leitstrukturen. Wirkstoffe von bisher nicht kultivierbaren Organismen können erhalten werden, indem DNA-Fragmente in Wirtsorganismen, wie *Escherichia coli* heterolog expremiert werden.[30] Es wird davon ausgegangen, dass über 99 % der in Bodenproben enthaltenen Mikroorganismen unter Standardbedingungen nicht zu kultivieren sind. Außerdem sind die mit marinen Invertebraten assoziierten Mikroorganismen oftmals nicht in Kultur zu bringen. Das hier verborgene Biosynthesepotential hinsichtlich der Sekundärstoffe wird sehr hoch eingeschätzt. [28]

Die Sequenzierung und Analyse der Biosynthesegene von Mikroorganismen hat in letzter Zeit gezeigt, dass oftmals ungenutzte Biosynthesegencluster vorhanden sind.[31,32] Teilweise kann anhand der genetischen Information auf die Struktur eines potentiellen Sekundärstoffs geschlossen werden.
Die kombinatorische Biosynthese, bei der Genabschnitte verschiedener Biosynthesecluster miteinander fusioniert werden, kann Hybride verschiedener Biosnythesewege, so genannte „unnatürliche Naturstoffe“, hervorbringen. [33,28]

1.4 Aufgabenstellung

Der Naturstoff Borrelidin (**21**) zeichnet sich durch vielfältige biologische Wirkungen aus. Die Biosynthese war mit molekulargenetischen Methoden von P. F. LEADLAY und J. A. SALAS[34] untersucht worden. Für die Biosynthese der einzigartigen Startereinheit *trans*-Cyclopentandicarbonsäure (CPDA) wurde eine Genese aus Tyrosin postuliert. Die Ergebnisse der von M. RADZOM[50] durchgeführten Fütterungsexperimente mit isotopenmarkiertem Acetat hatten bereits Widersprüche zu dem postulierten Mechanismus aufgezeigt. Weitere Fütterungsexperimente sollten neue Erkenntnisse über die Herkunft der CPDA-Startereinheit geben und zur Formulierung eines Biosynthesemechanismus führen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf dem Chemischen Screening endosymbiontischer Pilze. Dazu sollten aus Algen verschiedene Pilzstämme isoliert und in das bestehende BMBF-Verbundprojekt integriert werden. Darin eingebunden ist die taxonomische Bestimmung der Pilze (DRÄGER), sowie ein Biologisches Screening (BASF AG) der aus dem Chemischen Screening erzeugten Rohprodukte bzw. isolierter Reinsubstanzen. Das Chemische Screening sollte durch das OSMAC-Verfahren erweitert werden, um die Metabolitenvielfalt der Stämme möglichst vollständig zu erschließen. Ziel war die Isolierung, Charakterisierung und biologische Testung der im Chemischen Screening auffälligen Sekundärmetabolite. Außerdem war eine auf der biologischen Testung von HPLC-Fraktionen basierende Isolierung der aktiven Substanzen angestrebt.

Im Mittelpunkt der Strukturaufklärungsarbeiten stand der, von dem marinen Bakterium *Rheinheimera baltica* spp. HP1 produzierte, blaue Farbstoff Glaukothalin. Die Produktion des Pigments musste zunächst optimiert werden, um für spektroskopische Untersuchungen ausreichende Substanzemengen zur erhalten. Von M. THORWEST[97] war bereits ein Strukturvorschlag vorgelegt worden, der jedoch eine Überarbeitung erforderte. Hierzu sollten verschiedenen spektroskopische Methoden eingesetzt werden, sowie Derivatisierungen des Farbstoffes durchgeführt werden.

In Zusammenarbeit mit I. ENGH und U. KÜCK (Universität Bonn) galt das Interesse dem chemischen Profil der Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora*. Die Metabolitenspektren des Wildtyps und zweier melaninfreier Mutanten sollten verglichen werden, um Zwischen-

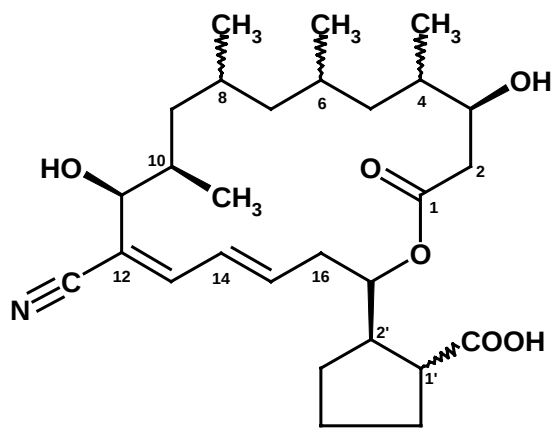
oder Nebenprodukte der Melaninbiosynthese auf dem Dihydroxynaphtalinweg (DHN-Weg) zu identifizieren. Der Einsatz von Enzyminhibitoren sollte dieses Vorhaben unterstützen.

Ein zweites Arbeitsgebiet im Bereich der Strukturaufklärung lag bei Sekundärmetaboliten, die im Arbeitskreis H.-P. FIEDELER im HPLC-DAD-basierten Chemischen Screening aufgefallen waren. Die Substanzen sollten aufgereinigt und spektroskopischen Untersuchungen unterzogen werden, um die Struktur aufzuklären.

2 Biosynthese des Borrelidins

2.1 Der Naturstoff Borrelidin

Bereits 1949 berichteten BERGER, JAMPLONSKY und GOLDBERG von der Entdeckung einer antibakteriell wirksamen Säure, die sich besonders durch ihre starke Aktivität gegen verschiedene Borreliose-Erreger auszeichnete.[35] Die Struktur konnte jedoch erst 1966 durch KELLER-SCHEIRLEIN entschlüsselt werden, nachdem in den Jahren zuvor bereits einzelne Strukturteile bekannt geworden waren.[36,37] Das 18gliedrige Makrolacton trägt mit der Nitrilgruppe an C-12 ein relativ seltenes Strukturmerkmal[38] und zeichnet sich darüber hinaus durch den bisher einzigartigen *trans*-Cyclopentancarbonsäurerest aus.



Borrelidin (21)

Erste Erkenntnisse zur biologischen Wirkungsweise des Borrelidins (**21**) wurden schon früh von PORALLA und ZÄHNER gewonnen.[39] Sie konnten zeigen, dass Borrelidin den Einbau von Threonin in die t-RNA verhindert und somit die Synthese von Proteinen und Nucleinsäuren hemmt. Außerdem konnte die Threonyl-tRNA-Synthetase als Angriffsort bestimmt werden. Prinzipiell bilden Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen einen pharmakologisch interessanten Ansatzpunkt zur Entwicklung von Antibiotika, da die eukaryotischen Enzyme sich hinreichend von den prokaryotischen unterscheiden. Die Ähnlichkeit der prokaryotischen Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen untereinander ist groß genug, um eine Breitbandwirkung entsprechender Antibiotika zu erhoffen.[40] Tatsächlich aber ist mit Mupirocin erst ein Wirkstoff dieser Antibiotikaklasse in der Anwendung, der zudem auf die lokale Anwendung gegen methicillinresistente Staphylokokken beschränkt ist.

Borrelidin (**21**) blieb dauerhaft im Fokus der Wissenschaften und so offenbarten sich weitere biologische Wirkungen des Naturstoffs, wie antivirale[41] oder hemmende Wirkung auf die Cyclinabhängige Kinase Cdc28/Cln2 der Hefe.[42] Die Wirkung als Angiogeneseinhibitor erfuhr besondere Aufmerksamkeit. Angiogenese bezeichnet das Wachstum von Kapillargefäßen aus einem bereits vorhandenen Kapillarsystem heraus. Dieser Prozess ist bei

der Entstehung solider Tumore von Bedeutung, da deren Wachstum von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über das mitwachsende Kapillarsystem abhängig ist. Borrelidin wirkt hier auf zwei verschiedenen Wegen der Angiogenese entgegen. Zunächst wird durch die schon bekannte Hemmung der Threonyl-tRNA-Synthetase die Neubildung von Kapillargefäßen unterdrückt. Des Weiteren werden neu gebildete Kapillargefäße dadurch zerstört, dass Borrelidin über den Caspase-8/3-Weg, eine Signalkaskade, in der **21** als sogenannter *death ligand* fungiert, die Apoptose der entsprechenden Endothelzellen induziert.[43,44] Diese Ergebnisse wurden im RATF (rat aorta culture model) und an Venenendothelzellen der menschlichen Nabelschnur erlangt. Die Hemmung der Angiogenese bietet gegenüber anderen Antitumortargets zwei entscheidende Vorteile. Erstens können verschiedenste Tumortypen erreicht werden, und da nicht die Tumorzellen direkt beeinflusst werden, ist mit einer raschen Resistenzausbildung, wie sie innerhalb der üblichen Behandlungszyklen meist auftritt, nicht zu rechnen.

Eine weitere biologische Aktivität des Borrelidins erfährt große Aufmerksamkeit. *In vitro* und *in vivo* Tests zeigen, dass Borrelidin eine beachtliche Antimalariawirkung aufweist. Hierbei ist Aktivität von Borrelidin gegen einen wirkstoffsensitiven *Plasmodium falciparum* Stamm vergleichbar mit der Wirkung der klinisch angewendeten Wirkstoffe Artemether (**5**) und Artesunate (**6**). Die Wirkstärke von Chloroquine wurde in diesen Tests sogar übertroffen. Interessanterweise zeigte Borrelidin auch gegen einen wirkstoffresistenten Stamm unverminderte Aktivität.[45]

Wegen der hohen akuten Toxizität von [LD_{50} = 39 mg/kg (i.v.) und 15 mg/kg (p.o.)][45] ist die klinische Anwendung von Borrelidin so gut wie ausgeschlossen. Nicht desto Trotz handelt es sich um eine äußerst vielversprechende Leitstruktur, die auf den verschiedenen Gebieten der Wirkstoffforschung noch einige Beachtung erfahren wird.

2.2 Biosynthese des Borrelidins

2.2.1 Biosynthese des Makrolactons

Wie bereits erwähnt zeichnet sich die Struktur von **21** durch seine Substituenten aus. Untersuchungen zur Biosynthese des Markrolidteils der Struktur offenbarten aber auch hier eine Besonderheit. Augenscheinlich ist, dass Borrelidin über eine modulare Polyketidsynthase (Typ I) aus drei Acetat- und fünf Propionateinheiten aufgebaut wird. Hierbei sollte je ein Modul die Kondensation eines Bausteins und dessen Prozessierung zur jeweilige Reduktionsstufe der β-Ketogruppe steuern. Die Sequenzierung und Analyse des Borrelidin-

Biosynthesegenclusters von *Streptomyces parvulus* Tü 4055 durch LEADLAY und SALAS[46] zeigte allerdings, dass mit nur sieben Kettenverlängerungsmodulen zwei Module weniger vorhanden sind, als nach dem oben beschriebenen Modell zu erwarten wären. Es stellte sich heraus, dass das aus *borA5* hervorgehende Modul (siehe Abbildung 5) drei Kettenverlängerungsschritte in perfekter Präzision durchführen muss, bevor das Zwischenprodukt auf das nächste Modul übertragen wird.

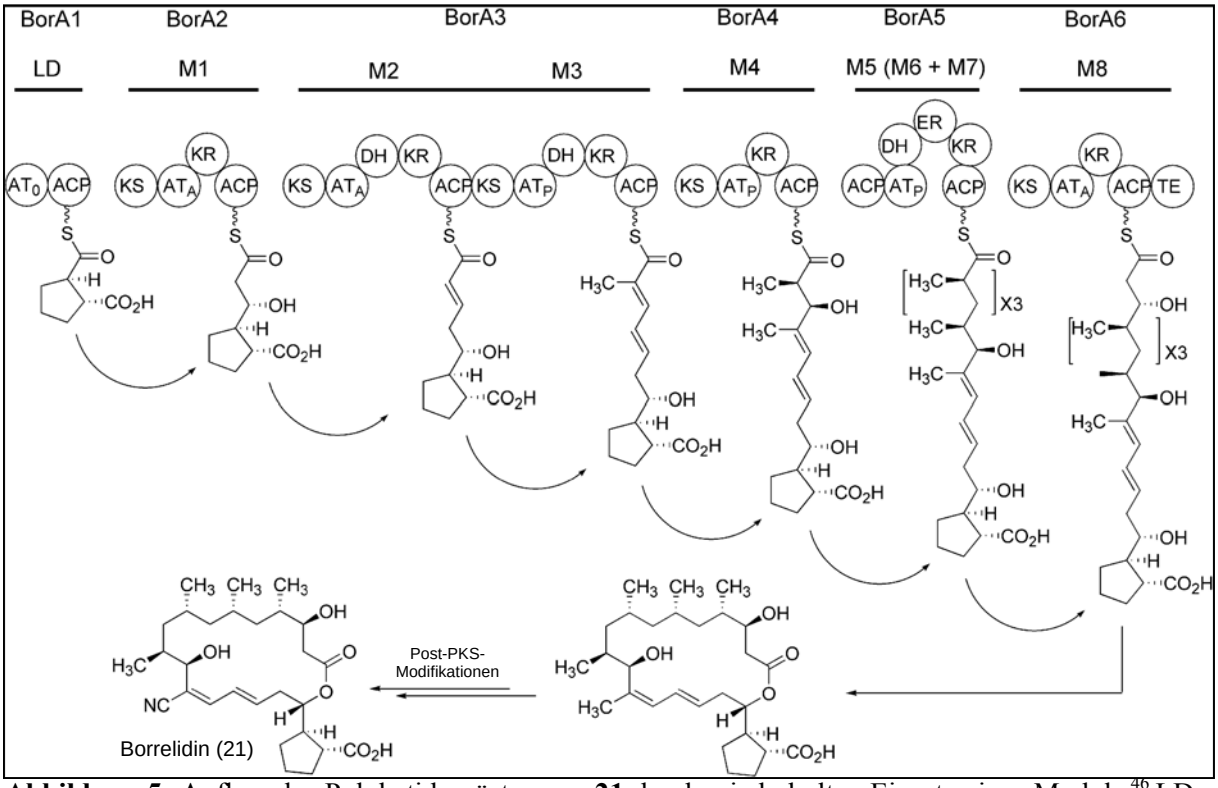
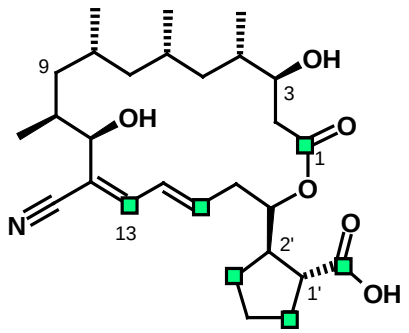


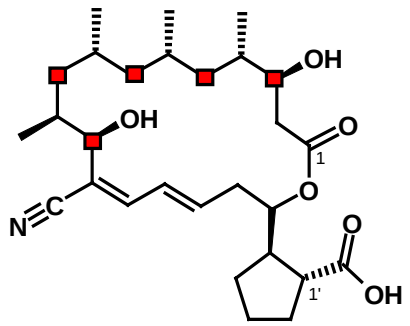
Abbildung 5: Aufbau des Polyketidgerüstes von **21** durch wiederholten Einsatz eines Moduls.[46] LD: Ladedomäne, ACP: Acetylcarrierprotein, AT: Acyltransferase, ER: Enoylreduktase, KR: β-Ketoreduktase, DH: Dehydratase, KS: β-Ketoacyl-ACP-Synthase, TE: Thioesterase.

Eine solche Biosyntheseleistung, in der das Prinzip der Kolinearität verletzt wird, wird bisher auch bei der Biosynthese von Lankacidin[47] und Stigmatellin[48] vermutet. Besser bekannt sind von der Regel abweichende Prozesse, die als *Stottern* bezeichnet werden. Hierbei entstehen verschiedene Nebenprodukte durch ein zufälliges Mehrfachdurchlaufen eines Moduls, welches beim Hauptmetaboliten nur einen Kettenverlängerungsschritt katalysiert. So zum Beispiel bei der Biosynthese von Erythromycin in *Saccharopolyspora erythrea*, bei der dem 6-Deoxyerythronolid B verwandte Oktaketide auftreten.[49]

In Experimenten mit den isotopenmarkierten Vorläufern [1-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Propionat konnte der Einbau von drei Acetat- und fünf Propionateinheiten im Makrolacton bestätigt werden. Die Einbaumuster sind in Abbildung 6 dargestellt.[50]



^{13}C-Anreicherungen aus
[1-^{13}C]Acetat [12 mMol]



^{13}C-Anreicherungen aus
[1-^{13}C]Propionat [5 mMol]

Abbildung 6: Ergebnisse aus Fütterungsexperimenten mit isotopenmarkierten Vorläufern.

2.2.2 Entstehung der Nitrilgruppe

Wie schon beschrieben kommen Nitrilgruppen in Naturstoffen selten vor. So wurden bisher nur wenige Biosynthesewege beschrieben, von denen die meisten die Biogenese des Nitrils aus Aminosäuren formulieren. Dies gilt auch für den bisher am besten erfassten Mechanismus, den Aufbau von Cyanoglykosiden in Pflanzen.[38] Auf diesem Fußen auch die Annahmen von LEADLAY und SALAS,[51] die im Zuge weiterer Untersuchungen am Biosynthesegencluster von *Streptomyces parvulus* Tü 4055 drei Gene identifizierten, die zur Ausbildung des Nitrils essentiell sind. Für *borI* wird postuliert, dass es eine Cytochrom-P450-monoxoygenase codiert, *borJ* eine Aminotransferase und *borK* eine Dehydrogenase. Eine minus-*borI*-Mutante bildete 12-Desnitril-12-methylborrelidin (**22**). was darauf schließen lässt, dass das Kohlenstoffatom der Nitrileinheit aus der Propionateinheit des Makrolids stammt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass die Rückfütterung von **22** an eine Mutante, welche die Startereinheit nicht produzieren kann, wieder zur Bildung von Borrelidin führte. Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse der [1-^{13}C]Propionatfütterung legen dies ebenfalls nahe.

Eine minus-*borJ*-Mutante erzeugte 12-Desnitril-12-carboxyborrelidin (**23**), welches bei Rückfütterung jedoch nicht zu Borrelidin umgesetzt wurde. Es kann also als sogenanntes *Shuntprodukt* angesehen werden. Der postulierte Biosyntheseweg ist in Abbildung 7 dargestellt.

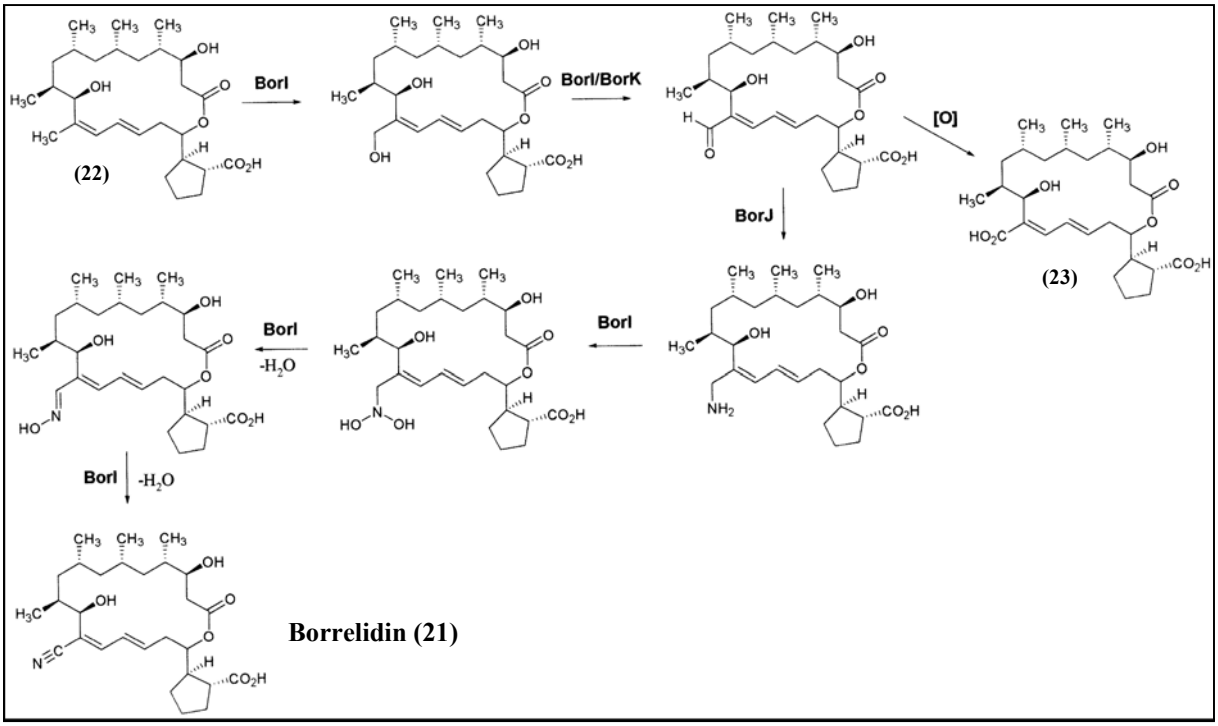


Abbildung 7: Postulierter Mechanismus für die Bildung der Nitrileinheit des Borrelidins (**21**).

2.2.3 Biosynthese der Startereinheit

Die Cyclopentylcarbonsäuregruppe des Borrelidins ist bisher aus keinem anderen Naturstoff bekannt. Sie repräsentiert die Startereinheit für die Polyketidsynthase. Die Biosynthese der *trans*-Cyclopentandicarbonsäure wurde von LEADLAY und SALAS[52] mit genetischen Methoden untersucht. Dabei werden verschiedene Gene, die im Biosynthesegencluster sowohl up- als auch downstream der PKS-Gene liegen, in einzelnen Mutanten inaktiviert. Unter der Annahme, dass *trans*-Cyclopentan-(1*R*,2*R*)-dicarbonsäure (CPDA) (**24**) die Startereinheit für die Polyketidsynthase bildet, wurde diesen Mutanten bei der Kultivierung CPDA zugesetzt. Entsprechende Knock-out-Mutanten, die kein Borrelidin produzierten, bildeten unter CPDA-Zugabe wieder Borrelidin, und die jeweiligen Gene konnten somit der Biosynthese der Startereinheit zugeordnet werden. Ausnahmen bildeten bei diesem Experiment die an *borG, borH* und *borN* inaktivierten Mutanten. Sie zeigten lediglich eine starke Reduktion der Borrelidinproduktion (75-89%), welche allerdings unter CPDA-Zugabe wieder anstieg. Trotzdem wurde postuliert, das die jeweiligen Gene für Schritte der CPDA-Biosynthese codieren. Verschiedene Homologien der so ausgemachten Sequenzen mit bekannten Enzymen führten zu dem in Abbildung 8 dargestellten hypothetischen Mechanismus zur Bildung der Startereinheit. Hierbei liegt der Schwerpunkt der Argumentation ausgerechnet

auf der Homologie des *borN*-Produktes zur 2-Hydroxyhepta-2,4-dien-1,7-dioat-isomerase, einem Enzym des Tyrosinkatabolismus.

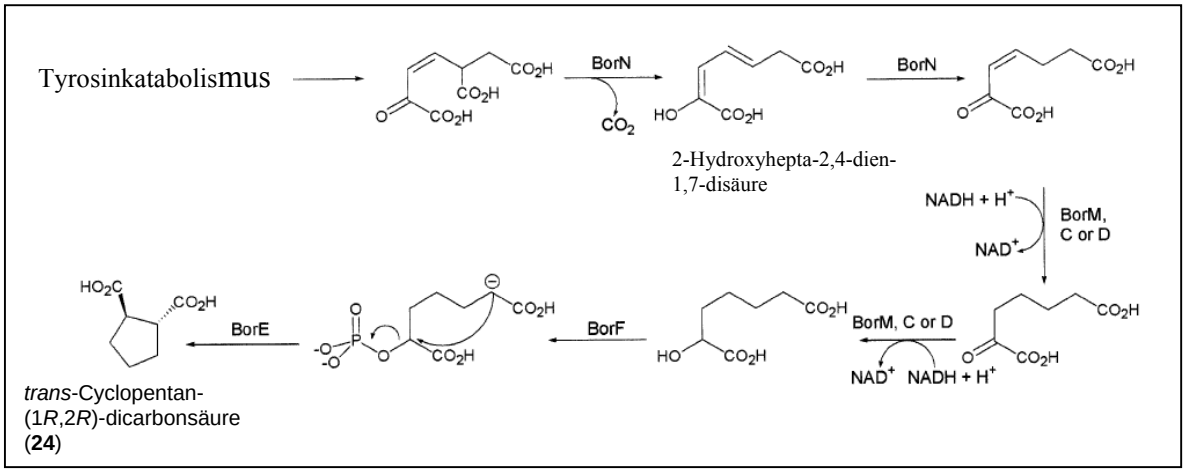


Abbildung 8: Von LEADLAY und SALAS postulierte Genese der Startereinheit aus Tyrosin.

Die bereits unter 2.2.1 vorgestellten Ergebnisse der Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C]Acetat sprechen allerdings gegen die Genese von CPDA aus Tyrosin. Wird der hypothetische Einbau von Acetateinheiten in Tyrosin und von diesem ausgehend in CPDA formuliert, so sind lediglich Markierungen aus den C-2 Kohlenstoffatomen der Acetateinheiten zu erwarten, wie in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

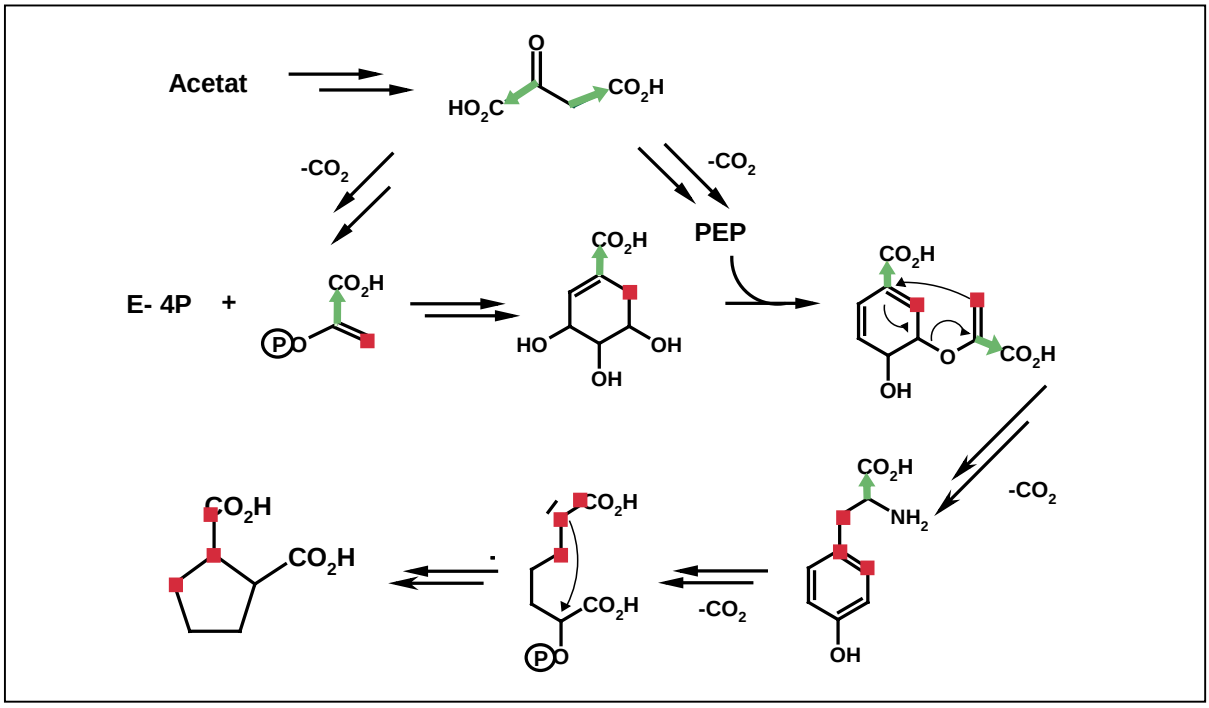


Abbildung 9: Nach dem postulierten Mechanismus aus Abbildung 8 zu erwartende Anreicherungen aus isotopenmarkiertem Acetat.

Der vorgeschlagene Mechanismus widerspricht somit den Ergebnissen der [1-^{13}C]Acetat Fütterung. Daher wurden weitere Fütterungsexperimente durchgeführt, um zusätzliche Erkenntnisse über die Herkunft der Startereinheit des Borrelidins zu gewinnen.

2.2.4 Fütterungsexperimente

Die Kultivierung und Aufarbeitung erfolgte jeweils im 1 L-Maßstab. Die in 30 mL sterilem, bidestilliertem Wasser gelösten Substanzen wurden in Anlehnung an die zuvor in Zusammenarbeit mit M. RADZOM entwickelte Fermentationskurve[50] zur 36., 42. und zur 48. Stunde zu den Kulturlösungen gegeben. Nach 60 h erfolgte die Aufarbeitung der Kulturen woran sich die Isolierung von **21** anschloss.

Unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit des ^{13}C-Isotops (1.1%) lassen sich die Anreicherung und der spezifische Einbau nach den unten beschriebenen Formeln berechnen. Zuvor müssen allerdings die Intensitäten an Signalen der unmarkierten Verbindung normiert werden. Dies geschah, soweit nicht anders beschrieben, am Mittelwert der Signalintensitäten der Methylgruppen.

$$\textit{Anreicherung}\ [\%] = 1.1\% \times \frac{\textit{Intensität des Signals der markierten Verbindung}}{\textit{Intensität des Signals der unmarkierten Verbindung}} - 1.1\%$$

$$\textit{spezifischer Einbau} = \frac{\textit{Anreicherung}\ [\%] \times 100}{\textit{Anreicherung des Vorläufers}\ [\%]}$$

Konventionell wird ein Einbau als signifikant gewertet, wenn der spezifische Einbau größer als eins ist. Eine Zusammenfassung der Konzentrationen der Vorläufer und der erhaltenen Anreicherungen ist in Tabelle 13 und Tabelle 14 (s. B 2.2.4) wiedergegeben.

<u>[2-^{13}C]Malonat</u>

Nachdem Experimente mit [2-^{13}C]Acetat zu starkem Scrambling geführt hatten,[50] sollte dieser Effekt durch Fütterung von [2-^{13}C]Malonat vermieden werden. Im Makrolidteil des Moleküls spiegelten sich die zu erwartenden Einbaumuster mit hohen relativen Einbauraten (ca. 10%) wieder. In der Startereinheit zeigte sich hingegen ein mit 1% nur geringer Einbau an C-4'. Dies lässt sich dadurch erkären, dass Malonat der Baustein ist, welcher von der PKS-Synthase direkt verwendet werden kann, während für die Biosynthese der Startereinheit das aus dem Malonat generierte Acetat als Substrat dient.

[1,2-$^{13}C_2$]Acetat

In den vorangegangenen Arbeiten war bereits [1,2-$^{13}C_2$]Acetat gefüttert worden.[50] Dies geschah mit 12 mmol/L allerdings in einer relativ hohen Konzentration, was zu einem sichtbaren Einbau auch in die Propionateinheiten führte. Um verlässlichere Ergebnisse zu erzielen wurde das Experiment mit einer standardmäßigen Endkonzentration von 6 mmol/L wiederholt.

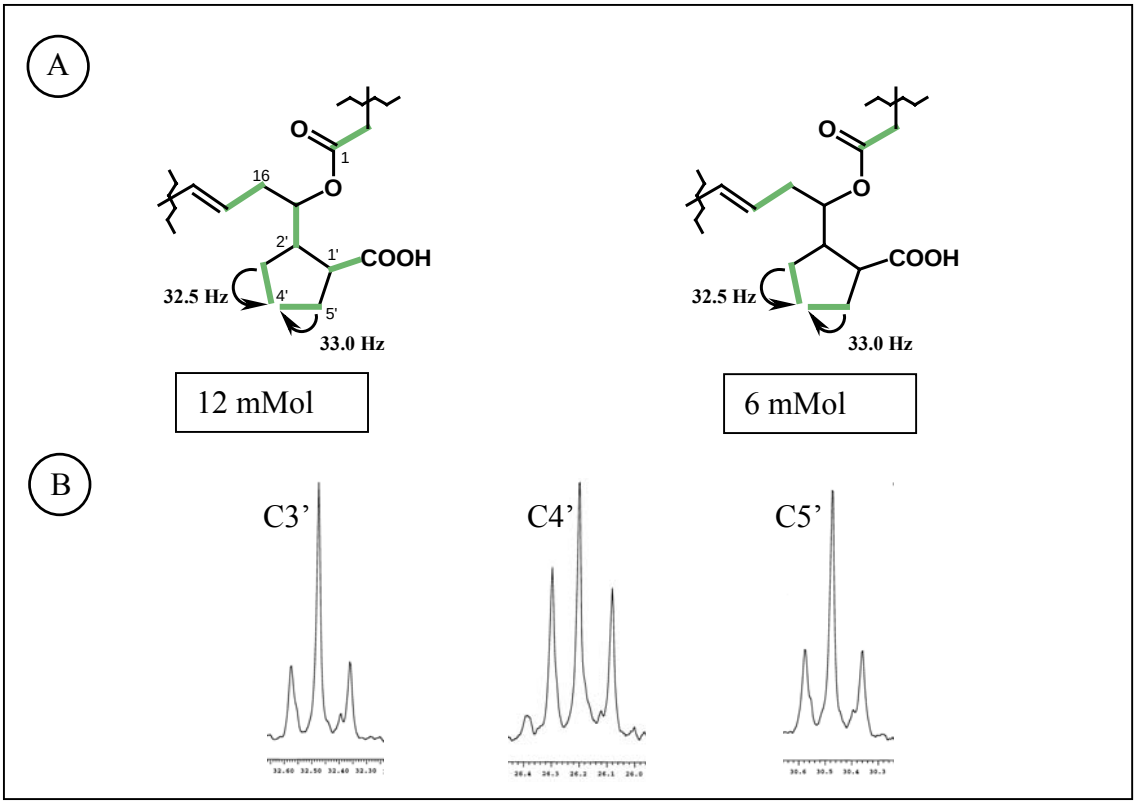


Abbildung 10: A: Vergleich der Anreicherungen aus verschieden konzentrierten [1,2-$^{13}C_2$]-Acetat-Fütterungen, **B**: ^{13}C-NMR-Signale bei Fütterung von 6 mmol/L.

Bisher waren die innerhalb des Cyclopentylringes liegenden Einheiten als drei Einzelanreicherungen interpretiert worden.[50] Das ließ sich allerdings in dem neuen Experiment nicht bestätigen. Es liegen vielmehr zwei Isotopomere vor, deren intakte Acetateinheiten sich an C-4' überschneiden. Da die jeweiligen Kopplungskonstanten kaum voneinander abweichen, erscheint das Signal von C-4' bei diesem Einbaumuster als ein Dublett. Aus den zwei sich überschneidenden Acetateinheiten lässt sich schlussfolgern, dass ein Vorläufer der CPDA symmetrisch sein muss. Der Vergleich der Ergebnisse offenbart weiterhin, dass die zwei exozyclischen Acetateinheiten, die aus dem ersten Experiment abgeleitet wurden, sich nicht bestätigen lassen.

[3,5-$^{13}C_2$]Tyrosin

Es war nicht auszuschließen, dass Tyrosin widererwarten doch in Cyclopentandicarbonsäure umgewandelt wird. Diese Möglichkeit besteht z.B., wenn für die Startereinheit zwei Biosynthesewege nebeneinander existieren. Der eine könnte CPDA aus Acetat generieren und würde überwiegen, sodass die erhaltenen Markierungen die überdecken, die aus dem zweiten Weg über den Tyrosinkatabolismus, hervorgehen.

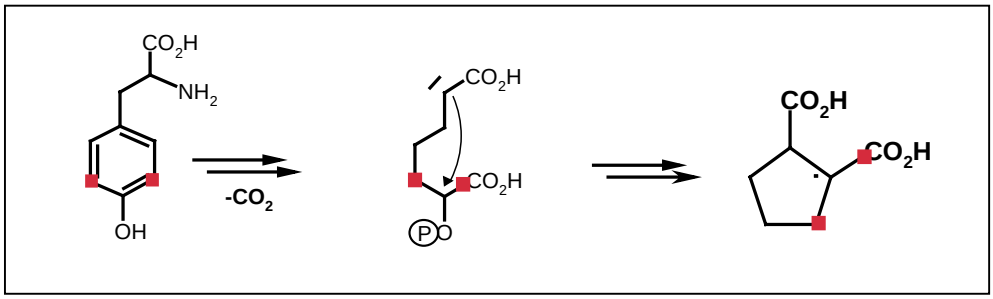


Abbildung 11: Potentieller Einbau von [3,5-$^{13}C_2$]-Tyrosin in CPDA.

Dies sollte anhand einer Fütterung mit [3,5-$^{13}C_2$]-Tyrosin überprüft werden. Nach dem in Abbildung 8 vorgestellten Mechanismus sollte eine 3,5-$^{13}C_2$-Markierung des Tyrosins in einer Anreicherung einer Carboxylgruppe und von C-5' oder C3' der Startereinheit resultieren (s. Abbildung 11). Allerdings waren bei diesem Experiment keinerlei Anreicherungen im Molekül zu ermitteln.

Dies Ergebnis legte nahe, dass kein zweiter vom Tyrosin ausgehender Biosyntheseweg beschritten wird.

[U-$^{13}C_9$]Tyrosin

Um gänzlich auszuschließen, dass Tyrosin an der Bildung der CPDA beteiligt ist, wurde dieses - trotz der Kosten - auch in uniformer Isotopenmarkierung gefüttert. Die Analyse der Kopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum ergab das in Abbildung 12 dargestellte Einbaumuster. Zunächst sticht die schon aus den vorherigen Experimenten bekannte Signalform für C-3', C-4' und C-5' hervor. Daher kann auch auf die gleichen Isotopomere geschlossen werden. Neben diesen Kopplungen sind weitere dem nordöstlichen Teil der Startereinheit zuzuordnen. Sie deuten auf den Einbau einer intakten C_4-Einheit hin.

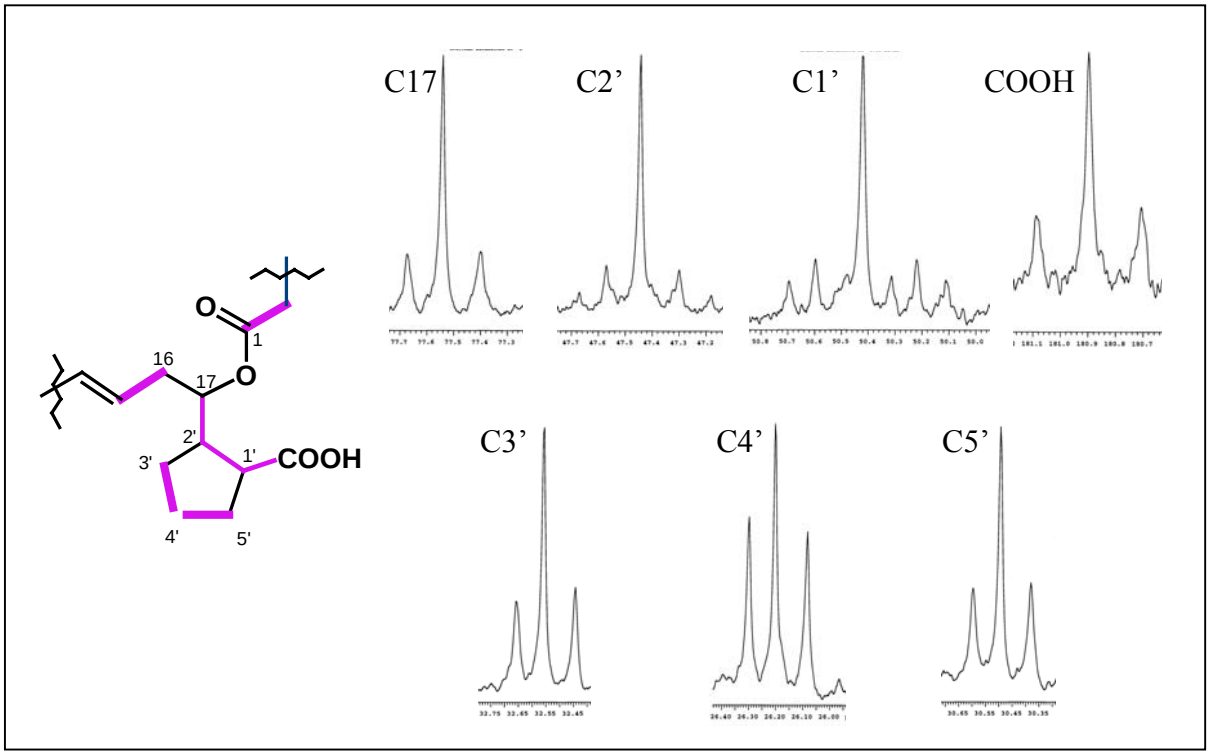


Abbildung 12: Ergebnisse der Fütterung von [U-$^{13}C_9$]Tyrosin.

Die Intensität der Kopplungen ist allerdings relativ gering, was gegen einen direkten Einbau spricht. Die erhaltenen Ergebnisse stellten jedoch sicher, dass Tyrosin nicht nach dem von LAEDLAY und SALAS vorgeschlagenen Mechanismus zu Cyclopentandicarbonsäure metabolisiert wird. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass Tyrosin bei dieser Biosynthese eine besondere Rolle zukommt.

[1,4-$^{13}C_2$]Bernsteinsäure

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Tyrosin zu Fumarat abgebaut wird (s. Abbildung 13), liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete C_4-Einheit mit Fumarat verbunden ist. Da isotopenmarkiertes Fumarat sehr teuer ist, bot es sich an, dessen Vorläufer aus dem Citratcyclus (Bernsteinsäure) zu verwenden. In vorbereitenden Experimenten ließ sich feststellen, dass die Zugabe von 3 mmol/L Bersteinsäure die Produktion von Borrelidin um 90% verringert. Dieser Effekt war bei Einsatz von 2, sowie 1 mmol/L nicht zu beobachten. Ein Fütterungsexperiment mit [1,4-$^{13}C_2$]Bernsteinsäure (2 mMol) hätte zu einzelnen Anreicherungen in der Carbonsäureeinheit, sowie an C-17 führen sollen. Es konnte jedoch keine deutliche Anreicherung beobachtet werden. Es hoben sich nur geringfügige Signalerhöhungen mit Einbauraten von 0.3 und 0.7% für C-17 bzw. die Carbonsäureeinheit ab. Eine sichere Aussage kann hier also nicht getroffen werden. Da Experimente mit unmarkiertem Fumarat zu keiner Ausbeutesteigerung führten (s.Tabelle 14, Kapitel B 2.4), schien es nicht sinnvoll das Experiment doch noch mit isotopenmarkiertem Fumarat zu wiederholen.

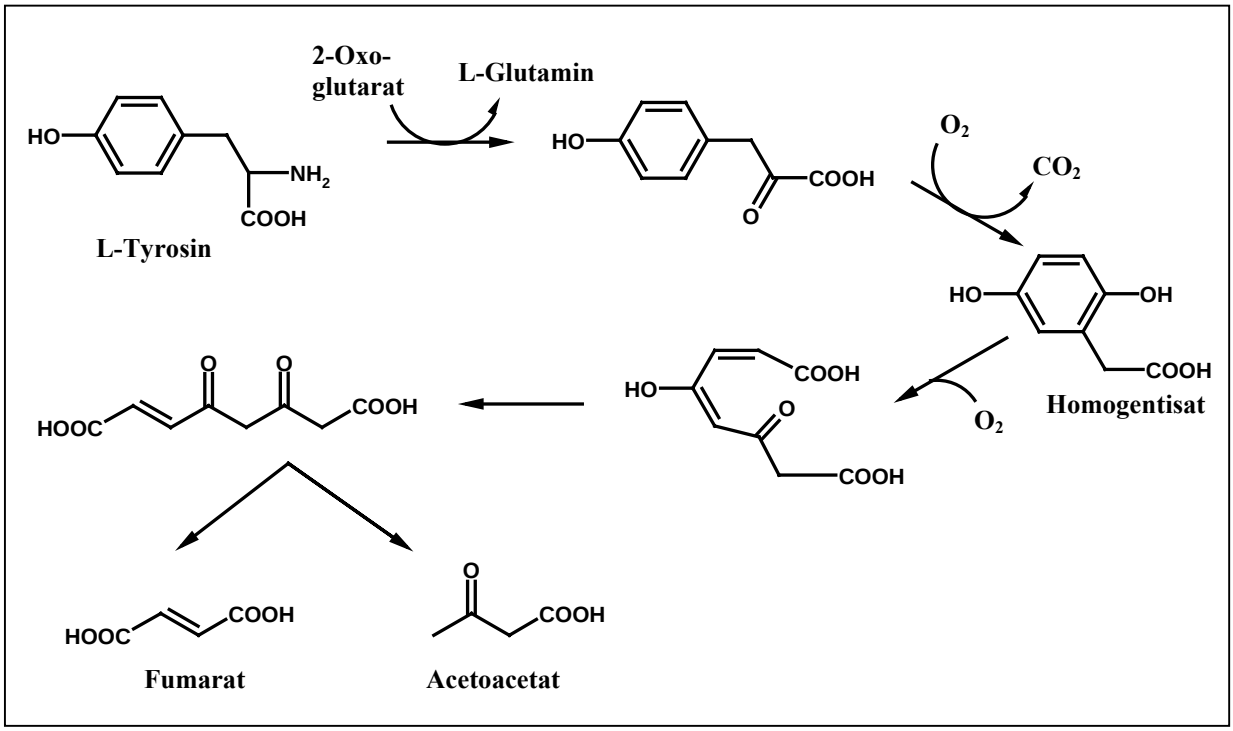


Abbildung 13: Abbau von Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat.[53]

[U-$^{13}C_6$]Glucose

Ein weiterer potentieller Vorläufer der Startereinheit ist Glucose. Diese wurde uniformmarkiert mit einer Endkonzentration von 6 mmol/L gefüttert. Wie schon beim doppelt markierten Acetat fanden sich auch hier die zwei Isotopomere mit den sich überschneidenden Acatateinheiten wieder. Weitere Anreicherungen in der Startereinheit ließen sich nicht nachweisen.

Im Makrolid spiegelten sich ebenfalls die gleichen Einbaumuster wie aus [1,2-$^{13}C_2$]Acetat wieder.

[U-$^{13}C_3$]Glycerin

Experimente mit uniformmarkiertem Glycerin waren bereits durchgeführt worden.[50] Diese wurden ebenfalls mit einer niedrigeren Konzentration des Vorläufers (3 mMol) wiederholt. Das in diesem Experiment erhaltene Einbaumuster unterscheiden sich nicht von denen aus den Experimenten mit höherer Konzentration des Vorläufers. Hier kann also von einem echten Vorläufer ausgegangen werden. Dies spiegelt sich auch in der höheren Intensität der Kopplungssignale wieder. Dass die Ausbeute in jedem Experiment mit Glycerinzugabe deutlich anstieg, unterstützt diese Vermutung ebenfalls.

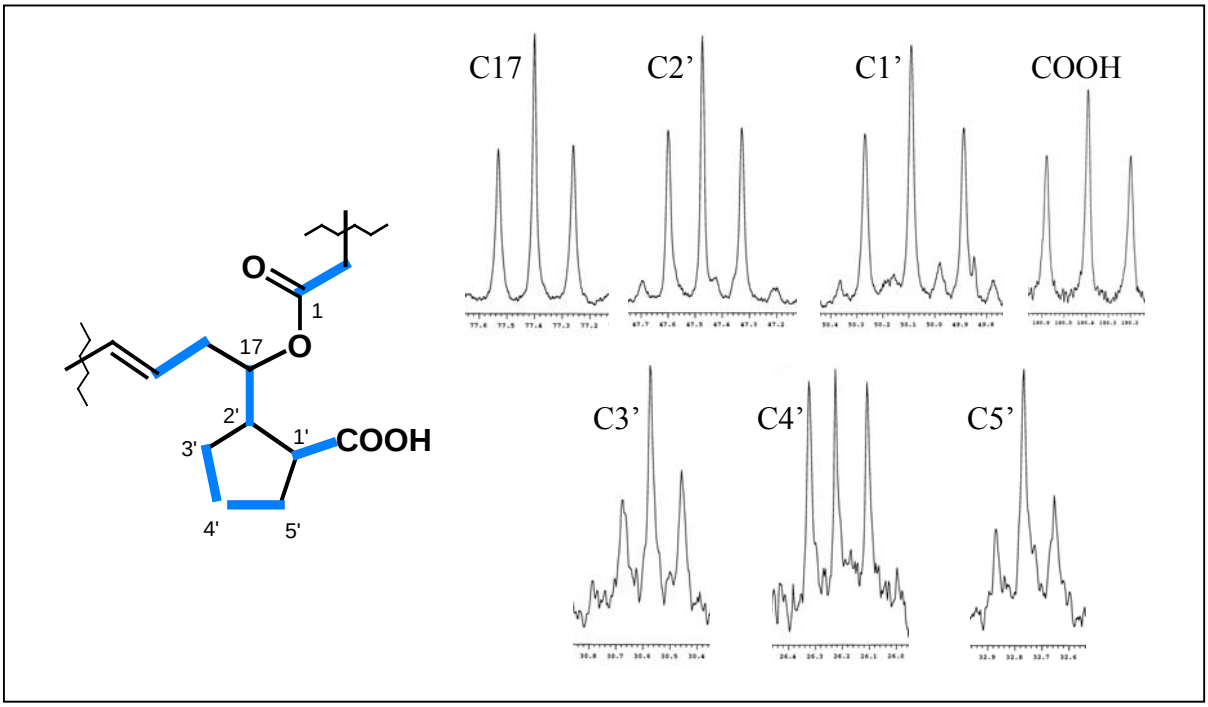


Abbildung 14: Ergebnisse der Fütterung von [U-$^{13}C_3$]Glycerin.

Darauf aufbauend wurde Glyoxalsäure (3 mMol) gefüttert und auf eine mögliche Ausbeutesteigerung hin untersucht (s. Tabelle 13, Kapitel B 2.4). Glyoxalsäure ist ein aus Glycerin hervorgehender C_2-Körper, wie er sich in der Startereinheit wiederfindet. Bei diesem Experiment konnte jedoch keine Zunahme der Borrelidinproduktion beobachtet werden, was Glyoxalsäure als Intermediat unwahrscheinlich erscheinen lässt.

(*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin bzw. (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin[i]

Um dem Mechanismus des Aufbaus von CPDA aus Glycerin näher zu kommen, sollte die Richtung in der die Glycerineinheiten verbunden sind, festgestellt werden. Zu diesem Zweck kann das stereospezifisch arbeitende Enzym Glycerolkinase ausgenutzt werden. Prochirales Glycerin wird unter dessen Katalyse nur in L-Glycerin-3-phosphat umgewandelt. Aus diesem geht später dann Acetyl-CoA hervor, wie in Abbildung 15 gezeigt ist.[54]
Zufütterung der stereosepzifisch markierten Glycerine (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin bzw. (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin sollte also in einer intakt markierten C_2-Einheiten bzw. einer Einzelanreicherung entsprechend C-1 aus Acetat resultieren.

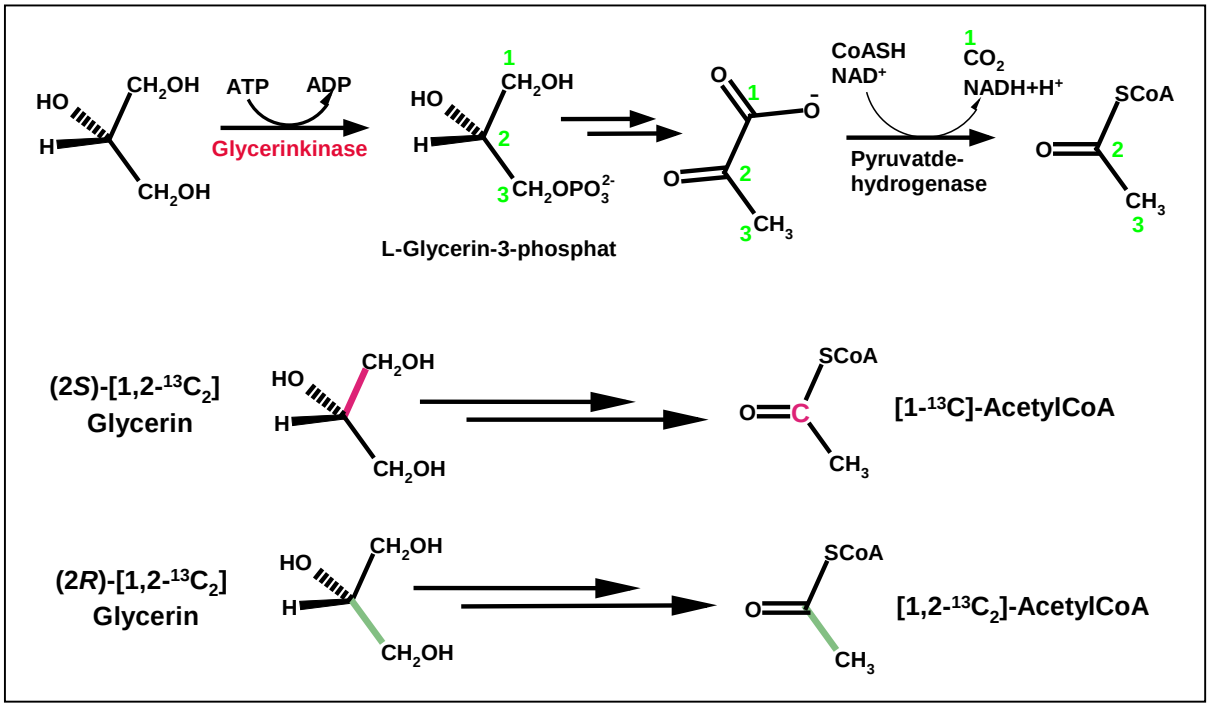


Abbildung 15: Umwandlung der stereospezifisch markierten Glycerine.

[i] H. G. FLOSS und S. GROND danke ich an dieser Stelle für die Bereitstellung der stereoselektiv markierten Glycerine.

In mehreren vorbereitenden Experimenten mit Mischungen aus uniformmarkiertem und unmarkiertem Glycerin wurden die optimalen Zufütterungsbedingungen ermittelt. Wichtig ist, dass grade so viel markiertes Glycerin verwendet wird, dass keinerlei statistische Kopplungen auftreten. Der Zusatz von unmarkiertem Glycerin dient dabei der Steigerung des metabolischen Drucks. Als optimal erwies sich dabei ein Gemisch von 2 mmol/L der stereoselektiv markierten Glycerine und 1 mmol/L des unmarkierten Glycerins.

Die Fütterung des (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerins (65% ee) führte zum erwarteten Ergebnis bei einer Ausbeute von 8.2 mg/L. Die ^{13}C-NMR-Spektren offenbarten intakte C_2 Einheiten wie zuvor aus uniform markiertem Glycerin beobachtet. Einen gute Kontrolle für den erfolgreichen Verlauf des Experiments bilden die Acetateinheiten im Makrolidteil des Borrelidins, die entsprechend markiert sind.

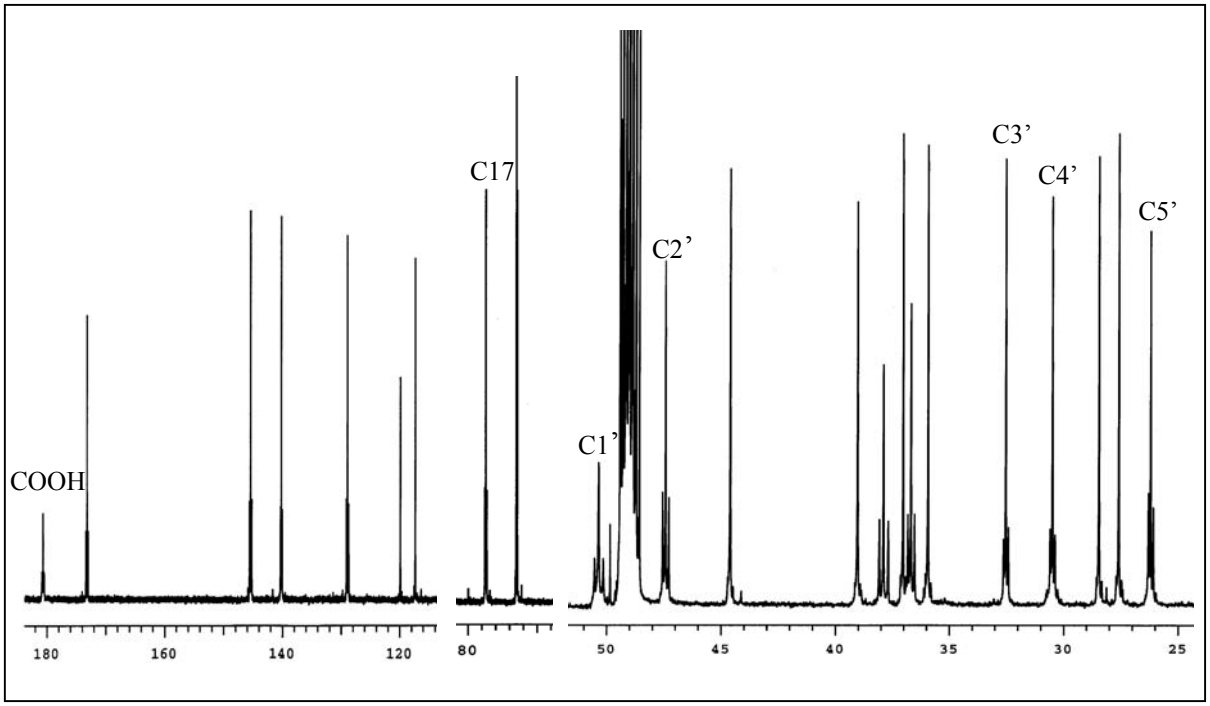


Abbildung 16: Ausschnitte aus dem ^{13}C-Spektrum der Fütterung von (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin.

Das zweite Experiment, mit (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin (76% ee) (Ausbeute an **21**: 11.1 mg/L), zeigte jedoch auf den ersten Blick keine Einzelanreicherungen, weder in der Startereinheit noch im Makrolid. Zunächst musste also davon ausgegangen werden, dass dieses Experiment misslungen war. Bei genauerer Betrachtung der ^{13}C-NMR-Spektren offenbarte sich jedoch,

dass sich die ebenfalls in der Probe vorhandene Mindermenge an (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin im Borrelidin wiederfand. Entsprechende Kopplungen, wie im zuvor beschriebenen Experiment, waren zu erkennen. Ein Einbau hatte also stattgefunden und ein generelles Misslingen des Experiments konnte somit ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Auswertung stellt die Referenzierung dar. Bisher war dies über den Mittelwert der Intensitäten der Methylgruppen geschehen. Als weitere Möglichkeit bot sich in diesem Fall der Mittelwert der C-2-Kohlenstoffatome der Acetateinheiten (C-2, C-14 und C-16) an. Auch hier konnten keine deutlichen Ergebnisse erhalten werden. Zwar zeigen die Köpfe der Acetateinheiten im Makrolid eine leichte Anreicherung, doch auch die Köpfe der Propionateinheiten wiesen Signalerhöhungen auf. Trotzdem sollte zumindest die leichte Anreicherung von C-17, die Verknüpfung zwischen Makrolid und Startereinheit, in den weiteren Überlegungen berücksichtigt werden.

Ausgerechnet das informationsgebende Experiment ließ also keine validierten Schlussfolgerungen zu. Es muss demnach offen bleiben, warum das gleiche C-Atom des Glycerins im einen Experiment deutlich eingebaut wird und im anderen nicht.

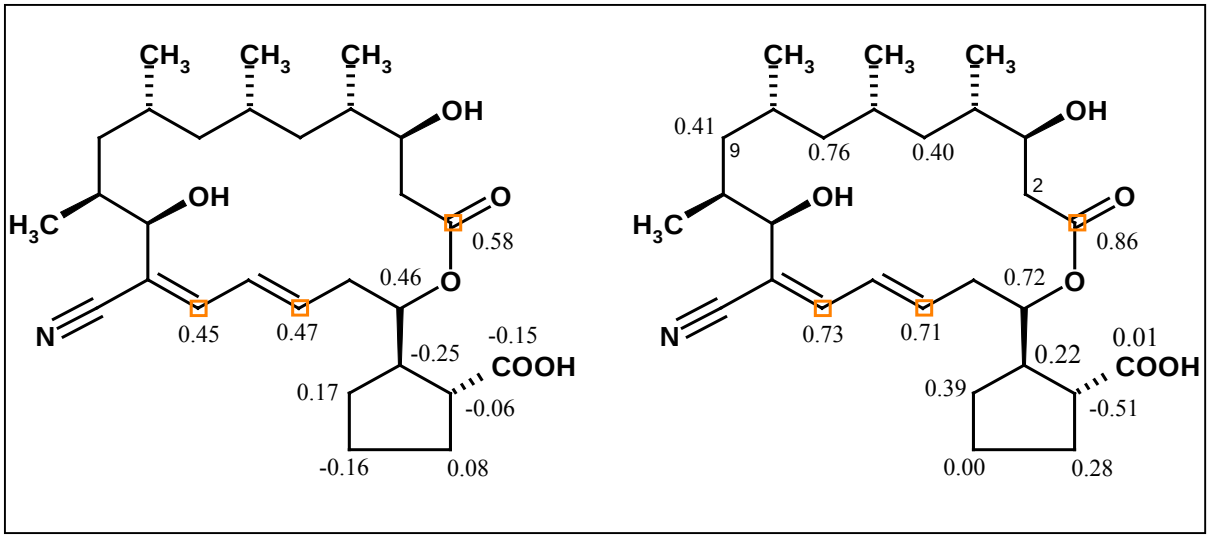


Abbildung 17: Errechnete Einbauraten aus der Fütterung von (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin, links: Normierung an Intensitätsmittelwerten der Methylgruppensignale, rechts: Normierung an der Signalintensität von C-9.

2.2.5 Diskussion

Die Fütterungsexperimente erlauben den eindeutigen Schluss, dass die Startereinheit des Borrelidins (CPDA) nicht, wie von LEADLAY und SALAS[52] postuliert, direkt aus Tyrosin hervorgeht. Glucose ist als direkter Vorläufer ebenfalls auszuschließen. Ein deutlicher Einbau

von isotopenmarkiertem Glycerin und der Anstieg der Ausbeute an **21** in diesen Experimenten, legt nahe, dass CPDA aus Glycerin hervorgeht. Ein genauer Mechanismus kann hierfür bisher nicht formuliert werden.

Die Startereinheit kann in zwei Teile unterschiedlicher Genese unterteilt werden. C-3', C-4' und C-5' bilden die erste (untere) Einheit. Sie kann aus Acetat sowie Glycerin aufgebaut werden. Das Einbaumuster zeigt die beschriebenen Isotopomere, was bedeutet, dass eine symmetrische Zwischenstufe durchlaufen wird. Die zweite (obere) Einheit umfasst C-17, C-5', C-1' und die Carboxylgruppe. Diese C_4-Einheit ist für Acetat nur sehr mäßig zugänglich, wird aber deutlich durch zwei C_2-Einheiten aus Glycerin erreicht.

Die aus der Fütterung von [U-$^{13}C_9$]Tyrosin erhaltenen schwachen Kopplungsmuster und die aus der [1,4-$^{13}C_2$]Bernsteinsäure-Fütterung erhaltenen minimalen Anreicherungen können als Grundlage für weitergehende Vermutungen dienen. Beim Abbau von Tyrosin entsteht Fumarat. Mit diesem C_4-Körper scheint der obere Teil der CPDA biosynthetisch verknüpft zu sein. Die Zugabe von unmarkiertem Fumarat resultierte jedoch in keiner Ausbeuteerhöhung, weswegen darauf geschlossen wurde, dass Fumarat nicht der direkte Vorläufer des oberen Teils der CPDA ist. Läge aber der Engpass der CPDA-Biosynthese bei der Bildung des unteren Teils, so würde das erklären, warum bei Fütterung von unmarkiertem Fumarat für die obere Einheit keine Ausbeuteerhöhung auftrat. Eine Fütterung von isotopenmarkiertem Fumarat sollte also doch in Betracht gezogen werden.

Um die Ergebnisse aus den Fütterungen mit isotopenmarkiertem Tyrosin abzusichern, können Fütterungen zu einem früheren Zeitpunkt der Borrelidinbiosynthese in Betracht gezogen werden. Sollte die Bildung der Startereinheit aus Tyrosin durch bereits gebildete CPDA repremiert werden, während gleichzeitig die Genese aus Acetat normal weiterläuft, würde dies zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Da das Tyrosin aber offensichtlich schon bei dem bisher gewählten Fütterungszeitpunkt zu Acetat katabolisiert wird, wäre die Wahl eines früheren Fütterungszeitpunkts eine Gratwanderung.

Um die Auswertung des Fütterungsexperiments mit (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin eindeutig zu gestalten, kann durch Veresterung der Säuregruppe ein externer Standard in das Molekül eingeführt werden. So wäre ein Referenzsignal vorhanden, welches keinerlei eigene Anreicherung enthalten kann. Eine Wiederholung des Experiments unter gleichen Bedingungen hingegen erscheint nicht sinnvoll, da die erfolgreiche Aufnahme der Substanz anhand des Einbaus der Probenminderkomponente (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin zu erkennen ist. Auch die Qualität der Fütterungssubstanz steht nicht in Frage, da mit der selben Probe andere Experimente erfolgreich durchgeführt wurden.[54]

3 Screening endosymbiontisch lebender mariner Pilze

Wie schon beschrieben bilden Endosymbionten eine für die Leitstruktursuche wichtige Klasse von Naturstoffproduzenten. Im Folgenden werden Untersuchungen mit verschiedenen endosymbiontischen Pilzen beschrieben.

3.1 Pilzstämme aus Algen von den Kornaten

Vier verschiedene Algen aus dem Inselgebiet der Kornaten (Kroatien) dienten als Quelle für die Isolierung endosymbiontisch lebender Pilze. Bei den Algen handelte es sich um zwei Grünalgen, (I und II), eine Braunalge (III) und eine Rotalge (IV), die nicht näher bestimmt wurden.

Zunächst wurden die Algen einer Oberflächensterilisation mit 70%igem Ethanol unterzogen. Durch Zerschneiden des Algenmaterials unter sterilen Bedingungen konnten die Zellzwischenräume geöffnet werden. Aus den auf Agarplatten ausgelegten Algenstückchen wuchsen so die endophytischen Pilze heraus. Das Wachstum von Bakterien konnte durch Zusatzt geeigneter Antibiotika unterbunden werden.[55]

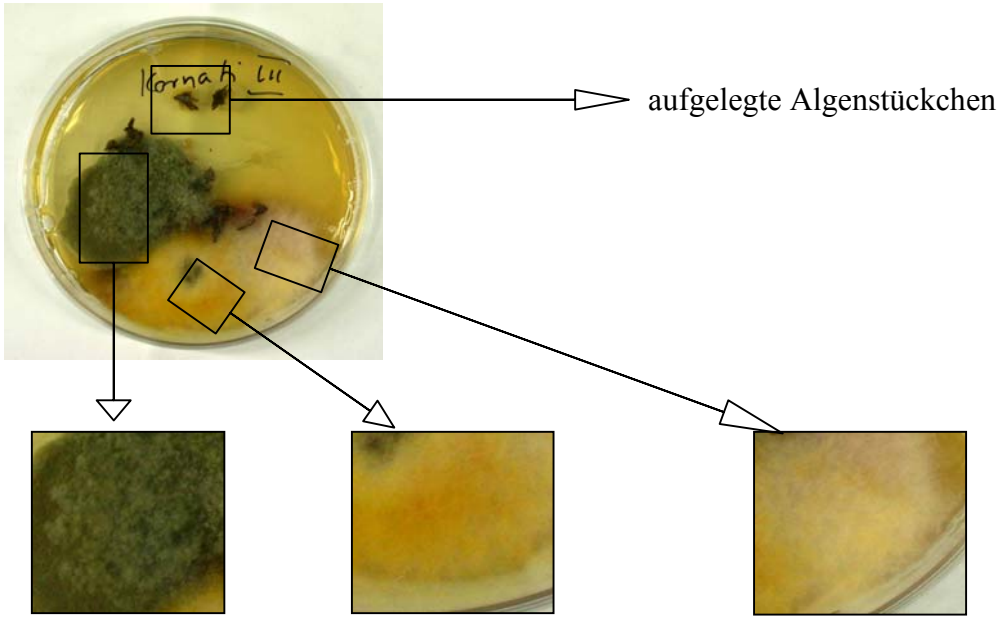


Abbildung 18: Isolierung endophytischer Pilze aus Alge III.

Die nach siebentägiger Inkubation bei 24 °C gewachsenen Pilze wurden in mehreren Generationen von Verdünnungsausstrichen vereinzelt. Auf diese Weise konnten fünf Pilzstämme isoliert werden. Die taxonomische Bestimmung der Isolate erfolgte durch DR. DRAEGER (AK Aust, TU Braunschweig) nach morphologischen Gesichtspunkten (Tabelle 1). Die erhaltenen Gattungen sind ubiquitär, wobei insbesondere *Nodulosporium* sp. ein typischer Endophyt ist.[56,57,58]

3.1.1 Chemisches und Biologisches Screening

Zur Beurteilung der Stämme im Chemischen Screening dienten je 2 L Ruhekulturen in P-Kolben. Diese wurden nach dem OSMAC-Verfahren[59] in verschiedenen Medien (SGG, M2, G20, 1158, 1549) angelegt. Die Bearbeitung erfolgte wie in B 3.3 beschrieben. Die Extrakte von Mycel und Kulturfiltrat erfuhren eine dünnschichtchromatographische Auftrennung in Chloroform/Methanol (9:1), wonach die Metabolite mittels UV-Licht (245 und 366 nm) und durch verschiedene Anfärbereagenzien sichtbar gemacht wurden. Stämme, die mehrere Metabolite offenbarten, wurden als *potent* eingestuft. Solche, die in den unterschiedlichen Medien verschiedene Metabolitenspektren aufwiesen, sind als *variabel* zu betrachten.

Tabelle 1: Aus Algen isolierte Pilzstämme und ihre Einstufung im Chemischen Screening

Alge	Stammbezeichnung	Taxonomische Klassifizierung	Beurteilung im Chem. Screening
I	Kornati 1a	Epicoccum purpurascens = Epicoccum niger	potent variabel
	Kornati 1b	Nodulosporium sp.	potent nicht variabel
II	Kornati 2a	Chaetomium sp.	nicht potent nicht variabel
III	Kornati 3a	Epicoccum purpurascens = Epicoccum niger	potent variabel
	Kornati 3c	Alternaria sp.	potent nicht variabel
IV	-	-	-

Extrakte, die durch ihre Metabolitenvielfalt hervortaten, wurden zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel (Gradient: $CH_2Cl_2 \rightarrow CHCl_2/MeOH$, 3:1) fraktioniert und danach erneut im Chemischen Screening beurteilt. Diese Vorgehensweise kann Hinweise darauf geben welche der auffälligen Substanzen Hauptmetabolite sind und in Mengen vorliegen, die eine Isolierung möglich erscheinen lassen. Während nach der Beurteilung der Rohprodukte noch 14 Extrakte interessant waren, erschienen nach der ersten Säulenchromatographie nur noch 6 Extrakte der Bearbeitung wert.

Die biologische Testung der aus dem Chemischen Screening erhaltenen Extrakte fand bei der BASF AG im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts[60] statt. In High-Throughput-Mikrotestsystemen mit den in Tabelle 2 dargestellten pflanzenpathogenen Pilzen und entomologischen Untersuchungen an den in Tabelle 3 dargestellten Insekten wurde die pflanzenschutzrelevante biologische Wirkung der Extrakte untersucht.

Tabelle 2: Im Biologischen Screening eingesetzte phytopathogene Pilze.

Abkürzung	Wissenschaftliche Bezeichnung	Wächst auf	Krankheitsbild
PHYTIN	Phytophthora infestans	Tomate	Kraut- und Knollenfäule
BOTRCI	Botrytis cinerea	Tomate, Paprika	Grauschimmel
PYRIOR	Pyricularia oryzae	Reis	Reisbrand
SEPTTR	Septoria tritici	Weizen	Blattdürre

Tabelle 3: Im Biologischen Screening eingesetzte Insekten.

Abkürzung	Wissenschaftliche Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung
ANTHGR	Anthonomus grandis	Baumwollkapselrüssler
CERACA	Certitis capitata	Mittelmeerfruchtfliege
HELIVI	Heliothis virescens	Eulenfalter
MEGOVI	Megoura viciae	Bohnenblattlaus

In diesen Systemen wird eine fungizide Wirkung gewertet, wenn das Wachstum der Pilze um mindestens 75 % reduziert ist. Für eine insektizide Wirkung muss der Schaden auf den Organismus mindestens 75 % betragen.

In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Mikrotests und der entomologischen Untersuchungen wiedergegeben.

Die in diesem Testsystem auffälligen Extrakte sollten bei der BASF AG einer HPLC-Trennung mit anschließender Prüfung der Fraktionen unterzogen werden; der erste Schritt zur wirkungsorientierten Isolierung der Metabolite. Diese Methode hatte im Rahmen des Verbundprojektes bereits Erfolge geliefert.[60] Die Ergebnisse der HPLC-basierten Testung standen bis zum Ende dieser Arbeit jedoch noch aus.

Tabelle 4: Ergebnisse des Biologischen Screeings.

Extrakt	Biologische Aktivität	
Kornati 1a SGG KF	PYRIOR	fungizid
Kornati 1a M2 KF	BOTRCI, PYRIOR	
Kornati 1a G20 KF	BOTRCI, PYRIOR	
Kornati 1a 1549 KF	SEPTER, PYRIOR	
Kornati 3a G20 KF	BOTRCI, PYRIOR	
Kornati 3c G20 KF	CERACA	Insektizid

3.1.2 Isolierung der Sekundärmetabolite

Da die Ergebnisse des Biologischen Screenings der Rohextrakte erst nach mehreren Monaten erhalten wurden, musste die Auswahl der zu bearbeitenden Extrakte anhand der oben beschriebenen Vorgehensweise beim Chemischen Screening stattfinden.

3.1.3 Acetosellin (25) aus *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 1a)

Epicoccum purpurascens ist, wie bereits beschrieben ein ubiquitärer Pilz. Er zersetzt ein breites Spektrum organischer Materialien, kommt aber z.B. auch auf lebendigem Pflanzenmaterial oder der menschlichen Haut vor.[56] Es sind bereits mehrere interessante

Naturstoffe aus *Epicoccum purpurascens* bekannt, einige davon sind Abbildung 21 dargestellt.

Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Dünnschichtchromatogramme aus dem Chemischen Screening wurden Mycel- und Kulturfiltratextrakt aus einer 2 L Kultur von *Epicoccum purpurascens* Kornati 1a in SGG vereinigt. Chromatographie an Kieselgel (Gradient: CH_2Cl_2 → CH_2Cl_2/MeOH, 4:1) ergab sieben Fraktionen, von denen die erste an Sephadex LH20 (MeOH) getrennt wurde. Durch Reinigung an Flashkieselgel (Cyclohexan/Ethylacatat/Methanol 5:10:1) konnten 7.3 mg (3.4 mg/L) eines gelben Feststoffs erhalten werden.

Aus einem ESI-MS-Spektrum ging die molare Masse von 394 g/mol hervor, und anhand der Hochauflösung wurde die Summenformel zu $C_{23}H_{22}O_6$ bestimmt, was 13 Doppelbindungsequivalente impliziert. Das ^{1}H-NMR-Spektrum wies neben den Signalen zweier Methylgruppen Signale für 14 weitere Protonen auf. Daraus konnte unter Berücksichtigung der Summenformel auf das Vorhandensein zweier Hydroxygruppen geschlossen werden. Die Verschiebung von sechs Protonensignalen zwischen $\delta = 5.8$ und 7.1 und die charakteristischen Kopplungen zum Dublett vom Dublett vierer dieser Signale mit Kopplungskonstanten um 15 bzw. 10 Hz deuteten auf eine olefinische C_6-Kette mit drei *trans*-Doppelbindungen hin. Anhand eines COSY-NMR-Spektrums ließ sich diese Annahme bestätigen. Eine Recherche mit diesen Grundlagen in den Naturstoffdatenbanken AntiBase[61] und Chapmann & Hall Dictionary of Natural Products[62] ergab zwei Treffer, *Epicoccum purpurascens* naphtopyran (**26**)[63] und Acetosellin (**25**).[64]

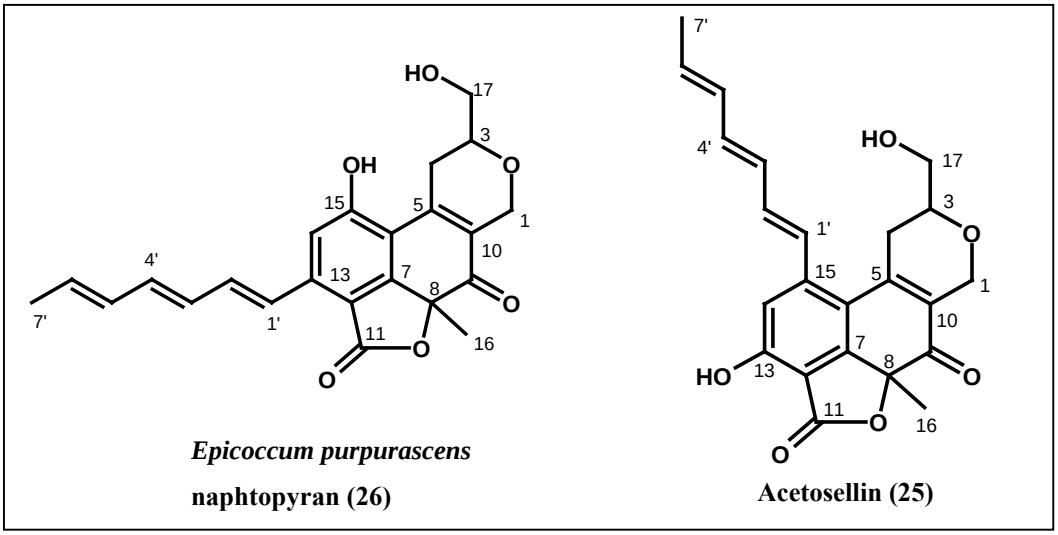


Abbildung 19: Aus Datenbankrecherche erhaltene Treffer.

Beide unterscheiden sich lediglich in der Regiochemie am Aromaten, wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist. Die weiteren Daten aus dem ^{1}H- und dem ^{13}C-NMR-Spektrum sowie die aus 2D-NMR-Spektren gewonnenen Informationen ließen sich zunächst mit beiden Strukturen vereinbaren. Die wichtigsten Korrelationen sind in Abbildung 20 dargestellt.

Die Zuordnung der Regiochemie am Aromaten gestaltete sich etwas schwieriger. Lediglich die HMBC-NMR-Korrelation zwischen C-6 und 1'-H (in der unten stehenden Graphik rot gekennzeichnet) wies darauf hin, dass eine Verknüpfung wie im Acetosellin vorlag.

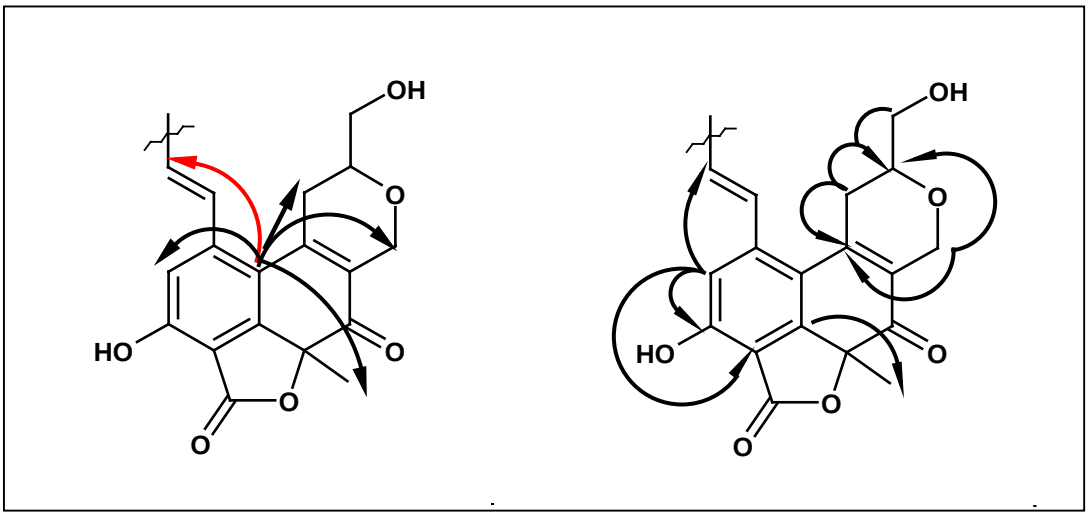


Abbildung 20: Ausgewählte HMBC-NMR-Korrelationen im isolierten **25**.

Für die Struktur von *Epicoccum purpurascens* naphtopyran (**26**) hingegen sprach, dass es, wie die isolierte Subtanz auch, aus *Epicoccum prupurascens* stammt, während Acetosellin bisher nur aus *Cercosporella acetosella* bekannt ist.[63,64]

Zur Klärung der Frage der Regiochemie trug die Betrachtung der bisher aus *Epicoccum prupurascens* bekannten Naturstoffe bei, deren Strukturen untereinander gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (s. Abbildung 21).

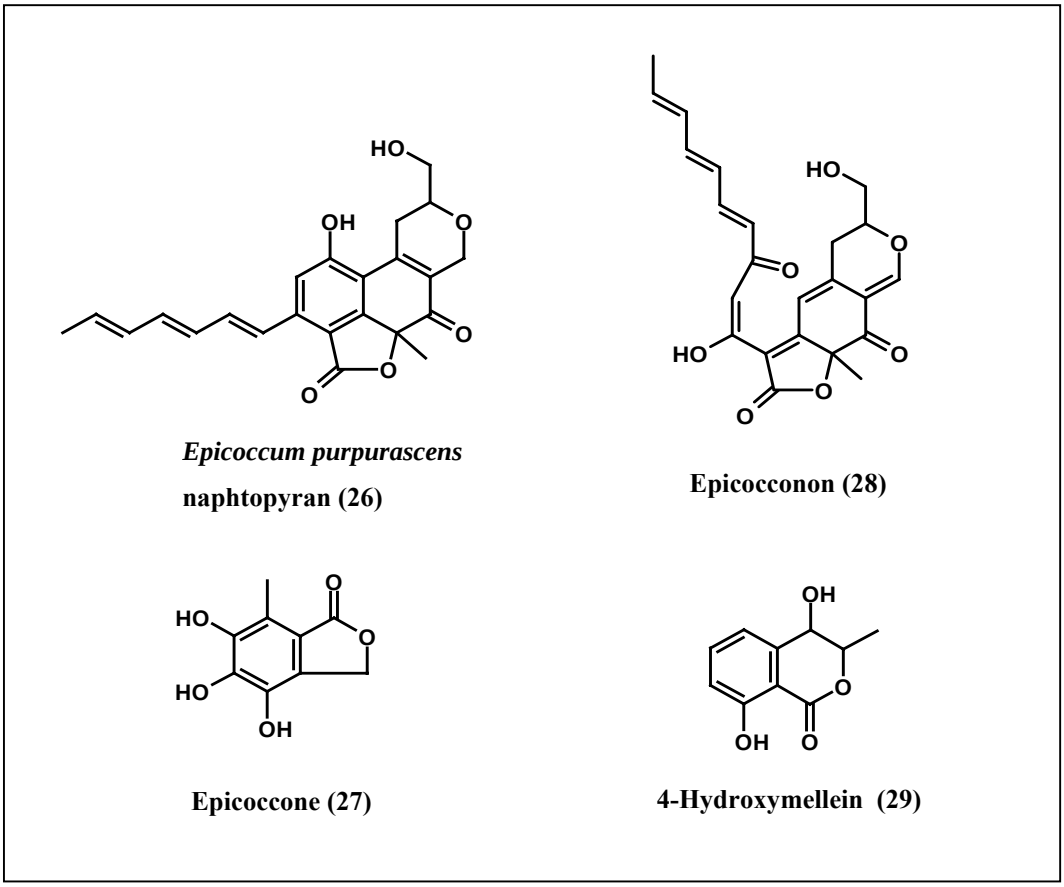


Abbildung 21: Aus *Epicoccum purpurascens* bekannte Strukturen.

Auffällig sind vor allem die Übereinstimmungen zwischen **26** und Epicocconon (**28**). Wird allerdings ein hypothetischer Ringschluss von **28** formuliert, so findet eine Verknüpfung von C-6 und C-15 mit anschließender Aromatisierung statt. Dadurch entsteht nicht wie aufgrund des Produzenten zu erwarten wäre **26**, sondern Acetosellin (**25**). Ein möglicher Mechanismus ist in Abbildung 22 gezeigt. Damit steht fest, dass mit Epicocconon aus *Epicoccum purpursacens* bereits ein mutmaßlicher Biosynthesevorläufer von Acetosellin isoliert wurde. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass die Struktur von *Epicoccum purpurascens* naphtopyran (**26**) falsch bestimmt worden war und es sich um Acetosellin gehandelt hatte. Unter Berücksichtigung dieser Richtigstellung kann also für die aus Kornati 1a gewonnene Substanz die Struktur von Acetosellin (**25**) angenommen werden.

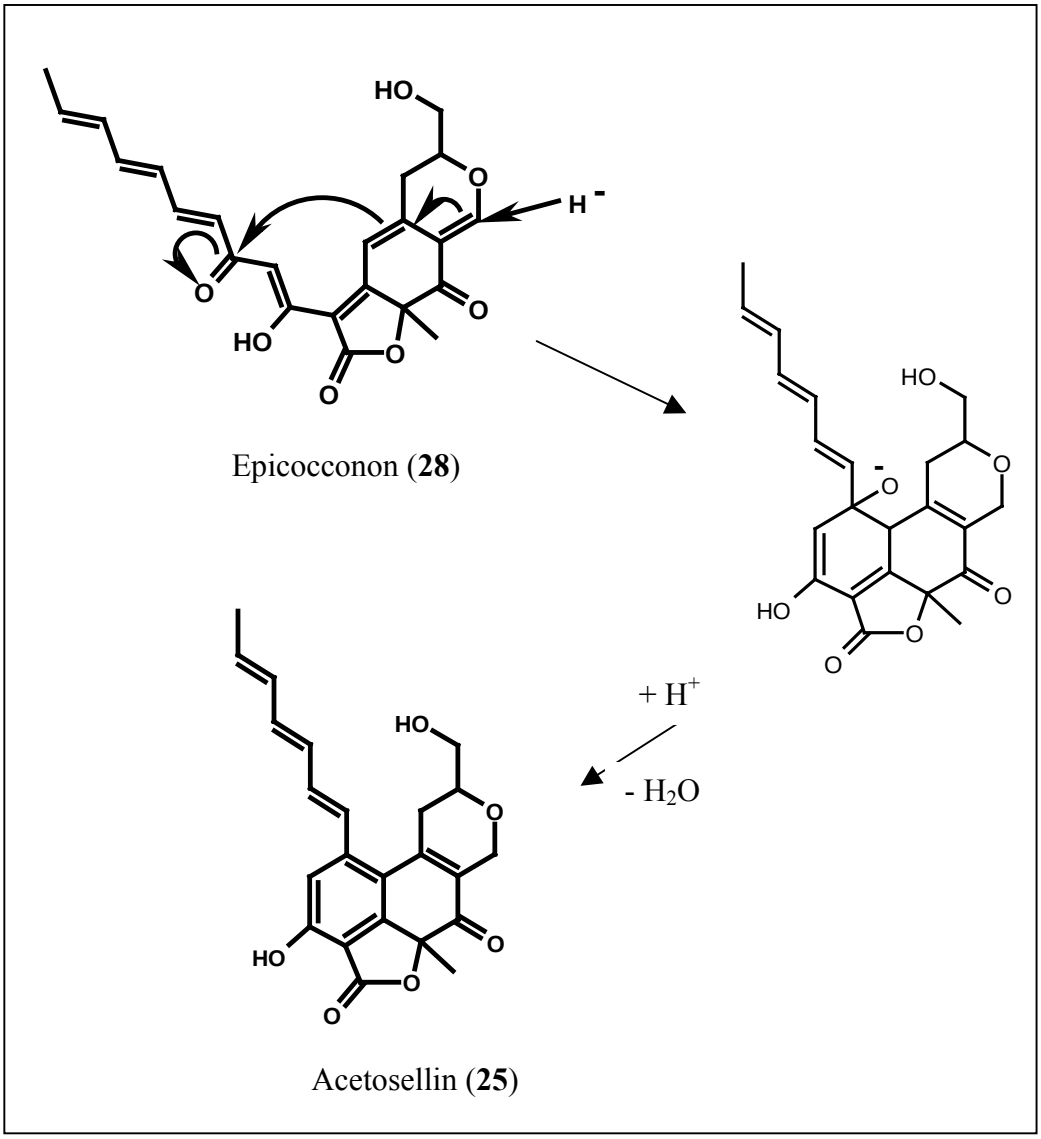


Abbildung 22: Hypothetische Zyklisierung von Epicocconon (**28**) zu Acetosellin (**25**).

Über die Biosynthese des Acetosellins ist bisher wenig bekannt. Die Struktur spricht für ein Polyketid. Orsellinsäure, die bei **27** und **29** den Ursprung bildet,[65] kommt als Startereinheit nicht in Frage. Plausibler ist es den Zusammenschluss zweier Polyketidketten zu formulieren. Naturstoffe polyketider Herkunft weisen nur äußerst selten mehr als eine Startereinheit auf.[66] Erstaunlicher Weise findet sich unter ihnen mit dem Pilzmetaboliten Ochrephilon **(30),** ein dem Acetosellin sehr ähnliches Azaphilon.[67] Von **30** existieren bereits Ergebnisse von Fütterungsexperimenten mit [1,2-$^{13}C_2$]Acetat.

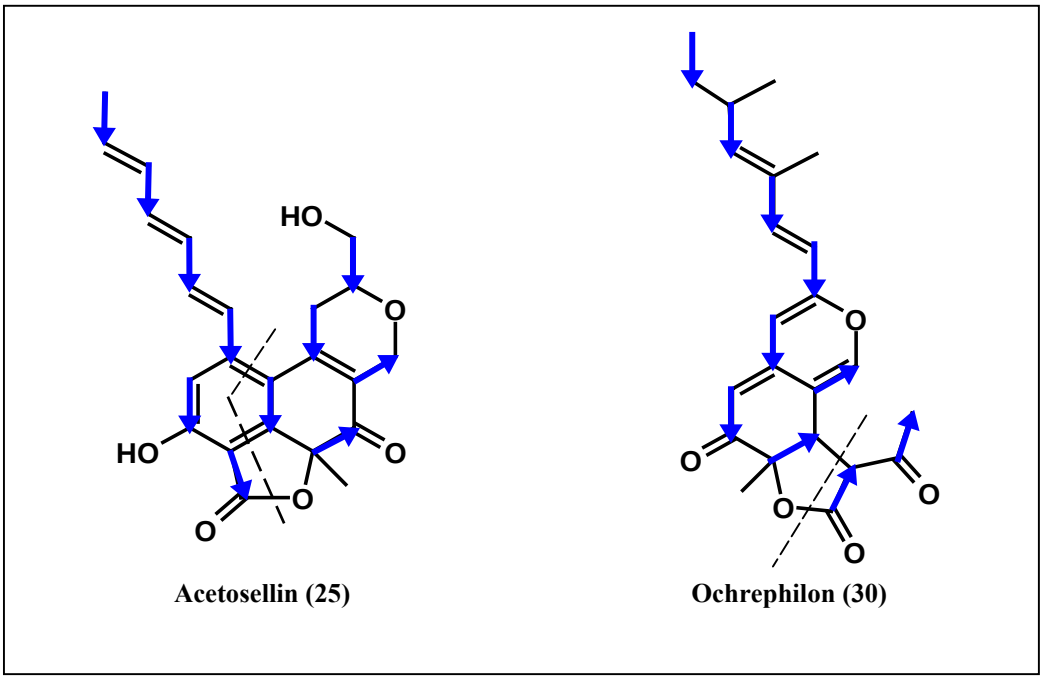


Abbildung 23: Zweiketten-Biosynthese in Acetosellin (**25**) und Ochrephilon (**30**).

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit scheint die Biosynthese der Metaboliten deutliche Unterschiede aufzuweisen. Eine gleichartige Polyketidkette mit unterschiedlichen Umlagerungsprozessen kann für die beiden Strukturen nicht ohne Weiteres formuliert werden. Biosyntheseuntersuchungen am Acetosellin mit isotopenmarkierten Vorläufern, insbesondere mit [1,2-$^{13}C_2$]Acetat könnten hier Klarheit schaffen. Der Stamm Kornati 1a wuchs aber bereits nach wenigen Überimpfungen nicht mehr an. Auch verschiedene Versuche, das Zellmaterial bzw. die Sporen zu aktivieren (Schockfrosten, Hitze, Feuchtigkeit, Zusatz von DMSO) schlugen fehl. Auch die aus den Langzeitkonservierungen eingesetzten Einlagerungen zeigten keinerlei Wachstum mehr. Aus diesem Grund konnten mit diesem Stamm keine Fütterungsexperimente durchgeführt werden. Aus der Isolierung der Pilze war ein zweiter *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 3a) hervorgegangen. Dieser wurde intensiv nach dem OSMAC-Prinzip auf die Bildung von Acetosellin hin untersucht. Die entsprechenden Kultivierungen sind in B 3.1.3 aufgeführt. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels HPLC-MS-Analyse getestet. In keinem Fall konnte die Bildung von Acetosellin (**25**) nachgewiesen werden, weswegen Biosyntheseuntersuchungen am Acetosellin leider nicht möglich waren.

Die Testung auf antibakterielle und fungizide Eigenschaften des gewonnenen Acetosellins zeigte keine Wirkung auf. Bisher ist nur eine schwache Aktivität gegen *Micrococcus luteus*, ein Bakterium ohne medizinische Relevanz,[68] und *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) festgestellt worden. Außerdem zeigt **25** hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum von Mais und Kresse (*Lepiditum sativum*).[64]

3.1.4 Communiol B (31) aus *Nodulosporium* sp. (Stamm Kornati 1b)

Bei *Nodulosporium* sp. (auch als *Nodulisporium* sp. bezeichnet) handelt es sich um einen meist mit Pflanzen assoziierten Pilz, der zum Beispiel häufig in der Rhizzosphäre von Laubbäumen zu finden ist.[69] *Nodulosporium* sp. wird als Allergen beschrieben.[70] Von dieser Spezies sind bisher kaum Sekundärstoffe bekannt.

Da im Chemischen Screening die Dünnschichtchromatogramme der Kulturfiltratextrakte vom Stamm Kornati 1b aus den Medien 1549 und G20 keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurden diese vereinigt. Nach Fraktionierung der vereinigten Extrakte an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) und Aufreinigung an Sephadex LH20 (Aceton) lagen 28 mg (7 mg/L) eines farblosen Öls als Reinsubstanz vor. Im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform/Methanol 9:1) schleifte die Substanz, was auf das Vorliegen einer Säure hindeutete, und färbte mit Ansialdehyd/Schwefelsäure in Hitze grün-grau an. Ein ESI-MS-Spektrum lieferte die molare Masse von 214 g/mol. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum gingen neben dem Signal einer Methylgruppe, die Signale für 13 weitere Protonen hervor, davon sieben im Bereich zwischen $\delta = 1.3$ und 2.5, vier mit Verschiebungen von $\delta = 3.3$ bis 4.0 und je eines bei $\delta = 5.84$ bzw. 6.91. Die beiden Letzteren zeigten durch eine Kopplungskonstante von 15 Hz das Vorhandensein einer *trans*-Doppelbindung an.

Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind elf Signale zu erkennen. Auch hier zeigt die Verschiebung zweier Signale ($\delta = 122.5$ und 147.5) eine Doppelbindung im Molekül auf. Außerdem ist zu erkennen, dass drei Kohlenstoffatome neben Sauerstoffatomen liegen müssten ($\delta = 72.7$, 74.29, 81.6). Aus der molaren Masse und den bereits beschriebenen N-MRSignalen lässt sich die Summenformel $C_{11}H_{18}O_4$ ableiten. Diese impliziert zwei Doppelbindungsequivalente, was wiederum neben der schon bekannten Doppelbindung einen Ring als Strukturelement erfordert. Ein phasensensitives HSQC-NMR-Experiment gab Sicherheit darüber, dass neben der einen Methylgruppe vier Methylen- und fünf Methingruppen vorlagen. Schon anhand der

^3J-Kopplungskonstanten und des COSY-NMR-Spektrums konnte die folgende Konnektivität (Abbildung 24) dieser Gruppen festgestellt werden.

Anhand eines HMBC-NMR-Spektrums ergab sich die Struktur eines 2,4-substituierten Tetrahydrofurans. Die endgültige Struktur stimmte mit der von Communiol B (**31**) überein.

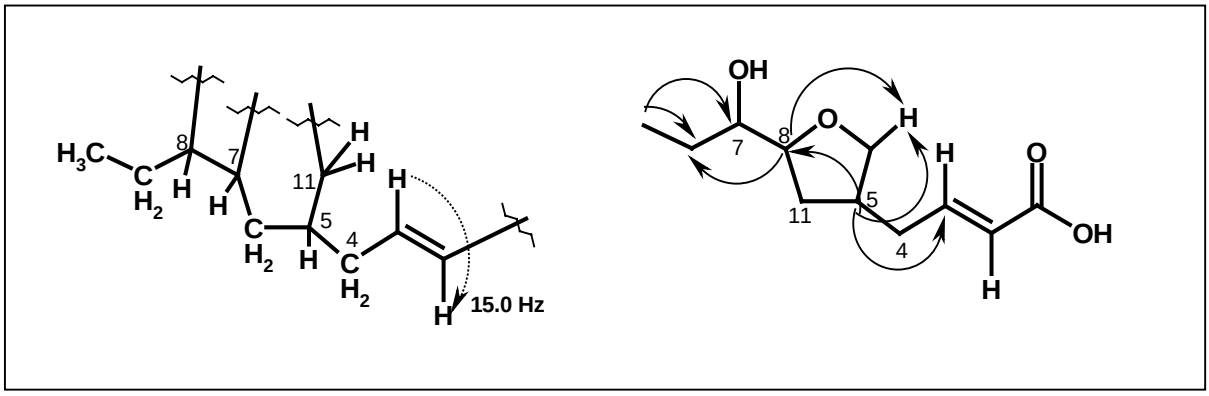


Abbildung 24: Aus ^3J- und COSY-^{1}H-^{1}H-Korrelationen abzuleitendes Fragment (links) und HMBC-Korrelationen im isolierten Communiol B (**31**).

Im Communiol B liegen drei Stereozentren (C-5, C-8, C-7) vor, deren Stereochemie bereits mehrfach diskutiert wurde. CHE ET AL. hatten aus NOESY-NMR-Daten und den Mosher-Derivaten eine (8*S*)-Konfiguration und anhand der mit der Born-Regel[71] gedeuteten ^{13}C-NMR-Daten die *threo*- Konfiguration der Communiole A-C abgeleitet.[72]

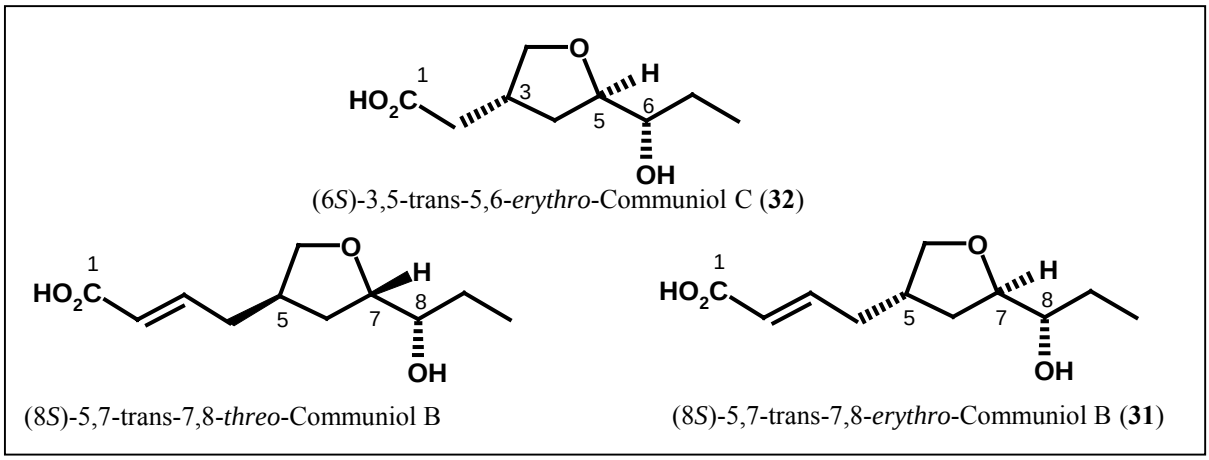


Abbildung 25: Stereochemie von Communiol C (**32**) und Communiol B (**31**); links:alt, rechts: neu.

KUWAHARA und ENOMOTO synthetisierten zunächst diese Form des Communiol C. Die deutlichen Abweichungen der ^{1}H-NMR-Daten des Syntheseprodukts von denen des Naturstoffs zeigten jedoch, dass die Born-Regel zwar für 2,5-disubstituierte Furane anwendbar ist, aber bei den selteneren 2,4-disubstituierten versagt. Als Konsequenz hieraus

synthetisierten KUWAHARA und ENOMOTO auch das 3,5-trans-5,6-*erythro* konfigurierte Communiol C und konnten durch Vergleich der NMR-Daten und Drehwerte mit denen des Naturstoffs diese Konfiguration für das natürliche **31** festlegen (Abbildung 25). Analog wurden dann die Communiole A und B synthetisiert und charakterisiert.[73] Dies gelang im gleichen Jahr auch MURGA ET AL., wobei die Zuordnung der Stereochemie noch einmal bestätigt wurde.[74]

Um die genaue Stereochemie des aus Kornati 1b erhaltenen Communiol B zu klären, reichte also der Vergleich der NMR-Daten und die Bestimmung des Drehwerts. Dieser war stark von der Konzentration an **31** abhängig, wie es bei Säuren häufiger aufgrund von Aggregationen der Fall ist.[75] Das bot allerdings die Möglichkeit die in den unterschiedlichen Veröffentlichungen beschriebenen Drehwerte abhängig von der Konzentration zu reproduzieren. Da das gelang und der Vergleich der NMR-Daten stimmig war, ist für das erhaltene **31** ebenfalls die (8*S*)-5,7-trans-7,8-*erythro*-Konfiguration anzunehmen.
Die meisten natürlich vorkommenden zweifach substituierten Tetrahydrofurane sind aus Pflanzen isoliert worden. Wenige sind aber auch aus Pilzen bekannt, darunter das Aureonitol (**33**), welches neben den entsprechenden Communiolen eines der seltenen 2,4-Substituierten Tetrahydrofurane in der Natur repräsentiert.[72] **33** ist auch der nahste Strukturverwandte der Communiole. Aus Fütterungsexperimenten ist bekannt, dass Aureonitol aus Acetat aufgebaut wird und im Laufe der Biosynthese einer Decarboxylierung sowie einer Epoxidierung mit anschließender Umlagerung unterliegt.[76] Eine analoge Biosynthese kann für das Communiol B formuliert werden und ist in Abbildung 26 dargestellt. Eigene Biosyntheseuntersuchungen scheiterten an der Tatsache, dass Kornati 1b nicht zum Wachstum in Schüttelkulturen animiert werden konnte. Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorläufern in Ruhekulturen sind wegen des langsamen Wachstums des Pilzes nicht angezeigt, da mit übermäßigen Scrambling zu rechnen ist.

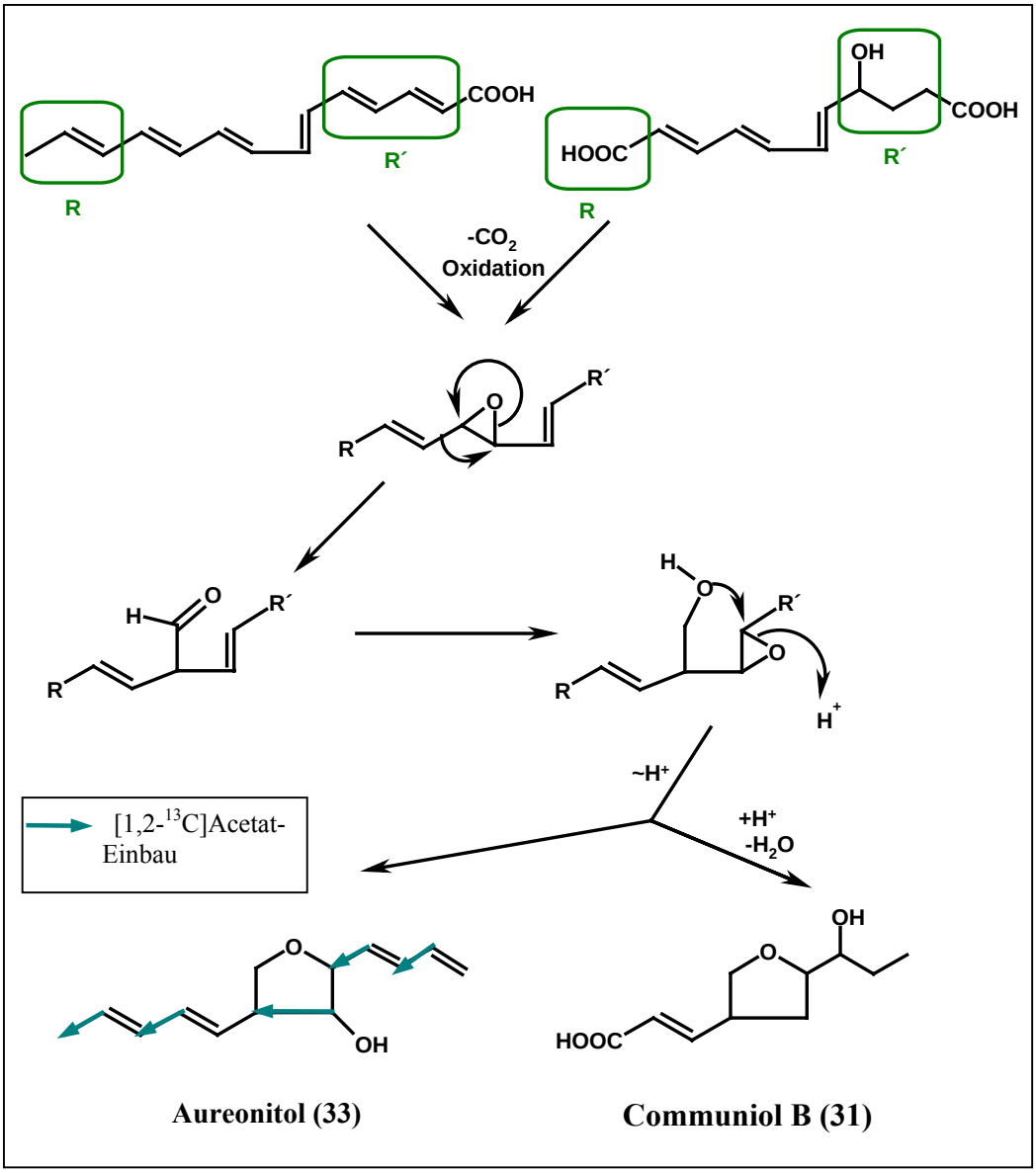


Abbildung 26: Biosynthese von Aureonitol (**33**) und (hypothetisch) Communiol B (**31**).

Bisher war die biologische Wirkung von Communiol B auf *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* (200 µg/disc) beschrieben, während keine Wirkung auf *Candida albicans* im selben Essay erkennbar gewesen war.[72] Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Plattendiffusionstests (15 µg/disc) offenbarten jedoch gänzlich gegensätzliche Eigenschaften. So war weder bei *Bacillus subtilis* noch bei *Staphylococcus aureus* ein Hemmhof zu erkennen, wohingegen eine mittlere Hemmung von *Candida albicans* auftrat. Eine hemmende Wirkung auf *Erichia coli* blieb aus. Im Mikrotest der BASF AG zeigte Communiol B eine schwache Aktivität gegen *Septoria tritici*, den Erreger der Blattdürre des Weizens. Communiol B wird außerdem auf die Hemmung von Biofilmbildung durch Blockierung des Quorum Sensing im Rahmen der Dissertation von M. QUITSCHAU[77] von

W. STREIT getestet. Die Ergebnisse stehen noch aus. Die entsprechende Wirkung ist bereits von mehreren substituierten Furanonen bekannt.[78]

3.1.5 Cerebrosid C (34) *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 3a)

Der Mycelextrakt aus 2 L SGG-Medium vom Stamm Kornati 3a wurde an Kieselgel fraktioniert (Gradient: Dichlormethan/Methanol 9:1 zu 3:1) und eine der erhaltenen Fraktionen an Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Dadurch ließen sich 9.4 mg (4.7 mg/L) **34** als farbloses Öl erhalten.

Ein hochaufgelöstes ESI-MS-Spektrum der Substanz führte zur Summenformel $C_{43}H_{79}NO_7$. Das ^{1}H-NMR-Spektrum war durch das intensive Signal von 36 Methylenprotonen bestimmt. Ebenso signifikant sind die Signale von insgesamt elf Protonen, die aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung an sauerstoffsubstituierte Kohlenstoffatome gebunden sein müssen (δ = 3.2 – 4.5). Außerdem fielen fünf olefinische Protonensignale auf (δ = 5.1 – 5.9). Das ^{13}C-NMR-Spektrum ist ebenfalls durch die für längere aliphatische Ketten typische Signalhäufung zwischen δ = 29 und 35 gekennzeichnet. Des weiteren fielen sechs Signale auf, die von olefinischen Kohlenstoffatomen stammen (δ = 125 –136). Ein Signal bei δ = 104.7 deutet auf das anomere Kohlenstoffatom eines Zuckers hin. Aus den Informationen der von **34** aufgenommenen 2D-NMR-Spektren ließen sich zwei Strukturelemente sicher ableiten, die sich mit dem aus Datenbankrecherchen anhand der Summenformel erhaltenen Strukturvorschlag Cerebrosid C (**34**) gut vereinbaren ließen.

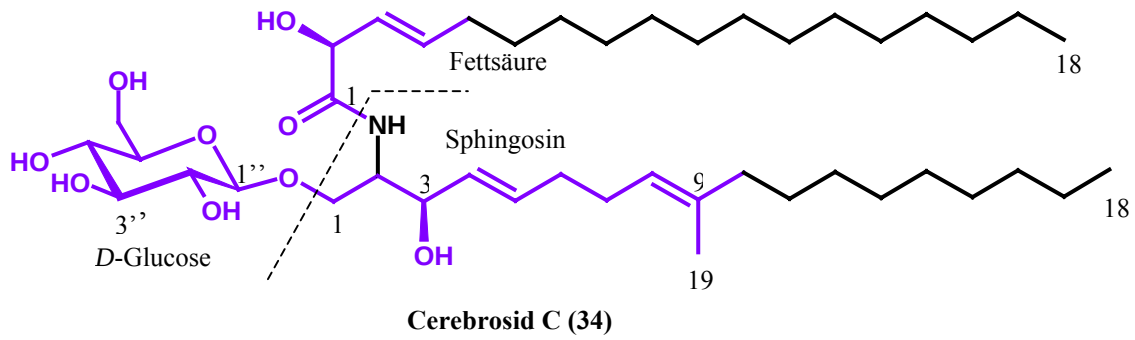


Abbildung 27: Struktur von Cerebrosid C (**34**), violett: aus 2D-NMR-Spektren abzuleitende Strukturfragmente.

Die Strukturklasse der Cerebroside umfasst Glycolipide, die aus einer Fettsäure, Sphingosin und einer Zuckereinheit, entweder *D*-Galactose oder wie hier *D*-Glucose, aufgebaut sind. Sie

sind ein typischer Bestandteil der Plasmamembran eukaryotischer Zellen und somit ein Produkt des Primärstoffwechsels. Allerdings zeigte sich, dass die Sphingolipide und ihre Metaboliten auch wichtige Bestandteile verschiedener Signaltransduktionswege sind und dabei nicht nur als intrazelluläre Secondmessanger, sondern auch als extrazellulärer Mediator fungieren.[79] Zum Beispiel kann Cerebrosid C, sowie andere Cerebroside, bei dem Pilz *Schizophyllum commune* die Ausbildung von Fruchtkörpern induzieren. Die Ausbildung von Fruchtkörpern gilt als Modellsystem für die Zelldifferenzierung. Für diese Wirkung unerlässlich zeigte sich die *N*-Acylsphingolid-Gruppe, sowie die verzweigte Methylgruppe im Sphingosin.[80]

Außerdem ist bekannt, dass die Cerebroside A-C die Bildung von Phytoalexinen und PR-(pathogenesis related)-Proteinen sowie den hypersensitiven Zelltod induziert. Damit löst es die zelluläre Antwort der Pflanze, also den Abwehrmechanismus, auf den Befall mit entsprechenden Erregern aus.[79]

3.1.6 Sekundärmetabolite aus *Alternaria* sp. (Stamm Kornati 3c)

Verschiedene Vertreter der allergenen[56] Alternaria Spezies werden häufig auf landwirtschaftlichen Produkten wie Silage, Weizen, Tabak und vielen Obst und Gemüsesorten gefunden. Über die Hälfte der bisher isolierten Stämme produzieren mehrere toxische Substanzen, die sich in ihrer Wirkung synergistisch verstärken.[81] Es wird davon ausgegangen dass diese sogenannten Alternariatoxine drei strukturellen Klassen zuzuordnen sind: Tetramsäuren, Dibenzo[a]pyrone, und Perylenchinone.[82]

Aufgrund der weiten Verbreitung in den für Menschen elementaren Rohstoffen, wurden schon viele HPLC-basierte Methoden entwickelt um die Kontamination verschiedener Produkte zu überwachen.[83,84]

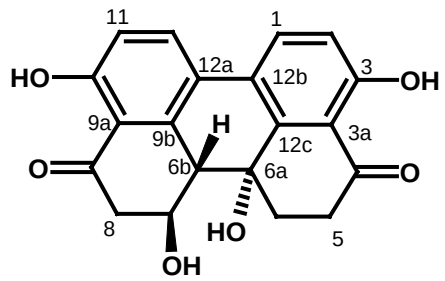
3.1.7 Altertoxin I (35)

Die Mycelextrakte der SGG- und G20-Kulturen wiesen im Dünnschichtchromatogramm keine signifikanten Unterschiede auf und wurden vereinigt. Nach Fraktionierung an Kieselgel (Gradient: Dichlormethan/Methanol 1:0 → 98:2 → 3:1) und zweimaliger Aufreinigung an Sephadex LH20 (Methanol) lagen 5.8 mg eines amorphen, orangefarbenen Feststoffs als Reinsubstanz vor. Dies entspricht einer Ausbeute von 1.5 mg/L.

Ein EI-MS-Spektrum lieferte eine molare Masse von 352 g/mol. Ein Abgleich des Fragmentierungsmusters mit der internen Datenbank lieferte drei Treffer, unter ihnen

Altertoxin I (**35**). Das in d_6-Aceton gemessene ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz zeigte Resonanzen von 16 Protonen. Deutlich erkennbar waren die Signale zweier phenolischer OH-Gruppen bei δ = 12.41 und 12.77 und vier aromatischer Protonen (δ = 8.01, 7.95, 7.01 und 6.91). Letztere spalteten jeweils zum Dublett mit ^3J = 8.5 und 9.0 Hz auf. Durch die große Signalbreite waren den Signalen bei δ = 4.65 und 4.41 OH-Gruppen zuzuordnen. Bei etwas niedrigerem Feld erschien die Resonanz eines Protons, das sich in der Nachbarschaft von Sauerstoff befinden musste. Im Bereich von δ = 2.44 bis 3.18 fanden sich die Signale von sieben weiteren aliphatischen Protonen. Die hohen Kopplungskonstanten (J = 17 Hz), die sich in diesen Signalen widerspiegeln deuten auf zwei Methylengruppen neben stereogenen Zentren hin. Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind 20 Signale zu erkennen, von denen sich zwei aufgrund ihrer starken Tieffeldverschiebung (δ = 206.8 und 204.7) Ketogruppen zuordnen lassen. Deutlich stechen auch zwei Signale hervor, die den schon erwähnten Phenolgruppen zugehörig sind (δ = 162.3 und 162.8). Dass zehn weitere aromatische Kohlenstoffatome dem Spektrum zu entnehmen waren, führte zu der Annahme, dass zwei Benzolringe die Struktur von **35** kennzeichnen. Von den sechs verbleibenden Resonanzen aliphatischer C-Atome tragen offensichtlich zwei eine Hydroxygruppe (δ = 69.5 und 66.3). Aus diesen Annahmen ergibt sich die Summenformel $C_{20}H_{16}O_6$, die mit der von Altertoxin I (**35**) übereinstimmt. Auch der Vergleich der NMR-Daten mit Literaturdaten stützt die Vermutung, dass es sich bei **35** um Altertoxin I handelt. 2D-NMR-Spektren bestätigten dies und auch der gemessene Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$ = +238° steht in Einklang mit Literaturdaten.[85]

Altertoxin I (**35**) wird auch als 5,6-Dihydroalterperylenol bezeichnet und ist ein aus *Alternaria* sp. häufig isolierter Metabolit. **35** wird als pflanzenpathogen und antifungisch wirksam beschrieben.[86] Außerdem weist es eine nicht unerhebliche Toxizität gegenüber Säugetieren auf (LD_{50}(Maus) = 200 mg/kg).[87] Es wirkt zudem mutagen,[85] fötotoxisch und teratogen.[88]



Altertoxin I (35)

Altertoxin I wird biosynthetisch aus zwei Pentaketideinheiten aufgebaut. Analog zur Melaninbiosynthese (s. A 5.3), werden diese in zwei 1,8-Dihydroxynaphtalineinheiten überführt, welche dann oxidativ gekuppelt werden (Abbildung 28). Weitere Oxidationen führen zu **35**. Dieser Mechanismus beruht auf

Biosyntheseexperimenten mit [2-^{13}C]Acetat und der Isolierung einiger Zwischenprodukte sowie weiterer Perylenchinone.[118]

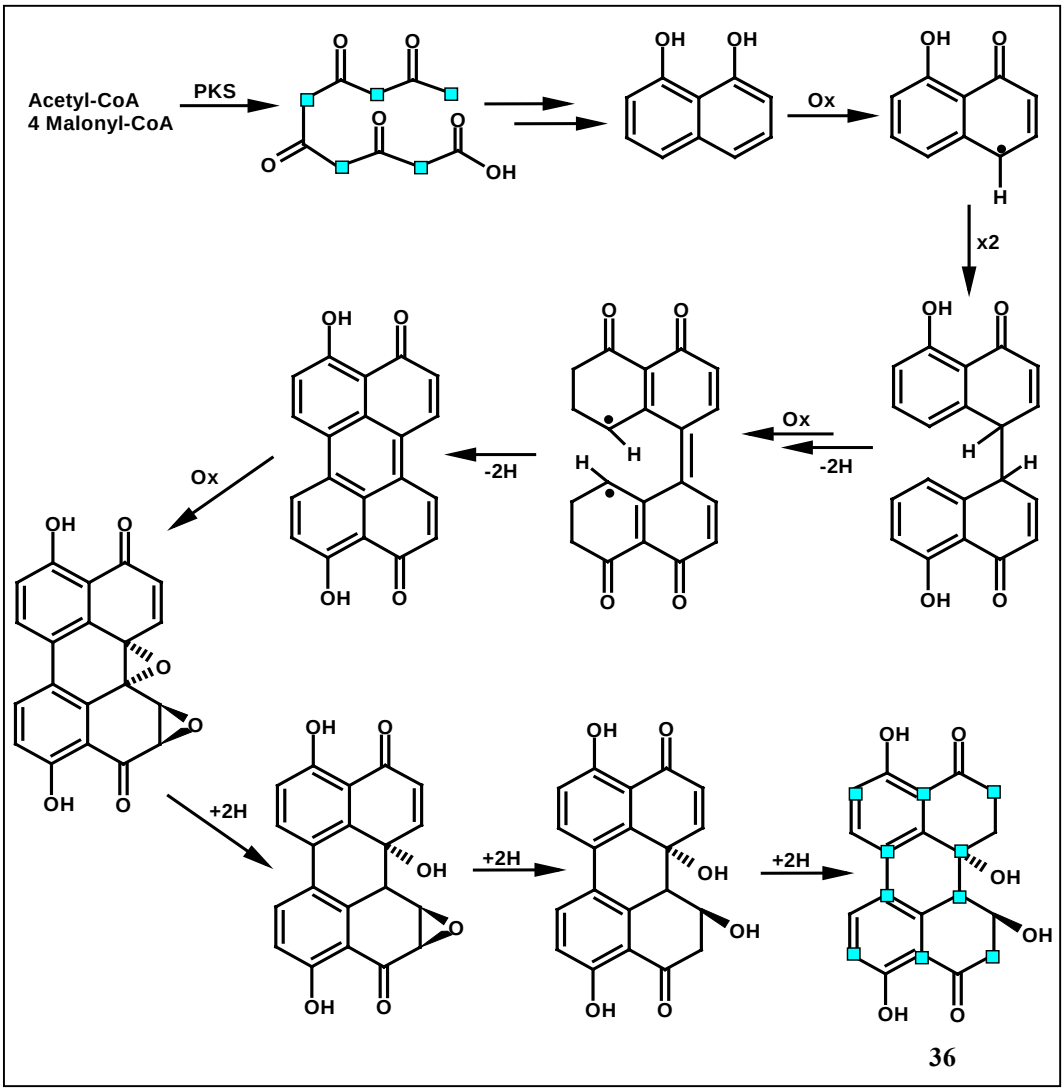


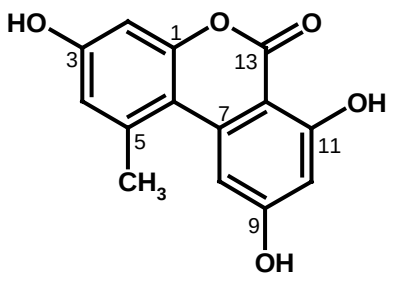
Abbildung 28: Biosynthese des Perylenchinons Altertoxin I (**35**), ■ Markierung aus [2-^{13}C]Acetat.

3.1.8 Alternariol (36)

Wie in 3.1.7 beschrieben waren die vereinigten Mycelextrakte aus den Medien SGG und G20 an Kieselgel chromatographiert worden. Eine weitere der dabei erhaltenen Fraktionen erfuhr eine Trennung an Sephadex LH20 (MeOH), woraus 14 mg eines farblosen, amorphen Feststoffs hervorgingen. Dies entspricht einer Ausbeute von 3.5 mg/L.

Ein EI-MS-Spektrum lieferte den Molekülionenpeak mit $m/z = 258$ und ein Fragmentierungsmuster, welches im Abgleich mit der internen Datenbank unter anderem mit dem von Alternariol (**36**) identisch war. Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigte Signale von vier

aromatischen Protonen, die durch ihre Aufspaltung zum Dublett (J = 2 Hz) implizierten, dass koppelnde Protonen jeweils nur in meta-Position zu finden sind. Des weiteren war die Resonanz einer Methylgruppe bei δ = 2.73 ppm zu erkennen. Deren Verschiebung und eine entsprechende COSY-NMR-Korrelation zeigten an, dass die Methylgruppe an einen Aromaten gebunden ist. Das ^{13}C-NMR-Spektrum enthielt Signale von 14 Kohlenstoffatomen, davon 12 aromatische, eine Methylgruppe und ein Carboxyl-C-Atom. Diese Daten standen in guter Übereinstimmung zu der Struktur von Alternariol. 2D-NMR-Daten sicherten diese Vermutung ab.



Alternariol (36)

Auch Alternariol ist ein aus *Alternaria* sp. häufig isolierter Naturstoff. **36** wirkt phytotoxisch sowie antifungisch aufgrund einer Interkalation mit der DNA.[89] Die akut letale Toxizität in Tests mit Mäusen ergab einen LD_{50}Wert von 400 mg/kg. Signifikanter ist der mutagene Charakter der Verbindung. Insbesondere ist hier die Entstehung von Speiseröhrenkrebs durch Lebensmittelkontamination zu nennen, wie sie in der chinesischen Region Linxiang auffällig geworden war.[90]

Leicht zu erkennen ist, dass bei **36** ein Heptaketid vorliegt. Zunächst wurde nach der Synthese der Polyketidkette die Aromatisierung in einem Schritt formuliert. Spätere Untersuchungen mit isotopenmarkierten Vorläufern zeigten jedoch, dass Norlichexanthon (**37**) ein Zwischenprodukt der Alternariolbiosynthese sein muss. Dies setzt voraus, dass das Xanthon einer oxidativen Spaltung mit anschließender kontrollierter Rotation und erneuter Ringknüpfung unterliegt (Abbildung 29).[91] Eine solche Umlagerung ist z.B. auch aus der Aflatoxinbiosynthese bekannt.[66]

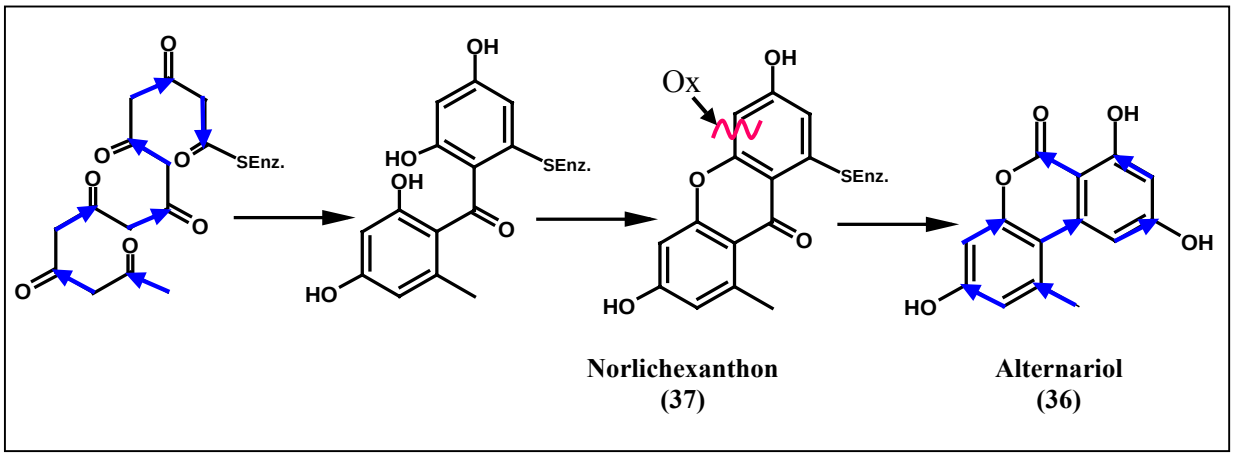
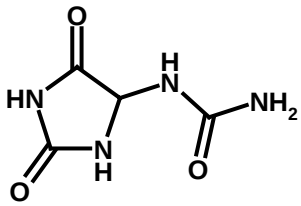


Abbildung 29: Biosynthese des Alternariols (**36**), → Einbau von [1,2-$^{13}C_2$]Acetat.

3.1.9 Allantoin (38)

Aus den an Kieselgel chromatographierten vereinigten Mycelextrakten stammte eine weitere Fraktion, welche zunächst an Sephadex LH20 (MeOH) und dann an Flash-Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 7:1) chromatographiert wurde. Hieraus ging ein Substanzgemisch hervor, welches durch Umkristallisation in CH_2Cl_2 23.1 mg (5.8 mg/L) farblosen, kristallinen Feststoff lieferte.



Ein EI-MS-Spektrum von **38** lieferte den Molekülionenpeak mit *m/z* = 158. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum gingen die Signale von sechs Protonen hervor, ein Singulett der relativen Intensität 2 bei δ = 3.33 zwei Dubletts (δ = 5.23 und 7.09), ein weiteres Singulett bei δ = 8.02 und ein breites Signal bei δ = 10.5. Aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum sind vier Kohlenstoffatome zu entnehmen, davon drei Carbonylresonanzen (δ = 156.6, 157.4, 173.4). Das verbleibende Kohlenstoffatom weist eine Verschiebung von δ = 62.3 ppm auf. Unter der Annahme, dass die Struktur C_4H_6 und drei Carbonylgruppen enthält, wurde eine Datenbankrecherche[61,62] durchgeführt. Diese lieferte die Struktur von Allantonin (**38**), die sich durch COSY- und HSQC-NMR-Spektren bestätigen ließ.

Allantoin geht aus dem Purinkatabolismus[92] hervor, und ist vor allem aus dem Pflanzenstoffwechsel bekannt, aber in allen biologischen Systemen (außer Primaten) zu finden. Es wird verbreitet in der Kosmetikindustrie in Hautcremes z.B. zur Beschleunigung der Wundheilung (gesteigerte Proliferation) eingesetzt und wirkt außerdem leicht antiinflammatorisch.[93]

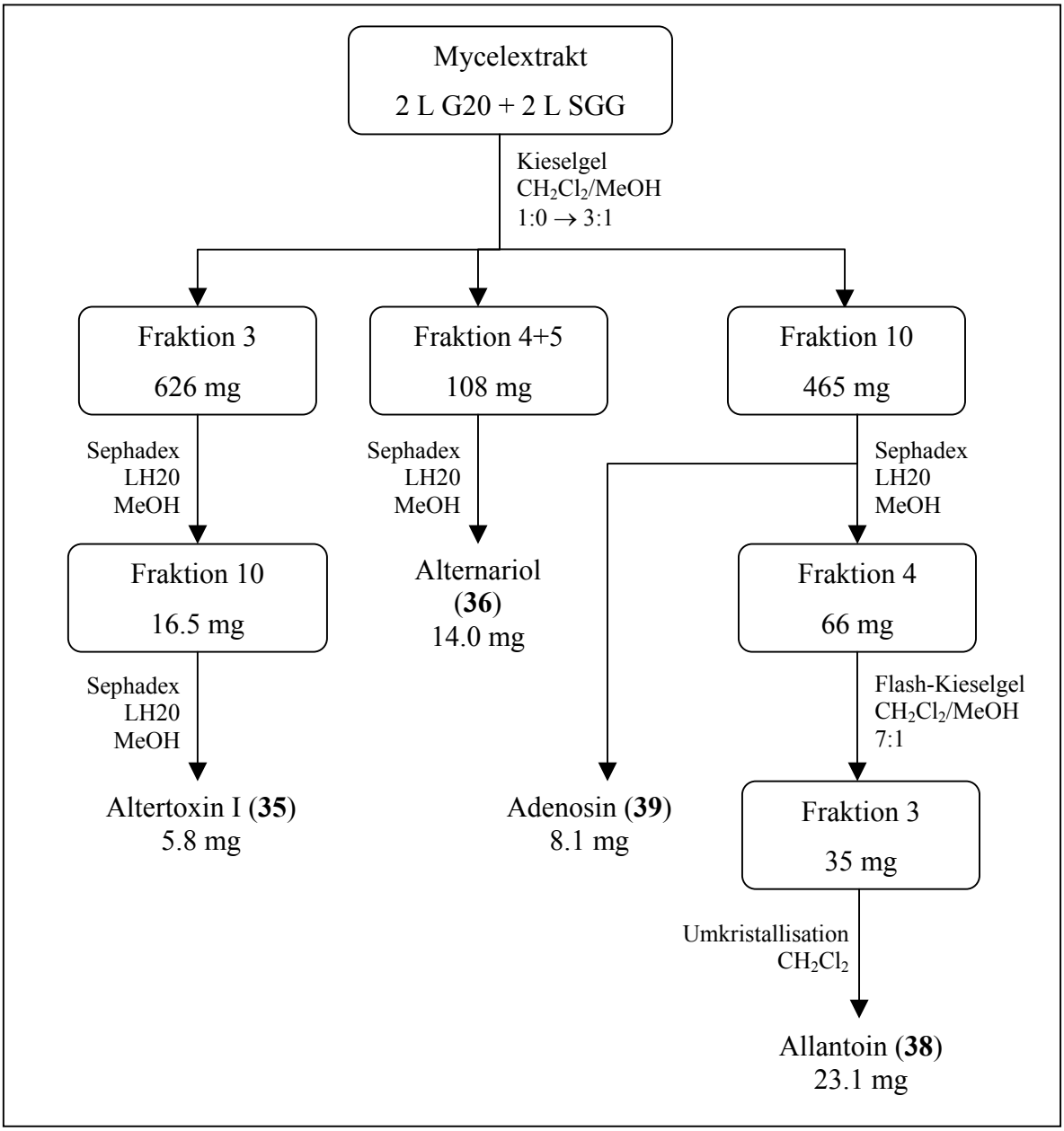


Abbildung 30: Isolierungsschema für die aus *Alternaria* sp. Kornati 3a isolierten Metabolite.

3.1.10 Diskussion

Trotz intensiver Bearbeitung ließ sich entgegen allen Erwartungen aus den *Epicoccum purpurascens* Stämmen sowie *Nodulosporium* sp. Kornati 1b jeweils nur ein Metabolit isolieren. Die Vielfalt der im chemischen Screening sichtbaren produzierten Sekundärstoffe war unterschätzt worden, und stand offensichtlich in keinem Verhältnis zur Menge der jeweilig produzierten Substanzen. *Alternaria* sp. Kornati 3c hingegen lieferte drei Metabolite in passablen Ausbeuten (s. Tabelle 5). Diese sind jedoch für das Metabolitenspektrum der

Alternaria Spezies bekannt. *Chaetomium* sp. Kornati 2a wurde aufgrund der mangelnden Attraktivität im chemischen Screening nicht bearbeitet.

Tabelle 5: Aus den Kornati-Stämmen isolierte Metaboliten.

Stammbezeichnung	Metaboliten	Ausbeute [mg/L]
Kornati 1a	Acetosellin (**25**)	3.7
Kornati 1b	Communiol B (**31**)	7.0
Kornati 2a	n.b.	
Kornati 3a	Cerebrosid C (**34**)	4.7
Kornati 3c	Altertoxin I (**35**) Alternariol (**36**) Allantoin (**38**)	1.5 3.5 5.8

3.2 Pilzstamm aus Algen von Gozo

Der von O. SCHLÖRKE[118] isolierte endophytische Pilz Gozo 14, war bereits einem intensiven chemischen Screening unterzogen und ebenfalls in das BMBF-Verbundprojekt integriert worden. Der Stamm war sowohl im Chemischen, als auch im Biologischen Screening durch Metabolitenvielfalt bzw. biologische Wirkung aufgefallen.

Tabelle 6: Einordnung des endophytischen Pilzstamms Gozo 14.

Stamm	Taxonomie	Biolog. Aktivität (Mikrotest BASF)	Chemisches Screening
Gozo 14	*Aspergillus flavus*	PYRIOR	potent variabel

3.3 Aflatoxine aus *Aspergillus flavus* (Stamm Gozo 14)

3.3.1 Sterigmatocystin (40)

Aspergillus flavus ist weltweit in Luft und Boden verbreitet. Dieser Pilz wächst hauptsächlich auf fett- und stärkehaltigen Samen, wie zum Beispiel Erdnüssen, Pistazien und Getreide.

Der aus 2 L Ruhekulturen des Stammes Gozo 14 in SGG-Medium durch Extraktion mit Aceton im Ultraschallbad erhaltene Mycelextrakt wurde an Kieselgel ($CHCl_3$/Methanol 9:1) fraktioniert. Darauf folgte eine Trennung an Sephadex LH20 ($CHCl_3$), die 8.2 mg (4.1 mg/L) eines gelben Feststoffs hervorbrachte.

Dieser zeigte im ESI-MS-Spektrum eine molare Masse von 324 g/mol. Durch Hochauflösung ergab sich die Summenformel $C_{18}H_{12}O_6$. Im ^{1}H-NMR-Spektrum fielen das Signal einer chelatisierten OH Gruppe mit δ = 13.20 und das einer Methoxygruppe auf. Außerdem fanden sich vier Signale aromatischer Protonen, von denen drei durch das Kopplungsmuster einen 1,2,3-trisubstituierten Aromaten implizierten. Weiterhin konnte aus den Signalen auf eine Kette von vier Methingruppen geschlossen werden, deren letzten zwei Protonen an einer cis-Doppelbindung liegen (J = 2.5 Hz). Dem ^{13}C-NMR-Spektrum konnten im sp^2-Zentrenbereich die Signale von 14 Kohlenstoffatomen entnommen werden. Des weiteren findet sich das Signal einer Carbonylfunktion (δ = 181.2) und das der schon beschriebenen Methoxygruppe. Die Datenbanksuche[61,62] unter Berücksichtigung dieser Strukturelemente und der Summenformel ergab Sterigmatocystin (**40**) als einzigen Treffer, der sich Anhand von 2D-NMR-Spektren bestätigen ließ.

Sterigmatocystin ist ein Biosynthese-Vorläufer von Aflatoxin B1 (**41**). Dem komplexen Biosyntheseweg folgend (s. Abbildung 31) entsteht aus einem Decaketid-Vorläufer das Averantin (**42**). Durch Ringschlüsse im aliphatischen Molekülteil entsteht Averufin (**43**) aus dem durch Umlagerung und Ringspaltung Versiconal (**44**) hervorgeht. Im Laufe des Aufbaus von Aflatoxin B_1 kommt es neben weiteren Ringspaltungen und Umlagerungen zwei mal zu einer oxidativen Spaltung mit gefolgter kontrollierter Rotation, wie sie auch für die Biosynthese des Alternariols (**36**) beschrieben ist (s. A 3.1.8).[94]

Sterigmatocystin weist weitestgehend die gleiche biologische Wirkung wie Aflatoxin B_1 (**41**) auf. Es ist teratogen, stark carzinogen und hepatotoxisch. Die akut letale Toxizität in Mäusen wird mit LD_{50} = 800 mg/kg beschrieben.[95]

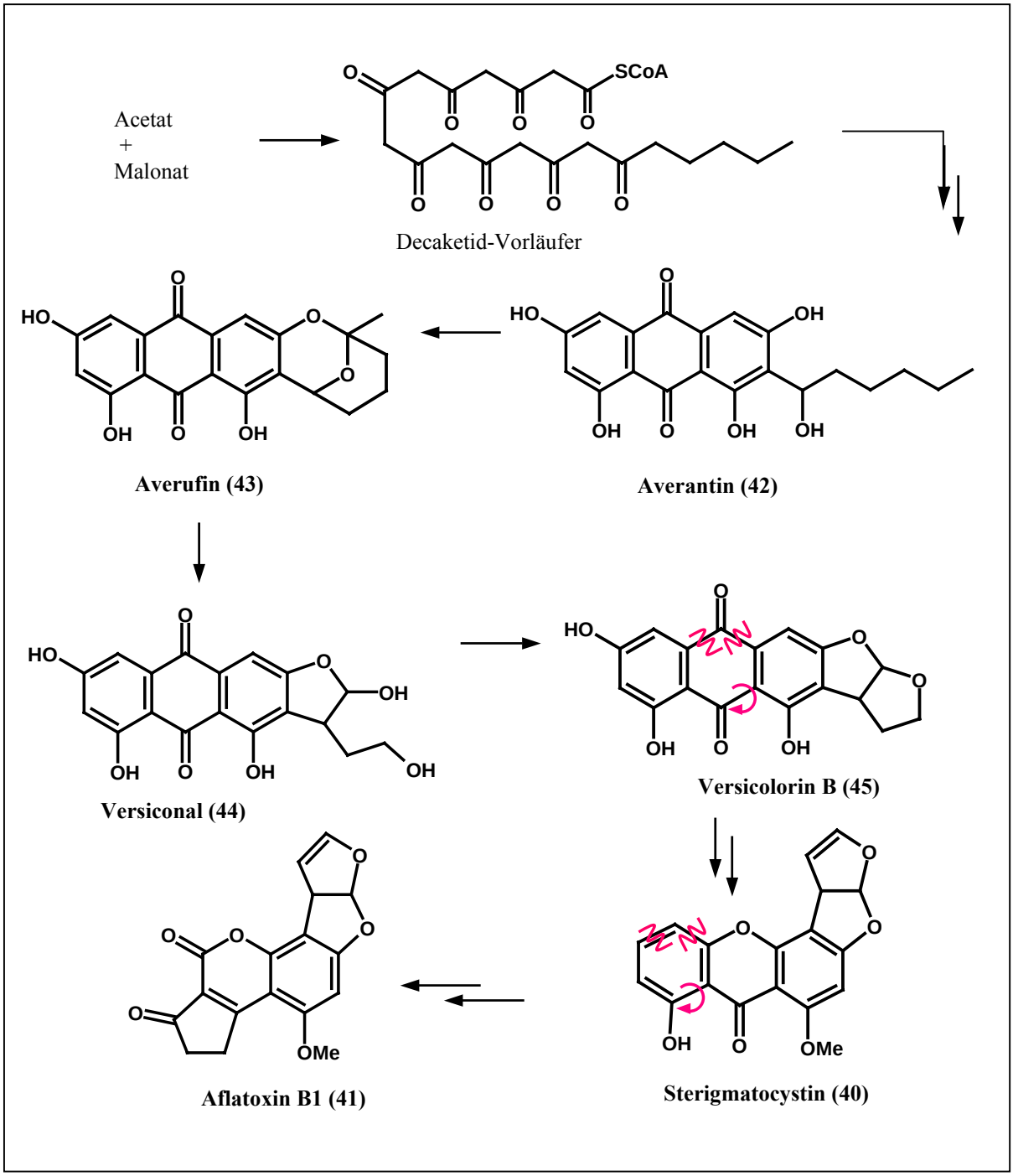
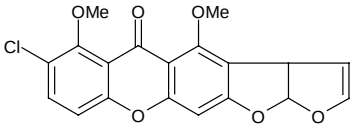
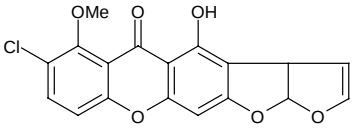
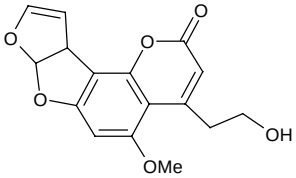
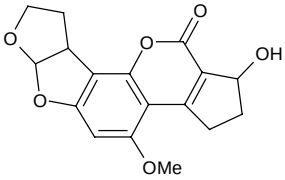


Abbildung 31: Biosyntheseweg von Aflatoxin B1 (**41**).

3.3.2 HPLC-DAD-MS-Untersuchung auf Aflatoxine

Aufgrund der Toxizität von Sterigmatocystin (**40**) wurde von weiteren Isolierungsarbeiten abgesehen. Die bereits erzeugten Extrakte wurden allerdings mittels HPLC-DAD-MS auf weitere Aflatoxine und Biosynthesezwischenstufen untersucht. Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 7: Aflatoxinfamilie aus Gozo 14.

Metabolit	Masse [g/mol]	Ionenpeak	Reten-tionszeit [min]	UV(max) [nm]	Lit: UV(max) [nm]
Sterigmatocystin (40)	324	329 $[M-H_2O+Na]^+$	20.8	228, 324	233, 246, 325
Austocystin A (46) 	372	377 $[M-H_2O+Na]^+$	13.7	224, 320	247, 335
4-O-Desmethyl-Austocystin (47) 	358	363 $[M-H_2O+Na]^+$	16.0	244, 316	-
Aflatoxin B_3 (48) 	302	325 $[M+Na]^+$	26.63	244, 328	253, 326
Aflatoxicol (49) 	314	337 $[M+Na]^+$	13.0	252, 316, 344	253, 330

4 Glaukothalin (50)

4.1 *Rheinheimera baltica* (Stamm HP1)

Bei dem Stamm HP1 handelt es sich um einen Vertreter der neuen Gruppe *Rheinheimera baltica*, die zu den γ-Proteobakterien gehört und zunächst aufgrund ihrer Farbe *Curacaobacter* benannt worden war, dann aber zu Ehren von G. RHEINHEIMER umbenannt wurde.[96] Der Stamm konnte von der Oberfläche von Diatomeenaggregaten aus der Nordsee (Nähe Neuharlingersiel) isoliert werden. Die Neuartigkeit dieser marinen Gattung bewiesen umfangreiche 16S-rRNA-Untersuchungen, die von H. P. GROSSART durchgeführt wurden. Der Stamm HP1 war in einem Kommunikationsscreening aufgefallen.[97] Ein solches Screening bietet schnelle Hinweise darauf, ob ein Stamm funktionelle Sekundärstoffe bildet. Es fallen dabei Veränderungen im Metabolitenspektrum auf, die erst durch die Anwesenheit eines anderen Bakteriums induziert werden, oder die Veränderungen im Phänotyp des cokultivierten Bakteriums bewirken.

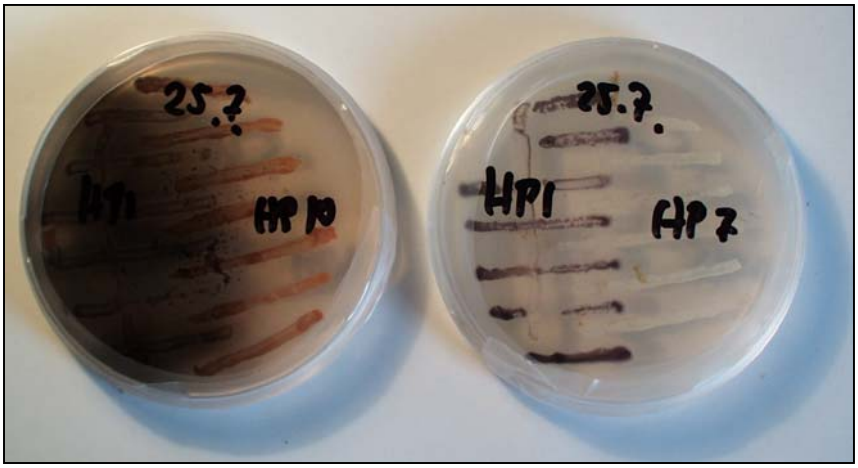


Abbildung 32: Wechselwirkung HP1 mit HP10 (l.) bzw. HP7 (r.).

Das Kommunikationsscreening erfolgte auf Agarplatten. Hierbei wurde der Stamm HP1 auf einer Agarplatte zusammen mit den Stämmen HP7 bzw. HP10 in der in Abbildung 32 dargestellten Weise ausgestrichen. Die Anwesenheit von HP7 verminderte das Wachstum von HP1, während HP10 nicht nur das Wachstum von HP1 förderte, sondern auch die Produktion eines blauen Farbstoffs steigerte. Entsprechende Versuche in Flüssigkultur zeigten allerdings keinen vergleichbaren Effekt. Der auffällige blaue Farbstoff wurde von M. THORWEST[97] erstmals isoliert und erhielt den Namen Glaukothalin (gr: *glaukos* = leuchtend blau, *thalassa* = Meer). Es handelt sich um einen lediglich in Pyridin und sehr mäßig in Chloroform

löslichen, unpolaren (R_f-Wert von 0.34 in Chloroform) Naturstoff. Diese Eigenschaften und die intensive Farbe führten zu der Vermutung, dass es sich um einen Metallkomplex handeln könnte. Atomabsorptionsspektroskopische Untersuchungen und verschiedene Versuche mit Chelatoren zeigten aber keine Metalle an. Auch konnten chinoide und indigoide Strukturen ausgeschlossen werden, da das UV-Spektrum des Glaukothalins nur eine geringe pH-abhängikeit zeigte.

Die Strukturaufklärung von M. THORWEST führte zu folgendem Strukturvorschlag, welchem die aus DCI- und HR-EI-Spektroskopie erhaltene Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$, UV- und IR-spektroskopische Daten sowie ^{1}H-, ^{13}C-, ^{1}H/^{1}H-COSY-, HSQC- und HMBC-NMR-Spektren zugrunde lagen.

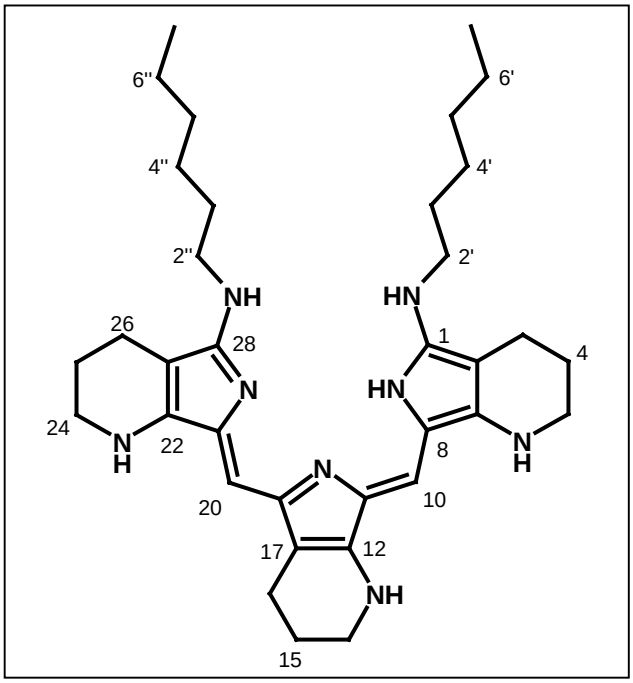


Abbildung 33: Strukturvorschlag für Glaukothalin von M. THORWEST.[97]

Dieser Strukturvorschlag war jedoch keineswegs validiert, da vor allem die NMR-Spektren nicht genügend Hinweise lieferten. Erschwert wurden diese Analysen, da als einziges Lösungsmittel für die NMR-Spektren d_5-Pyridin in Frage kam und keine Ausweichmöglichkeiten bestanden. Die Löslichkeit ist auch in Pyridin beschränkt (ca. 1.5 mg in 0.1 mL), sodass auch die Spektrenqualität als solche begrenzt ist.

So waren zum Beispiel im ^{13}C-NMR-Spektrum nur 11 Signale und eine nicht differenzierbare Signalhäufung bei $\delta = 29.8$ und 30.0 zu erkennen. Die vorgeschlagene, weitgehend symmetrische Struktur versucht dem gerecht zu werden. Gleichwohl ist auch für diese Struktur zu erwarten, dass mindestens minimale Unterschiede z.B. zwischen den Signalen von

C-1 und C-28 erkennbar sein sollten. Auf jeden Fall sollte aber die chemische Umgebung von C-21 und C-18 hinreichend verschieden sein, um unterscheidbare Signale hervorzurufen. Das Spektrum hingegen zeigt für die Kohlenstoffatome lediglich einen scharfen Peak. Um solche Widersprüche zu klären sollte zunächst mehr Substanz produziert werden, um dann mit Hilfe weiterer Techniken zur Strukturaufklärung Licht ins Dunkel zu bringen.

4.2 Optimierung der Ausbeute

Es stellte sich also als erstes die Aufgabe die Kultivierung des Stammes HP1 zu optimieren. Bisher stammte der gesamte Substanzvorrat aus einer einzigen Fermentation in Flüssigkultur im 50-L-Maßstab und betrug 3 mg, was einer Ausbeute von 0.06 mg/L entspricht. Systematisch wurden nun Kultivierungsbedingungen und Aufarbeitungsmethoden entwickelt, um die Ausbeute zu steigern.

4.2.1 Stammhaltung und Kultivierung

Schon bei der Stammhaltung von HP1 konnte eine deutliche Abhängigkeit von Wachstum und Glaukothalinproduktion vom verwendeten Medium beobachtet werden. Hatte M. THORWEST in seinen Arbeiten MB 2216 Agar verwendet, so wurden nun neue Abimpfungen von HP1 auf mit Seewasser hergestelltem LB-Agar mit Arginin-Supplementierung erhalten.* Da Seewasser zur Herstellung von Nährmedien teuer ist, wurde versucht mit Leitungswasser zu arbeiten. Ein Wachstum des Stammes konnte allerdings auf diesem normalen LB-Medium auch mit Argininzusatz nicht beobachtet werden. Deshalb wurde in Anlehnung an die Inhaltsstoffe des bisher von M. THORWEST verwendeten MB-Mediums die Variation LB^{++} entwickelt, die durch Zusatz verschiedener Salze dem marinen Ursprung des Stammes gerecht werden sollte (s. B 1.3).

MB 2216 und LB^{++} Medien bildeten die Grundlage für weitere Experimente zur Stammhaltung, wobei das Wachstum und die optisch quantifizierbare Blaufärbung der Kolonien als Kriterien zur Auswahl dienten. Die weiteren Variationen umfassten Veränderungen des Argininingehalts, des NaCl-Gehalts und der Kultivierungstemperatur. Mit Hinblick auf mögliche Biosynthesevorläufer des Glaukothalins wurde auch der Zusatz von Succinat getestet. Succinat ist ein Vorläufer der Porphyrine,[98] die eine gewisse Ähnlichkeit zu dem Strukturvorschlag des Glaukothalis zeigen.

---

* Mein Dank gilt an dieser Stelle H.-P. GROSSART, IGB-Berlin, für die Überlassung der HP-Stämme.

Da Pigmentbildung oftmals einen Schutz vor UV-Strahlung darstellen soll,[99] wurde außerdem der Einfluss von Tageslicht auf die Entwicklung der Kulturen untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche, in denen jeweils 0.5 L Agarkulturen bearbeitet wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Medium

→ Zunächst erschienen MB 2216 und LB^{++} gleichwertig, bei der Extraktion der Platten zeigte sich aber, dass der Farbstoff aus dem LB^{++} nicht zu extrahieren war.

Argininingehalt (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 g/L)

→ Eine deutliche Zunahme der Glaukothalin-Produktion war ab 2 g/L Arginin zu verzeichnen. Das Wachstum nahm mit steigendem Anteil der Aminosäure ab.

NaCl-konzentration in LB-Medium (0, 15, 20, 33 g/L)

→ Das Wachstum erschien bei 20 g/L optimal.

Temperatur (8, 15, RT, 28 °C)

→ Raumtemperatur ermöglichte gutes und schnelles Wachstum, während 8 °C eine tiefere Blaufärbung, dafür aber schlechteres Anwachsen der Kulturen bewirkte.

Succinatzugabe (2 bzw. 4 mg/L)

→ Der Einsatz von Succinat hatte keinerlei Effekt.

Tageslicht

→ Zwischen Kulturen, die bei Tageslicht wuchsen und denen, die im Dunklen herangezogen wurden, bestand kein merklicher Unterschied.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde MB 2216-Agar mit 4 g/L Arginin als Medium zur Stammhaltung gewählt. Die Kultivierung erfolgte über 7 d bei Raumtemperatur im Tageslicht.

Erste Versuche mit Schüttelkulturen in MB-Medium ergaben nur minimales Wachstum des Stammes. Um größere Mengen an Glaukothalin zu erhalten, wurde nun ein gezieltes Screening mit Flüssigkulturen (je zwei mal 100 mL) durchgeführt. Die Variationen umfassten

dabei Argininingehalt (2, 4, 6 g/L), Succinatzugabe (2, 4 g/L), Kultivierungsgefäß (300 mL Erlenmeyerkolben mit bzw. ohne Schikane), Schüttelfrequenz (180, 120 rpm) und Temperatur (15, 22, 28°C). Unter den genannten Bedingungen war das Wachstum des Stammes in keinem Fall zufriedenstellend.

Aus diesem Grund wurde zunächst auf die Extraktion von bewachsenen Agarplatten zurückgegriffen. Zur Vereinfachung wurden später wegen der größeren Oberläche kleine P-Kolben (0.5 L) mit Agar ausgegossen. Zur Beimpfung musste das Mycel in etwas sterilem Wasser aufgenommen und diese Suspension dann auf dem Agar verteilt werden.

Diese Experimente gaben den entscheidenden Hinweis, wie Fortschritte in der Kultivierung von HP1 erzielt werden konnten. Es zeigte sich, dass das Wachstum an den trockenen Stellen des Agars wesentlich besser war als an den stark benetzten. Es ließ sich schlussfolgern, dass bessere Ausbeuten und besseres Wachstum auf fester, möglichst trockener Oberfläche zu erzielen waren, obwohl es sich um einen Stamm marinen Ursprungs handelt.

Entprechend dieser Beobachtung wurde der Agaranteil im Stammhaltungsmedium um 5 g/L auf 25 g/L erhöht. Außerdem fand ein erneutes Screening in Schüttelkulturen (je 2 Kolben ohne Schikane à 100 mL MB2216, 120 rpm) mit Festkörperzusatz statt. Dabei wurden ohne Erfolg Seramis™, 8 g/L Agar und kleine Stücken Kieselgel-DC-Platte, und mit mäßigem Erfolg Aktivkohle, Seesand, Siedesteine und Filterpapier eingesetzt. Ein gutes Wachstum mit augenscheinlich zufriedenstellender Glaukothalinproduktion konnte jedoch durch die Verwendung von Zellstoff und Watte erzielt werden.

Im Folgenden wurden Flüssigkulturen in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Zusatz von ca. 20x20 cm Zellstoff (5 g) verwendet, da Watte meist Weichmacher enthält, die bei der Isolierung des Naturstoffs Probleme bereiten. Auch in dieser Variante wurde getestet, ob die Zugabe potentieller Biosynthesevorläufer Einfluss auf die Ausbeute hat. Dazu dienten je zwei 100 mL Kulturen mit Arginin, Asparagin und Succinat in den Konzentrationen 0.1, 0.2 und 0.4 g/L bzw. Glucose in der Konzentration 1 und 2 g/L. Im dünnschichtchromatographischen Vergleich der Extrakte zeigte sich, dass die Supplementierungen keine Auswirkungen hatten. Ebenfalls erfolglos blieb die entsprechende Kultivierung in 500 mL Kolben auf dem Querschüttler.

4.2.2 Isolierung

Zunächst wurden die Extraktionen von Flüssigkulturen nach der Vorgabe von M. THORWEST[97] mit Ethylacetat durchgeführt. Die ersten Agarplatten hingegen erfuhren eine Extraktion mit Aceton im Ultraschallbad. Beide Verfahrensweisen erbrachten keinen optimalen Auszug der Substanz, was angesichts der schlechten Löslichkeit des Glaukothalins zu erwarten war. Im Zuge der Kultivierungen mit Zellstoffzusatz lag das Gefriertrocknen der festen Bestandteile der Kulturbrühen nahe, was auch für Agarplatten eine praktikable Handhabung darstellt. Die Rückstände der Lyophilisation von beidem wurden mit Chloroform verrieben und im Ultraschallbad aufgeschlossen.
Im Laufe der verschiedenen Kultivierungsversuche stellte sich eine mehrfache Folge aus Verreiben, Extraktion mit Chloroform im Ultraschallbad und Filtration als geeignete Methode heraus, die produzierte Menge Farbstoff bestmöglich auszuschöpfen. Dadurch, dass später bei Agarplatten nur noch das Zellmaterial, zu erhalten durch einfaches Abschaben von der Oberfläche, extrahiert wurde, konnte das Verfahren noch einmal verbessert werden. Am Ende des beschriebenen Extraktionsverfahrens war das Zellmaterial nur noch blassgrau gefärbt, was auf eine vollständige Entfernung des Farbstoffs schließen lässt.

Die Aufreinigung erfolgte zunächst säulenchromatographisch über Kieselgel, was aber wegen der partiellen Adsorption von Glaukothalin auf dem Säulenmaterial nicht beibehalten wurde. Es zeigte sich, dass eine hinreichend lange Sephadex-LH20-Säule mit Chloroform als Laufmittel zur Isolierung des Farbstoffs aus dem Rohextrakt ausreichte.

Durch die optimierte Kultivierung mit Zellstoffzusatz, wie auch durch Kultivierung auf Agarplatten, und die entwickelte Isolierungsmethode konnte die Ausbeute an Glaukothalin um das Fünfzigfache auf bis zu 3 mg/L gesteigert werden.
Aus den verscheidenen Ansätzen dieser Kultivierungen konnten insgesammt etwa 20 mg Glaukothalin (**50**) als Reinsubstanz erhalten werden.

4.3 Charakterisierung

Neue EI und DCI-Massenspektren bestätigten zunächst die molekulare Masse von 584 g/mol, und auch die EI-Hochauflösung zeigte die zuvor publizierte Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$ an. (Δ = 0.97 ppm)

Das ^{1}H-NMR-Spektrum in d_5-Pyridin (50°C) zeigte eindeutige Signale dreier einzelner Protonen (δ = 13.13, 8.82, 6.98) drei Signale der Intensität 2 (δ = 3.39, 1.73, 1.37) und ein Signal der Intensität 3 (δ = 0.87). Außerdem war ein nicht genau definierbares Signal zwischen δ = 1.22 und 1.29 zu erkennen dessen relative Intensität in verschiedenen Spektren stark differierte. Hierfür wurden Werte zwischen 18 und 32 ermittelt, was vermutlich zum Teil auf Verunreinigungen aber auch auf Messungenauigkeiten, bedingt durch die großen Unterschiede zu den Integralwerten der Normierungssignale, zurückzuführen ist.

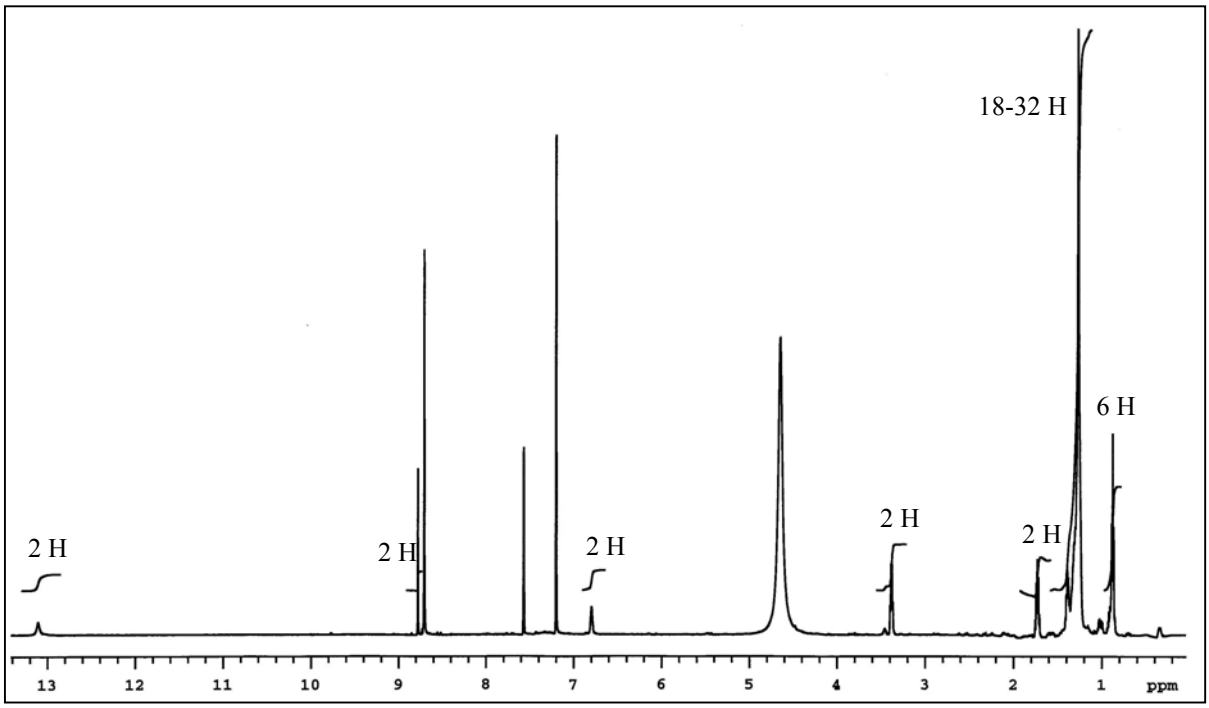


Abbildung 34: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von (**50**) in d_5-Pyridin.

Auch das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte unter Berücksichtigung der Summenformel, wie schon zuvor, erstaunlich wenig Signale. Neben Signalen von vier quartären C-Atomen (δ = 125.6, 137.2, 161.8, 167.1), einer Methingruppe (δ = 105.7), sechs Methylengruppen (δ = 22.9, 27.5, 28.8, 29.6, 29.7, 32.2, 43.6) und einer Methylgruppe (δ = 14.3) war die schon von M. THORWEST[97] beschriebene Signalhäufung zwischen δ = 29.9 und 30.0 zu erkennen. Die Integrale der Signale sprechen für fünf bis acht Methylengruppen.

Die Deutung der Spektren wurde weiterhin dadurch erschwert, dass vier der separaten und alle Signale der Häufung im HSQC-NMR-Spektrum Korrelationen zum ^{1}H-NMR-Signal bei δ = 1.2 zeigten. Eine Quantifizierung war also auch auf diesem Weg nicht exakt möglich.

Auch das HMBC-NMR-Spektrum bot mit wenigen einzelnen Korrelationen und den nicht differenzierbaren zum ^{1}H-NMR-Signal bei $\delta = 1.2$ wenig Aufschluss.

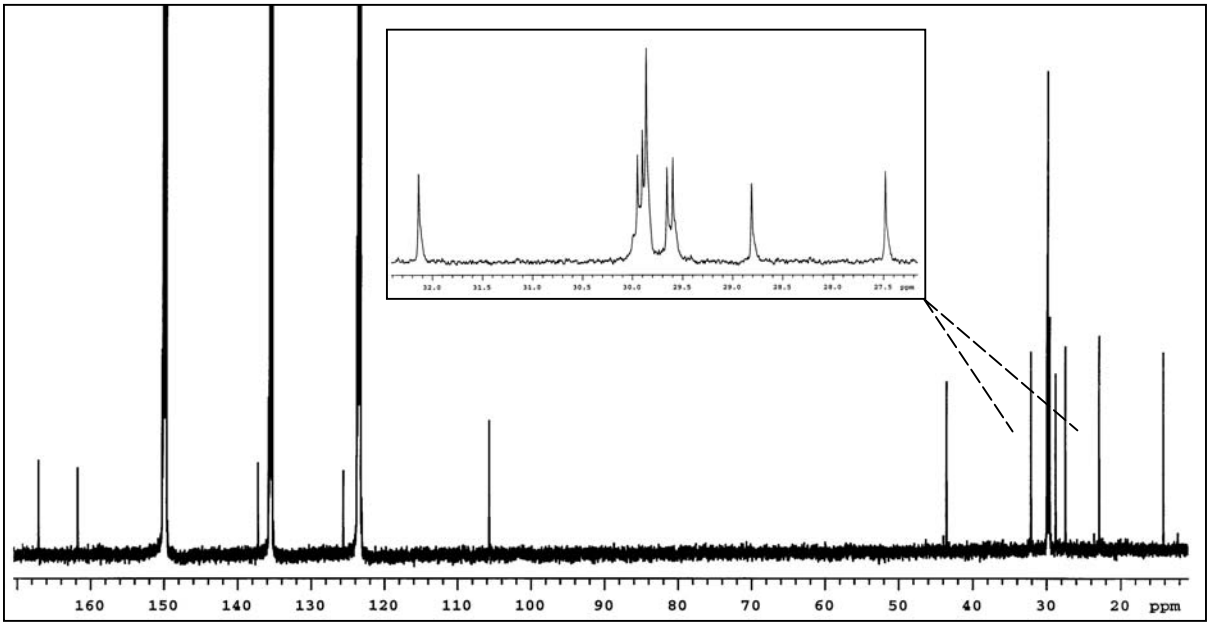


Abbildung 35: ^{13}C-NMR-Spektrum (600 MHz) in d_5-Pyridin.

Eine Verbesserung der Spektren konnte erreicht werden, indem mit $CDCl_3$ unter Zusatz von wenig d_1-TFA als Lösungsmittelsystem gearbeitet wurde. Die Löslichkeit ist hierbei mit ca. 3 mg/0.1 mL doppelt so hoch. Die ^{1}H-NMR-Signale bei $\delta = 13.80$ und 6.98 sind bei diesem Lösungsmittel nicht zu finden. Dies liegt daran, dass es sich dabei, wie anhand des HSQC-NMR-Spektrums bereits ermittelt, um austauschbare, hetreoatomgebundene Protonen handelt. Des Weiteren fällt auf, dass aus dem undeutlichen Signal bei $\delta = 1.25$ das Triplett einer Methylengruppe ($\delta = 1.38$) hervorgeht. Das Integral des großen Signals lässt sich auf ca. 32 H-Atome zurückführen.

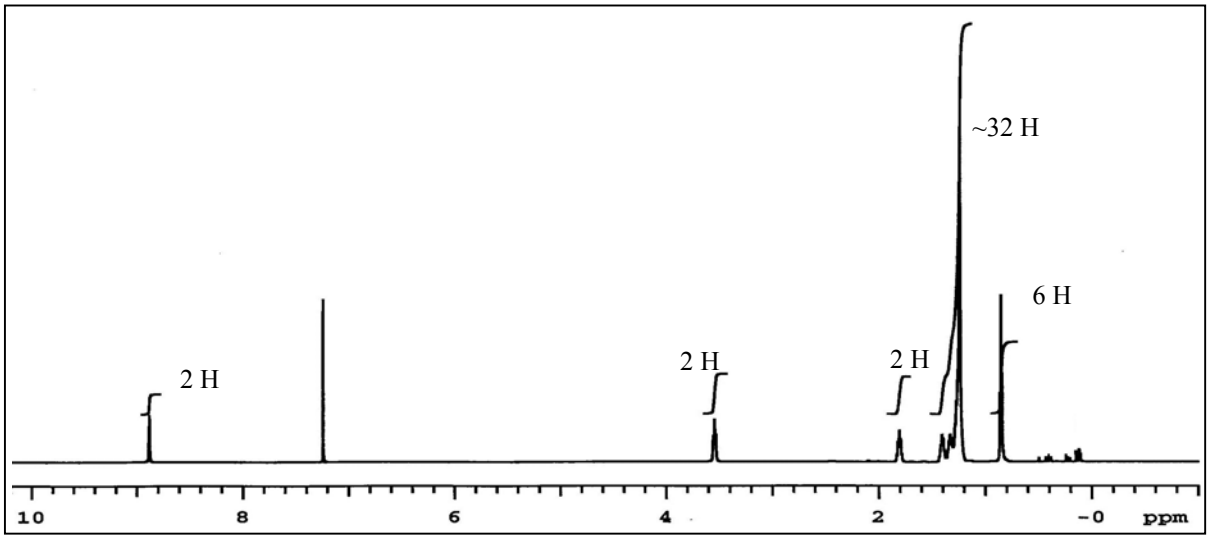


Abbildung 36: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) in $CDCl_3$+ d-TFA.

Unter diesen verbesserten Bedingungen wurden auch verschiedene 1D-TOCSYs aufgenommen (Einstrahlung auf $\delta = 1.41$, 1.81, 3.54 und 8.92) aus denen jedoch keine Erkenntnisse zu gewinnen waren.

Auch das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt zum Teil deutliche Verbesserungen. So sind innerhalb der vorher beschriebenen Signalhäufung bei $\delta = 29.9$ und 30.0 einzelne Signale auszumachen. Unter Berücksichtigung der Signalintensitäten ist festzustellen, dass es sich um sechs C-Atome handeln sollte. Dass hier ausschließlich Methylengruppen vorliegen, war aus dem phasensenitiven HSQC-NMR-Spektrum und einem ^{13}C-APT zu entnehmen.

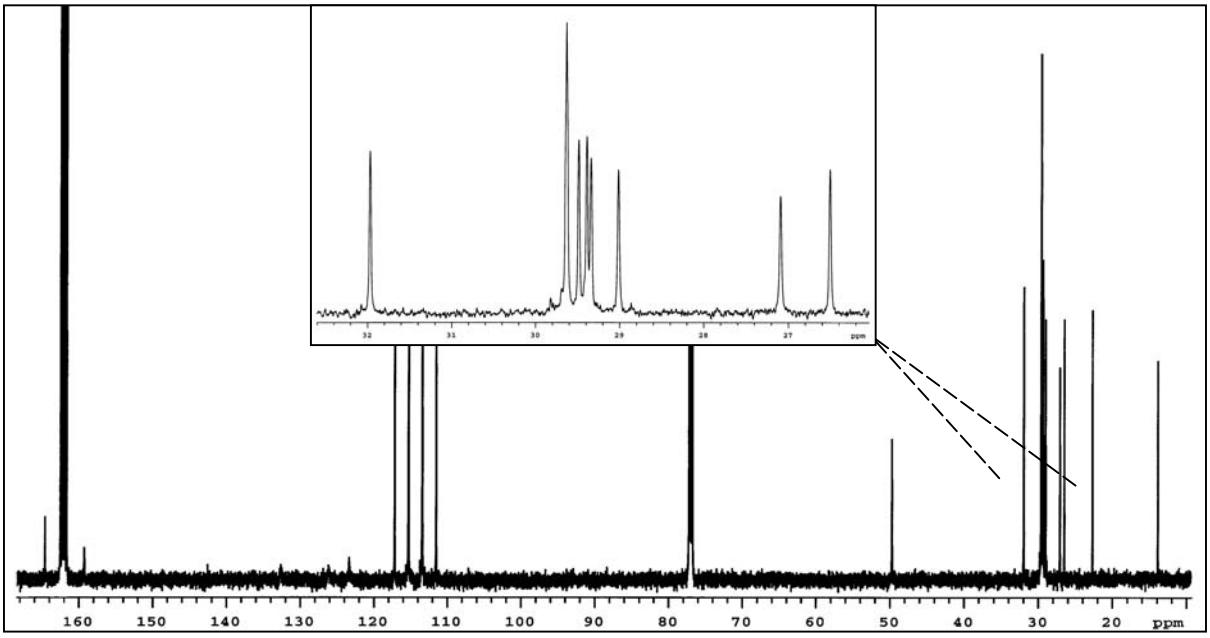


Abbildung 37: ^{13}C-NMR-Spektrum (600 MHz) in $CDCl_3$+ d-TFA.

Nachteilig an diesem Lösungsmittel ist, dass drei Signale zwischen $\delta = 120$ und 145 nicht gut zu erkennen sind. Auf die 2D-Korrelationsspektren hat dies aber kaum Auswirkungen.

Zunächst wurde die Strukturaufklärung anhand der zwei beschrieben NMR-Spektrensätze unter Annahme der Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$ betrieben. Anhand dieser Spektren konnte ein erstes Strukturelement, ein über ein sekundäres Stickstoffatom gebundener Pentylrest, sicher identifiziert werden. Dies steht im Widerspruch zur bisher postulierten Struktur des Glaukothalins, welche Hexylketten aufweist. Des Weiteren legten die scharfen ^{13}C-Signale nahe, dass es sich um eine perfekt symmetrische Struktur handelt, deren Komponenten (Pentylrest, Kerngerüst und ein weiterer aliphatischer Anteil mit sieben Kohlenstoffatomen) im Verhältnis 1:1:1 vorliegen sollten. Auch das widerspricht den bisherigen Vorstellungen zur Struktur des Farbstoffs.

Die vorliegenden NMR-Spektren und die erhaltene Summenformel ließen sich nicht in Einklang bringen. Aus diesem Grunde sollte die Zuhilfenahme weiterer Quellen neue Ansätze zur Strukturaufklärung bringen.

Analyse der Massenspektren

Zunächst wurden dazu von S. MEYER[ii] (Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven) ein hochaufgelöstes ESI-MS-Spektrum, sowie APCI-MS-Spektren mit verschiedenen gekoppelten Fragmentierungsversuchen aufgenommen. Das ESI-MS-Spektrum lieferte den $[M+Na]^+$-Molekülionenpeak mit $m/z = 607.420126$, der in den Versuchen in Göttingen nicht erhalten worden war. Die genauere Hochauflösung im ESI-Spektrum, verglichen mit dem Möglichkeiten eines HR-EI-Spektrums, versprach eine verlässlichere Summenformel. Neben $C_{35}H_{52}N_8$ lieferten Berechnungen innerhalb der Fehlergrenze von 2 ppm auch die Summenformel $C_{34}H_{56}N_4O_4$. In diesen Rechnungen wurden nun auch Co, Cu, Ni, Fe, und Iod berücksichtigt und konnten erneut ausgeschlossen werden. Die APCI-MS-Spektren lieferten einen $[M+H]^+$-Molekülionenpeak mit $m/z = 585.433$, welcher innerhalb der Fehlergrenze von 10 ppm sieben Summenformeln lieferte. $C_{35}H_{52}N_8$ war nicht darunter. Die Fragmentierungsversuche brachten von Messung zu Messung unterschiedliche Ergebnisse, in denen nur ein Fragment mit $m/z = 416.2389$ kontinuierlich nachzuweisen war. Hierfür ergaben sich zehn Summenformeln. Diese Summenformeln der Fragmente wurden von denen der berechneten Molekülionen abgezogen um mögliche Abspaltungen zu erfassen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgeneden Tabelle zusammengefasst.

Links senkrecht sind die möglichen Fragmente aufgezeigt, während oben waagerecht die aus dem APCI-MS-Spektrum abgeleiteten Molekülionen stehen. Wie in einem Koordinatensystem ergeben sich so innerhalb der Tabelle durch Subtraktion der Fragmente von den Molekülionen die möglichen Abspaltungen.

[ii] S. MEYER danke ich an dieser Stelle für die Aufnahme der Spektren.

Tabelle 8: Kombination der aus APCI-MS-MS erhaltenen Summenformeln und Fragmenten.

Fragment	**[M+H]$^+$**						
	$C_{24}H_{57}N_8O_8$	$C_{29}H_{57}N_6O_6$	$C_{31}H_{59}N_3O_3$	$C_{32}H_{55}N_7O_3$	$C_{34}H_{57}N_4O_4$	$C_{38}H_{55}N_3O_2$	$C_{40}H_{57}O_3$
$C_{12}H_{32}N_8O_8$	**$C_{12}H_{25}$**	--	--	--	--	--	--
$C_{17}H_{32}N_6O_6$	$C_7H_{25}N_2O_2$	**$C_{12}H_{25}$**	--	--	--	--	--
$C_{19}H_{34}N_3O_3$	$C_5H_{23}N_5O_5$	--	**$C_{12}H_{25}$**	--	--	--	--
$C_{20}H_{30}N_7O_3$	$C_4H_{27}NO_5$	--	--	**$C_{12}H_{25}$**	--	--	--
$C_{21}H_{36}O_8$	$C_3H_{21}N_8$	--	--	--	--	--	--
$C_{22}H_{32}N_4O_4$	$C_2H_{25}NO_4$	$C_7H_{25}N_2O_2$	--	--	**$C_{12}H_{25}$**	--	--
$C_{23}H_{28}N_8$	$CH_{19}O_8$	--	--	--	--	--	--
$C_{24}H_{34}NO_5$	$H_{23}N_7O_3$	$C_5H_{23}N_5O$	$C_7H_{25}N_2O_2$	--	--	--	--
$C_{28}H_{32}O_3$	--	$CH_{25}N_6O_3$	$C_3H_{27}N_3O_4$	$C_4H_{23}N_7$	$C_6H_{25}N_4O$	--	--
$C_{31}H_{30}N$	--	--	$H_{21}N_2O_7$	$CH_{25}N_6O_3$	$C_3H_{27}N_3O_4$	--	**$C_{12}H_{25}$**

Es fällt auf, dass außer $C_{12}H_{25}$ alle aus den jeweiligen Differenzen erhaltenen Fragmente ein undenkbares Verhältnis von Kohlenstoff zu Wasserstoff aufweisen. Somit ist sichergestellt, dass von jeder möglichen Summenformel zum beschriebenen Fragment eine Differenz von $C_{12}H_{25}$ besteht. Auch im Falle der Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$ bestätigt sich dies durch die Kombination mit dem Fragment $C_{23}H_{28}N_8$.

Neben der bisher postulierten Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$ kommt also aus der ESI-MS Hochauflösung auch $C_{34}H_{56}N_4O_4$ in Frage. Aus den APCI-Experimenten kann in jedem Falle auf das Vorhandensein einer aliphatischen, mindestens 12 Kohlenstoffatome umfassenden, Kette geschlossen werden.

Analyse der NMR-Spektren

Ebenfalls von S. MEYER wurden weitere NMR-Spektren aufgenommen. Aus den neuen ^{1}H-, ^{13}C-, COSY-, HSQC-, und HMBC-Spektren konnten jedoch keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden. Alle bisher erhaltenen Daten bestätigten sich jedoch. Auch ein 1,1-Adequate-Experiment, welches direkte Informationen über $^2J_{CH}$-Korrelationen liefert, zeigte keine weiteren Verknüpfungen auf. Wichtige Informationen lieferte jedoch ein ^{15}N-HMBC-NMR-Spektrum. Hieraus war ersichtlich, dass vermutlich lediglich zwei chemisch nicht equivalente Stickstoffatome vorliegen (δ = -168 und -82). Referenziert wurde hierbei auf die Signale des Pyridins.[100] Pyrrolstrukturen, deren Stickstoffatome in der Regel Signale zwischen δ = -190 und -275 erzeugen, sind somit für das Glaukothalingerüst nahezu

auszuschließen. Ein 1D-^{15}N-Spektrum zur genaueren Bestimmung der Verschiebungen aufzunehmen, war mit der in Lösung zu bringenden Substanzmenge nicht möglich.

Eine Zusammenfassung der NMR-Spektrendaten ist im Folgenden graphisch dargestellt.

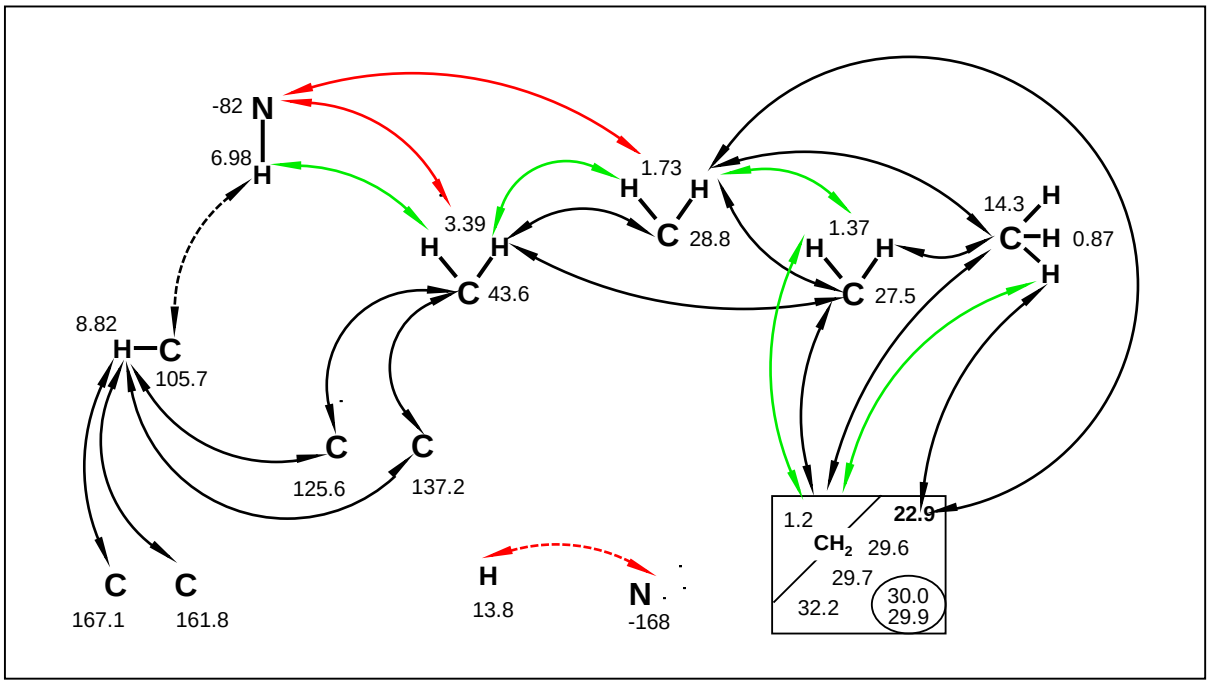


Abbildung 38: Zusammenfassung der NMR-Daten, → COSY-, → HMBC-, → ^{15}N-HMBC-Korrelationen in d_5-Pyridin.

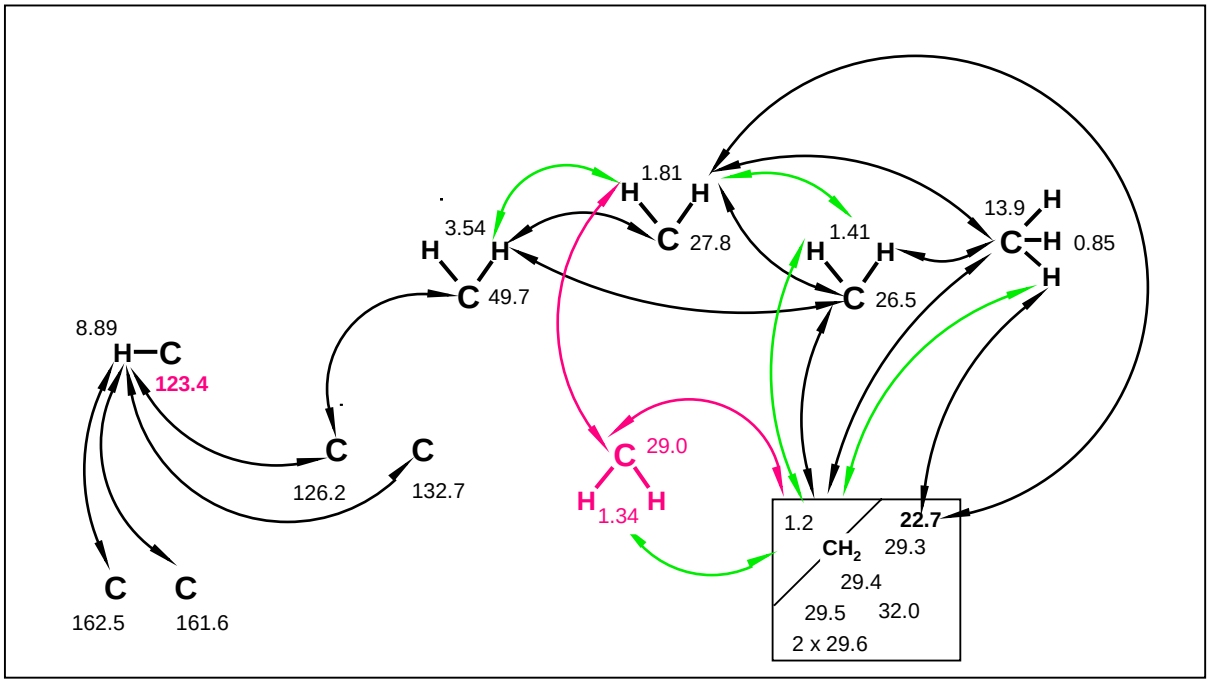


Abbildung 39 : Zusammenfassung der NMR-Daten, → COSY-, → HMBC-, → Neuerungen in $CDCl_3$+ d-TFA.

Neben dem bereits erwähnten Pentylaminrest ($C_5H_{12}N$) muss demnach ein Kerngerüst mit C_5H_2N und eine aliphatische Gruppe mit C_7H_{14}, deren Signale sich überschneiden, vorliegen. Werden diese gesicherten Strukturteile als Hälfte eines Dimers betrachtet so ergibt sich eine Summenformel von $C_{34}H_{56}N_4$. Folglich ist anzunehmen, dass die bisher als richtig angesehene Summenformel $C_{35}H_{52}N_8$ zu $C_{34}H_{56}N_4O_4$ korrigiert werden muss. Daraus ergeben sich 9 Doppelbindungsequivalente, die durch je vier in jeder Molekülhälfte und eine Verbrückung zum Dimer durch einen Ring oder eine Doppelbindung abgedeckt wären. Anhand des aus den APCI-MS-Spektren berechneten Fragments $C_{12}H_{25}$ kann auf eine intakte $C_{14}H_{28}$ Kette (2x C_7H_{14} s.o.) geschlossen werden, die unter den Ionisierungsbedingungen nach den verknüpfenden Methylengruppen abgespalten wird. Dieses spricht dafür, dass die zwei aromatischen Kerne des Dimers ringförmig über eine entsprechend lange Brücke verknüpft sind, welche das neunte Doppelbindungsequivalent darstellt. Für die vier Sauerstoffatome sind Estergruppen denkbar. Zunächst spricht die Verschiebung eines ^{13}C-NMR-Signals von $\delta = 167$ und eine IR-Bande bei 1668 cm^{-1} dafür. Außerdem ist vorstellbar, dass die Estergruppe über den Sauerstoff an den Kernaromaten gebunden ist. Dies würde die Verschiebung von $\delta_C = 161.8$ und das Fehlen von Protonensignalen um $\delta_H = 4$ erklären. Es wäre aber auch ein Lacton denkbar. Grundlegend lässt sich in jedem Falle das in Abbildung 40 dargestellte Konstrukt bilden, wobei die zwei Kreise als Platzhalter für das noch unbekannte Strukturelement des Kerns dienen.

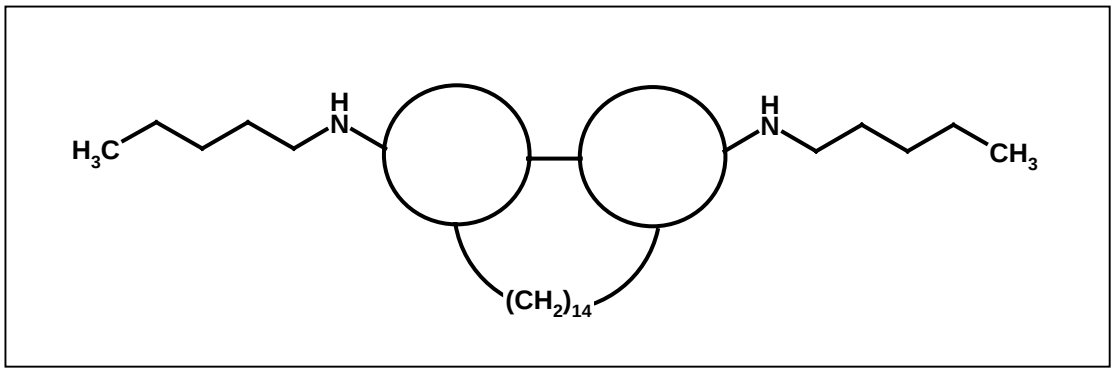


Abbildung 40: Grundgerüst der Struktur von Glaukothalin (**50**).

Mit den bisher herausgearbeiteten Strukturmerkmalen wurden verschiedene Zusammensetzungen des Kerngerüsts entworfen mit dem Ziel, diese anhand von Berechnungen mit ACD-Labs[101] qualitativ zu beurteilen. Die Konstruktion verschiedener Kerngerüste fand unter anderem mit Hilfe des Programms Web-COCON statt.[102] Hierbei können auf der Basis der Verschiebungen von ^{13}C-Signalen sowie der Korrelationen aus den 2D-NMR-Spektren alle denkbaren Konstitutionen errechnet werden.

Für die Berechnung mussten einige Adaptionen vorgenommen werden. Es schien sinnvoll, nur ein Monomer zu berechnen, um die Anzahl der möglichen Permutationen in Grenzen zu halten. Zu diesem Zweck wurde für die Verbindung zum zweiten Monomer ein Bromatom als Platzhalter eingegeben. Da keinerlei Korrelationen zwischen der C_{14}-Seitenkette und dem inneren Ring vorhanden waren und innerhalb dieser Seitenkette keine zu bestimmen waren, diente ebenfalls ein Bromatom als Ersatz für diese Kette.

Erste Berechnungen sollten lediglich die ^{13}C-Verschiebungen und die erhaltenen Korrelationen berücksichtigen. Grundlegende Einschränkungen waren hierbei der Ausschluss von Cyclopropyl- und Cyclobutaneinheiten. Für alle HMBC-Korrelationen sollten auch ^{4}J-Kopplungen verantwortlich sein können. Mit diesen Vorgaben ergaben sich durch Berechnung über 3800 mögliche Strukturen.

Da die Möglichkeit besteht, Bindungen zwischen Atomen als feststehend oder ausgeschlossen betrachten zu lassen, konnte weiter eingegrenzt werden. Für neue Berechnungen wurden hier sukzessive Einschränkungen gemacht, die jedoch nicht über das hinausgingen, was in Abbildung 40 dargestellt ist. Dadurch ließ sich allerdings keine wesentliche Reduzierung der Anzahl an Strukturvorschlägen erreichen.

In einer nächsten Reihe wurden die Atomtypen einiger Atome festgelegt. Für eines der Kohlenstoffatome mit der Verschiebung im Tieffeld von $\delta = 160$ galt ab jetzt die Definition eines Carbonyls. Für die restlichen schon als sp^2-Zentren identifizierten Kohlenstoffe wurde diese Definition nun festgeschrieben. Mit diesen Vorgaben reduzierte sich die Anzahl der Strukturvorschläge auf unter 600.

Ein wesentlicher Fortschritt war die Festlegung auf die Bindung zwischen dem Stickstoff des Pentylamins und einem der quartären Kohlenstoffatome ($\delta = 137.2$, d_5-Pyridin) und von diesem zum protonentragenden Kohlenstoffatom des Kerngerüsts. Anhand dieser Struktur ließe sich die schwach erkennbare Korrelation erklären, die in Abbildung 38 gestrichelt dargestellt ist. Außerdem könnte eine Protonierung des Stickstoffs durch den TFA-Zusatz die Hochfeldverschiebung der Signale der benachbarten Kohlenstoffatome in den Chloroformspektren begründen (s. Abbildung 39). Aus den Berechnungen dieser Reihe gingen 52 Strukturvorschläge hervor. Diejenigen, welche ein Keton beinhalteten, oder das, die C_{14}-Kette symbolisierende, Bromatom an Stickstoff oder Sauerstoff koppelten konnten wegen der unpassenden chemischen Verschiebungen direkt ausgeschlossen werden. Es blieben lediglich Fünfring- bzw. Siebenringkonstrukte übrig, die in sieben Typen einzuteilen waren.

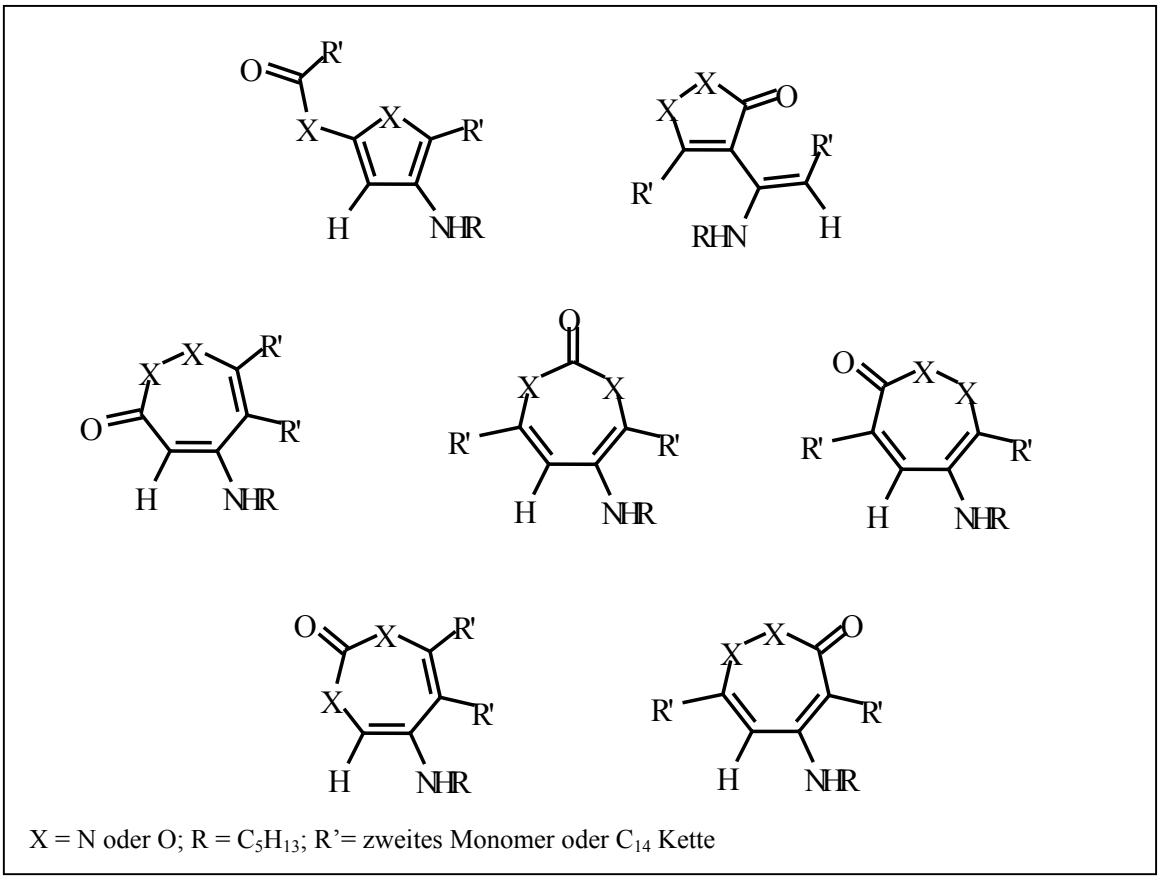


Abbildung 41: Mögliche Konstitutionen der Kernstruktur.

Die qualitative Beurteilung der Spektren mittels ACD-Labs offenbarte unter den 14 verbliebenen Strukturen einen klaren Favoriten.

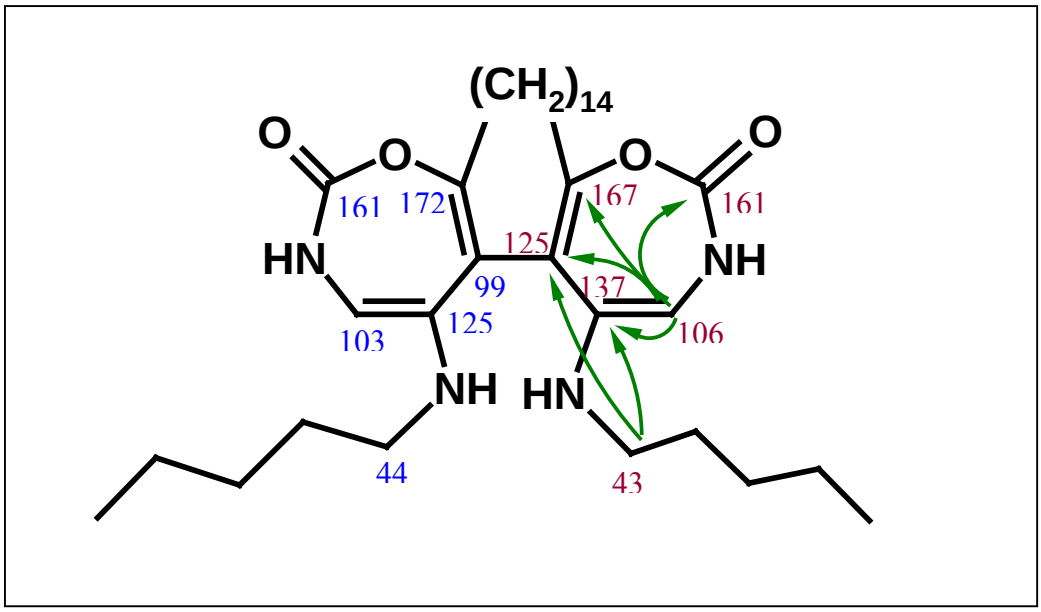


Abbildung 42: Strukturvorschlag für **50**; grün:HMBC-Korrelationen, chemische ^{13}C-Verschiebungen: blau = ACD-Labs-Vorhersage, rot = experimentell.

Bei der in Abbildung 42 dargestellten Struktur ergaben die Vorhersagen lediglich für das Kohlenstoffatom an der Verknüpfungsstelle der beiden inneren Ringe stärkere Abweichungen.

ACD-Labs arbeitet auf der Grundlage verschiedener bekannter Strukturen und deren chemischer Verschiebungen. Es wird eine Ähnlichkeit zu der chemischen Umgebung des einzelnen Kohlenstoffatoms festgestellt und aus diesen Vorschlägen gewichtet ein Wert für die chemische Verschiebung errechnet. Der Benutzer hat Zugriff auf die Strukturen, die dieser Berechnung zu Grunde liegen. Er kann durch Eliminierung weniger passender Strukturen aus der Berechnung die Zuverlässigkeit der Vorhersage für das zu berechnende Molekül optimieren. Für das oben erwähnte Kohlenstoffatom konnte auf diese Weise durch Auswahl von Strukturen, die vor allem das konjugierte System abdecken eine Verschiebung von bis zu $\delta = 140$ berechnet werden. Der dargestellte Strukturvorschlag kann somit, trotz der oben dargestellten Abweichung, die experimentellen Ergebnisse erklären.

Auch könnte die blaue Farbe durch ein derartig konjugiertes System hervorgerufen werden.

Ein Siebenring-Carbamat, wie das oben gezeigte, ist bisher nicht beschreiben. Die Biosynthesebausteine für diese Struktur sind nicht ohne weiteres zu erkennen. Aufgrund der schon beschriebenen Abhängigkeit der Glaukothalinproduktion von Arginin kann hier ein Zusammenhang vermutet werden. Die Seitenkette könnte zum Beispiel ihren Ursprung in Arginin haben.

4.4 Versuche zur Kristallisation

Mit Glaukothalin fanden verschiedenen Versuche zur Kristallisation statt, wobei die Möglichkeiten durch die schlechte Löslichkeit des Farbstoffs begrenzt waren.

Zunächst bot es sich an, eine Lösung einer Konzentration von ca. 10 mg/mL in Pyridin bzw. $CHCl_3$ für mehrere Wochen im Aromaröhrchen im Kühlschrank ruhig zu lagern. Als dies keinen Erfolg brachte, wurde in den Deckeln dieser Röhrchen eine Kanüle platziert, sodass ein langsamer Verdampfungsprozess einsetzte. Unter diesen Bedingungen bildete sich lediglich der amorpher Feststoff. Ein erneuter Versuch lief genauso ab, wobei den Lösungen ein Tropfen H_2O bzw. später TFA oder Tetrachlorethan zugesetzt wurde. Auch hierbei bildeten sich keine Kristalle. Auch der Zusatz von Weinsäure zeigte keinen Erfolg.

Ein Versuch in dem in DMSO suspendierter Farbstoff durch Erwärmen auf ca. 90 °C gelöst wurde, brachte auch beim langsamen Abkühlen im Dewar nicht den gewünschten Erfolg.

4.5 Chemische Derivatisierungen

Da die Struktur wegen fehlender HMBC-NMR-Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen nicht mit 100%iger Sicherheit bewiesen werden kann, sollten Derivate des Glaukothalins hergestellt werden. Neben einer besseren Ionisierbarkeit für weitere Massenspektren versprach dies die Löslichkeit zu erhöhen, um eventuell NMR-Spektren in anderen Lösungsmitteln aufnehmen zu können. Des Weiteren könnten Korrelationen neu eingeführter Gruppen weitere Hinweise auf die Konstitution des Farbstoffs geben. Mögliche Derivate könnten auch besser Kristallisieren und somit die Strukturaufklärung unterstützen.

4.5.1 Acetylierung mit Acetanhydrid

Zunächst wurden 0.8 mg (1.4 mmol) Glaukothalin, gelöst in 0.4 mL Pyridin, mit 0.3 mL Acetanhydrid für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Diese Methode bleib erfolglos, sodass eine Aktivierung des Naturstoffs notwendig schien. Hierzu diente eine Spatelspitze DMAP, die vor Zugabe des Acetanhydrids der Reaktionslösung zugeführt wurde. In diesem Versuch zeigte sich deutlich eine Farbänderung der Lösung zu Smaragdgrün. Obwohl das Dünnschichtchromatogramm des Rohprodukts keine Umsetzung zu einem Hauptprodukt, sondern viel mehr die Zersetzung der Substanz anzeigte, wurde ein HPLC-MS-Spektrum des Gemisches aufgenommen. Es traten jedoch lediglich Ionen kleiner Massen auf, sodass von der Zersetzung des Farbstoffs auszugehen war.

4.5.2 Alkylierung von Heteroatomen

Nachdem eine Methylierung der Heteroatome mit Diazomethan in $CHCl_3$ (s. B 4.6) erfolglos bleib, wurden zwei weitere Methoden ins Auge gefasst. Dafür kamen eine Methylierung nach Eschweiler-Clarke sowie eine Reduktion mit anschleißender Methylierung durch Methyliodid in Frage.

<u>Eschweiler-Clarke Alkylierung</u>

Die Methode nach Eschweiler-Clarke mit Formaldehyd und Ameisensäure wurde bisher erfolgreich bei verschiedenen primären Aminen (rein aliphatische oder z.B. benzylsubstituierte) eingesetzt.[103,104]

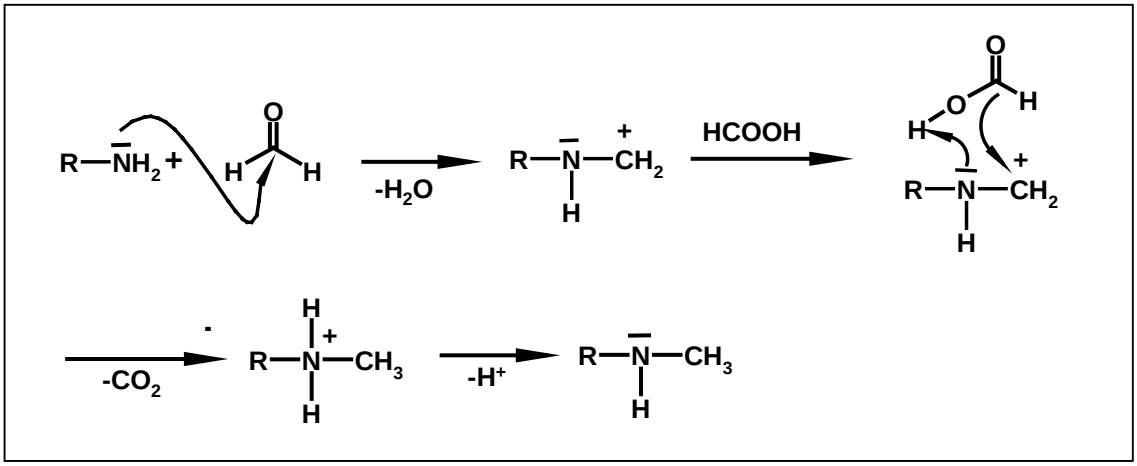


Abbildung 43: Mechanismus der Eschweiler-Clarke-Methylierung.

Um die Methoden zunächst zu testen bzw. zu optimieren, bot sich Tetrahydrochinolin als Vergleichssubstanz an, da wie im ersten Strukturvorschlag für Glaukothalin ein sekundäres Stickstoffatom in direkter Nachbarschaft zu einem aromatischen System vorliegt.

Die ursprüngliche Vorschrift sieht eine Umsetzung von 1 eq des Amins in $CHCl_3$ (0.1 M) mit 1.15 eq Formalin-Lösung (37%) und 2.5 eq Ameisensäure unter Rühren bei 65 °C für 3 h vor. Unter diesen Bedingungen wies die Reaktionslösung nach 2 h eine braune Färbung auf und eine Kontrolle per Dünnschichtchromatographie zeigte keine definierten Produkte an.

Um die Reaktionsbedingungen schonender zu gestalten wurde zunächst der Versuch bei Raumtemperatur wiederholt. Hierbei verfärbte sich die eigentlich gelbliche Reaktionslösung dunkel grün. Zur Aufarbeitung musste das Reaktionsgemisch in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter K_2CO_3-Lösung gewaschen werden. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Schon beim Waschen mit K_2CO_3-Lösung verfärbte sich der grüne Extrakt rot-braun. Die Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie machte deutlich, dass kein einheitliches Produkt zu erhalten war.

Um die Reaktionsbedingungen weiter zu optimieren wurden im Folgenden verschiedene Parameter variiert und das Reaktionsgemisch am Ende der Umsetzung, indiziert durch die Verfärbung, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Untersuchungen der erhaltenen Gemische mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie gaben anhand der Signalintensitäten Aufschluss über die prozentuale Umsetzung.

Zunächst wurde die Konzentration der Substratlösung auf 0.15 Mol/L erhöht. In zwei weiteren Versuchen variierte die Reagenzienmenge mit 2.5 eq Formaldehyd bzw. 3 eq Ameisensäure. Im Folgenden wurde in erneuten Versuchen die Reaktionsdauer auf 6 h verdoppelt und schließlich die Reaktion bei 80°C durchgeführt. Mit 60 % Ausbeute vor

Aufreinigung war mit 2.5 eq Formaldehyd bei verdoppelter Reaktionsdauer der Umsatz in ausreichendem Maße gesteigert, so dass der Versuch mit Glaukothalin anstatt Tetrahydrochinolin unter der Annahme acht derivatisierbarer Stickstoffatome (alter Strukturvorschlag) wiederholt wurde (s. B 4.6.2). Hierbei war keine Umsetzung zu beobachten.

Reduktive Methylierung

Die reduktive Alkylierung versprach Erfolg, da sie bereits an porphyrinanalogen Cyclopyrrolen funktioniert hatte, welche dem ursprünglichen Strukturvorschlag ähneln.[105]

Um Galukothalin umzusetzen, wurde dies unter einer Argonatmosphäre in trockenem THF suspendiert (3.0 mg/5 µmol in 2 mL) und mit 10 mg NaH (2.5 mmol, 60% in Mineralöl) bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender Zugabe von 40 mg (0.28 mmol) Methyliodid refluxierte die Lösung 14 h. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung nach Abkühlen auf Raumtemperatur umfasste die Hydrolyse durch Zugabe von 5 mL NaOH (1M) sowie 10 mL CH_2Cl_2 mit anschließendem 20minütigem Rühren. Im Folgenden wurden weitere 10 mL CH_2Cl_2 hinzugefügt, um das Reaktionsprodukt zu extrahieren. Die erhaltene organische Phase trocknete über Na_2SO_4 wonach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum das Rohprodukt ergab. Die Dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte ausschließlich das Edukt.

4.5.3 Reduktionen

Eine Reduktion des zunächst vermuteten aromatischen Kerns des Farbstoffs versprach über diesen kopplungsarmen Bereich neue Informationen zu geben.

Reduktion mit Borhydriden

Als Reduktionsmittel dienten $NaBH_4$ und $NaCNBH_3$. Diese Methoden wurden in zunächst in minimalem Maßstab getestet, wozu je ca. 1 mg des Farbstoffs in 0.5 mL $CHCl_3$ gelöst und dann mit einer guten Spatelspitze des jeweiligen Reduktionsmittels versetzt wurden. Da eine Reduktion die Entfärbung des Reaktionsgemisches zur Folge haben musste, diente dies als Kriterium zur Beobachtung des Fortgangs der Reaktion während die Lösungen bei Raumtemperatur rührten.

Im Fall von $NaCNBH_3$ ließ sich erst nach drei Tagen eine leichte Entfärbung erkennen. Dünnschichtchromatographisch ließ sich allerdings wiederum nur das Edukt nachweisen. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C ergab keine Fortschritte.

Bei der Reduktion mit $NaBH_4$ ließ sich durch Zugabe von 2 Tropfen HCl (0.5M) eine Entfärbung der Reaktionslösung erzeugen. Da sich bei dünnschichtchromatographischer Kontrolle jedoch die Zersetzung der Substanz offenbarte, wurde die Reaktion bei 0 °C

wiederholt. Auch hierbei konnte nur ein undefinierbares Zersetzungsgemisch detektiert werden.

Reduktion mit Pd/C/H_2

6.4 mg (1.1 mmol) des Farbstoffs gelöst in 0.5 mL Pyridin wurden mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Unter H_2-Atmosphäre rührte dieses Gemisch bei Raumtemperatur für 17 h. Es entstanden drei farblose Substanzen, deren ^{1}H-NMR Spektren wie erhofft ausschließlich Signale im aliphatischen Bereich zeigten. Es waren jedoch massenspektroskopisch keine Ionen zu detektieren. Eine Strukturaufklärung war also nicht möglich.

4.6 Weitere Substanzen aus Stamm HP1

Der Stamm *Rheinheimera baltica* spp. HP1 produzierte einige Farbstoffe, die sich im Zuge der Isolierung von Glaukothalin zeigten. In Abbildung 44 ist zur Verdeutlichung eine Momentaufnahme der Säulenchromatographie des Rohextraktes dargestellt. Rein optisch ließen sich zwei rote zwei gelbe und ein weiterer blauer Farbstoff unterscheiden. Diese konnten jedoch aufgrund der geringen Mengen und mangelnder Stabilität nicht isoliert werden.

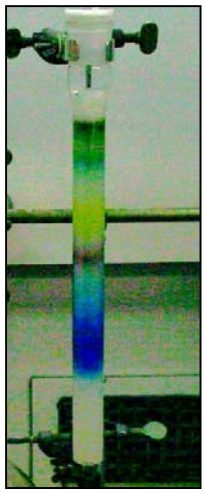


Abbildung 44

4.6.1 GT2A34

Der beschriebene weitere blaue Farbstoff, GT2A34, der sich weder im Laufverhalten auf Kieselgel noch in der Löslichkeit von Glaukothalin unterschied konnte isoliert werden, da er länger auf Sephadex LH20 ($CHCl_3$) verblieb. Im DCI-MS-Spektrum wies diese Substanz eine Masse von M/Z = 346 $[M+NH_4]^+$ auf. Ein ^{1}H-NMR-Spektrum zeigte Ähnlichkeiten zu Glaukothalinspektren. Von weiteren Untersuchungen wurde wegen der mangelnden Reinheit und der geringen Substanzmenge (0.3 mg/L) abgesehen, sodass die Verwandtschaft zu Glaukothalin nicht näher beschrieben werden kann.

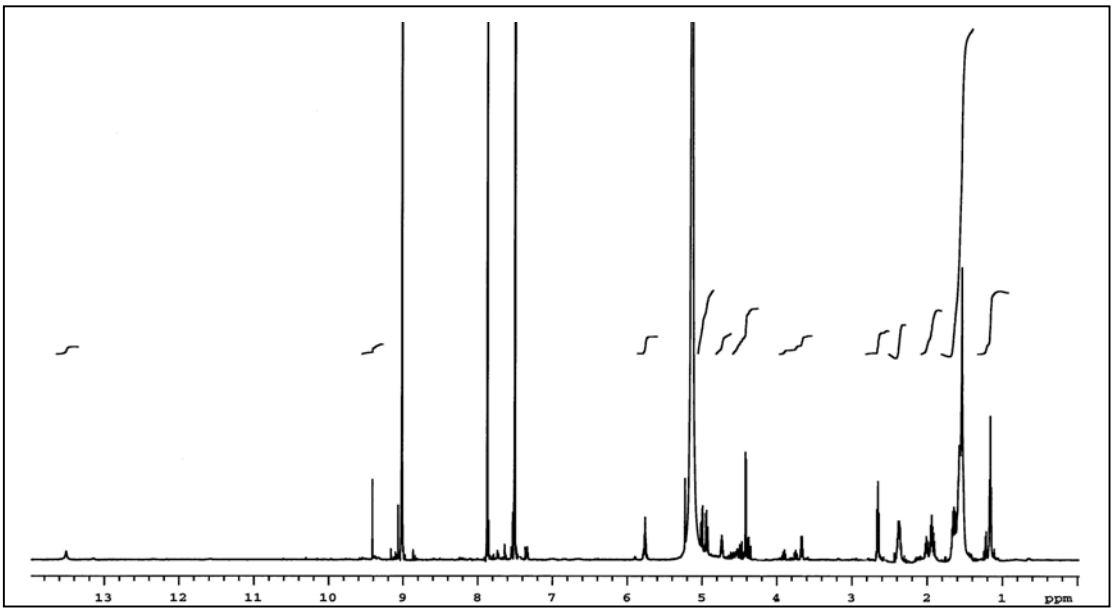


Abbildung 45: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von GT2A34 in d_5 Pyridin.

4.6.2 Benzolsulfonamid (51)

In ausreichender Menge (7.5 mg/L) war allerdings eine farblose Substanz aus dem Kulturfiltrat von 2.8 L Flüssigkulturen mit Zellstoffzusatz (s. B 4.7.2) zu isolieren. Das Kulturfiltrat war zwei mal mit Ethylacetat extrahiert worden, wonach der Feststoff durch Chromatographie des Rohprodukts an Kieselgel ($CHCl_3$/MeOH 9:1-3:1) und Sephadex LH20 (MeOH) zu erhalten war. Dessen EI-MS-Spektrum mit der erhaltenen Fragmentierung legte die Struktur von Benzolsulfonamid nahe. Dies wurde durch ^{1}H und ^{13}C-NMR-Spektren bestätigt.

Benzolsulfonamid wurde bisher nur aus Bakterien in Klärschlamm isoliert und seine mögliche ökologische Rolle ist noch nicht untersucht.[106]

5 Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora*

5.1 Die Biosynthese von Melaninen in Pilzen

Pilzliche Melanine sind diverse meist dunkelbraune bis schwarze Biopolymere, die aus phenolischen oder Indolkomponenten bestehen. Sie sind als Schutz gegen UV-Strahlen und als Virulenzfaktoren bekannt, die pathogenen Organismen so Vorteile im Überlebenskampf verschaffen.[107,108] Aufgrund ihrer Rolle hinsichtlich der Pathogenität der Mikroorganismen war die Forschung an der Melaninbildung seit jeher von Interesse.[109,110]

Die Biosynthese der Melanine kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Einige Pilze bilden Melanin aus 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), welches aus Tyrosin hervorgeht. Die innerhalb der Zellwand von Basidomyceten vorkommenden Melanine haben ihren Ursprung in γ-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol (GDHB) oder Catechol. In Ascomyceten beispielsweise erfolgt die Melaninbiosynthese im Allgemeinen auf dem Dihydroxynaphtalin-Weg (DHN), wie er in Abbildung 46 dargestellt ist.[111]

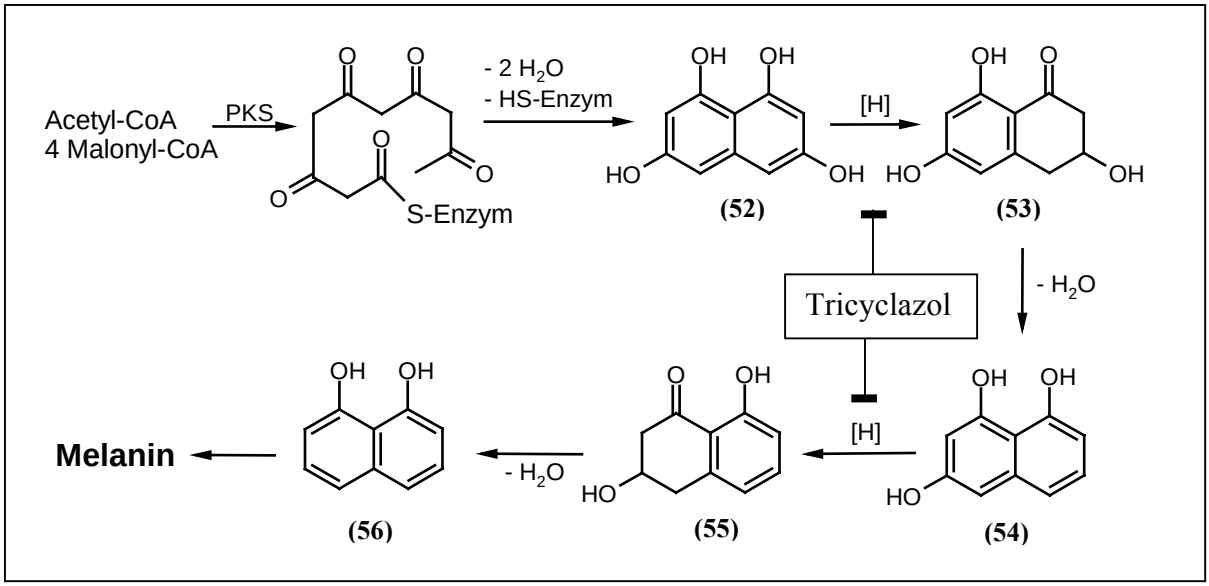


Abbildung 46: Biosynthese von Melanin auf dem DHN-Weg, ausgehend von einem Pentaketid.

Ausgehend von einem Pentaketid wird 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalin (**52**) gebildet. Dieses wird zu Scytalon (**53**) reduziert, welches wiederum unter Wasserabspaltung in 1,3,8-Trihydroxynaphtalin (**54**) übergeht. In einer gleichen Reaktionsfolge entstehen Vermelon (**55**) und 1,8-Dihydroxynaphtalin (**56**), nach dem dieser Biosyntheseweg benannt ist. [112] Die nachfolgenden Schritte beginnen mit der Dimerisierung des DHN und anschließender Polymerisation, die vermutlich durch eine Laccase katalysiert wird.[113]

5.2 Biochemische Arbeiten

In dem filamentösen Ascomyceten *Sordaria macrospora*, ist die Melaninbiosynthese eng mit der sexuellen Entwicklung des Pilzes verknüpft.[114] Verschiedene sterile Mutanten, die mittels konventioneller Mutagenese erzeugt wurden, zeigten eine vom Wildtyp abweichende Melaninbildung. Seit vielen Jahren sind phänotypisch einige *Sordaria macrospora* Mutanten beschrieben worden, bei denen die Melaninbiosynthese defekt ist. Mit Pile 1 steht eine solche melaninfreie Entwicklungsmutante zur Verfügung.
Außerdem sind von U. KÜCK et al. vier, die Melaninbiosynthese betreffende, Gene kloniert und die entsprechenden Transkriptionsanalysen durchgeführt worden. Es stellte sich heraus, dass mit *pks*, *tehnr*, *sdh* und *tihnr* Gene der DHN-Melaninbiosynthese vorhanden sind. Der Abgleich mit bekannten DHN-Melaninbiosyntheseenzymen anderer Pilze ergab starke Homologien.[114] Real-time PCR-Analysen zeigten, dass diese vier Gene hauptsächlich während der sexuellen Entwicklung im Wildtyp expremiert werden. In Schüttelkulturen, in denen keine sexuelle Entwicklung stattfindet, ist die Expression dieser Gene stark herunterreguliert. Das Gleiche gilt für Mutanten mit Defekten in der Fruchtkörperbildung. Die Co-Regulation der beiden Prozesse bestätigte sich somit. Dieser Zusammenhang lässt die Untersuchung der Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora* besonders interessant erscheinen. Außerdem ist so auf biologischem Wege erwiesen, dass der Dihydroxynaphtalin-Weg zur Biosynthese der Melanine in *Sordaria macrospora* genutzt wird. Das Ziel der Zusammenarbeit mit U. KÜCK und I. ENGH (Universität Bochum) war, durch chemische Charakterisierung die Zwischenprodukte der Melaninbiosynthse in *Sordaria macrospora* zu identifizieren. Eine von I. ENGH[115] durch homologe Rekombination hergestellte Albino-phänotyp Δpks-Mutante sollte ebenfalls der Analyse der Zwischenprodukte unterzogen werden.

5.3 Screening nach Zwischen- bzw. Nebenprodukten der Melaninbiosynthese

5.3.1 Vergleich von Wildtyp, Pile 1 und Δpks-Mutante

Zunächst sollte ein umfangreiches HPLC und HPLC-MS-Screening, unterstützt durch dünnschichtchromatographische Methoden, Aufschluss darüber geben, inwiefern sich das Metabolitenspektrum vom *Sordaria macrospora* Wildtyp und der Entwicklungsmutante

Pile 1 unterscheidet. Außerdem war von Interesse, wie sich deren Metabolitenspektren verändern, wenn Schüttelkulturen angefertigt werden, in denen nur eine asexuelle Fortpflanzung stattfindet. Dies sollte nämlich nach dem oben dargestellten Zusammenhang auch Einfluss auf die Melaninbildung haben. Es wurde erwartet, dass sich Zwischenprodukte der Melaninbiosynthese zumindest im Falle der Schüttelkulturen und der Pile 1 Mutante akkumulieren und damit detektierbar sind.

Es wurden Schüttelkulturen in den Medien 1549, SGG, M2, G20, E2, 1158 und M2+NaCl (33%) angesetzt. Nach viertägiger Inkubation bei 180 rpm und 28°C, ließ sich erkennen, das keiner der Ansätze eine nennenswerte Melaninproduktion aufwies. Mycel und Kulturfiltrat wurden mittels Filtration getrennt. Die Extraktion des Kulturfiltrats fand mit Ethylacetat statt, die des Mycels mit Aceton im Ultraschallbad. Diese Vorgehensweise zur Aufarbeitung der Kulturen wurde für alle nachfolgenden Experimente beibehalten. Anhand von HPLC- und HPLC-MS Analysen bestätigte sich, was auch schon aus den Dünnschichtchromatogrammen der Extrakte zu erkennen war. Die Sekundärstoffproduktion war äußerst schwach ausgeprägt und zwischen den einzelnen Ansätzen bestand kein merklicher Unterschied.

Die Kultivierung in P-Kolben fand zunächst nur in den Medien statt, in denen *Sordaria macrospora* und Pile 1 in den vorangegangenen Experimenten das beste Wachstum gezeigt hatten. Nur in diesen war ein Vergleich der Untersuchungen sinnvoll. Beide Stämme wurden vier Wochen bei Tageslicht und Raumtemperatur in je zwei mal 1 L P-Kolben in SGG-, M2- und 1549-Medium inkubiert.

Im Medium 1549 zeigte das Mycel von *Sordaria macrospora* nicht die erwartete typische Bildung schwarzer, also melanintragender, Sporen. Allerdings konnte mit den genannten Methoden kein Unterschied in der Sekundärstoffbildung ausgemacht werden. Dies galt auch für den Vergleich zwischen *Sordaria macrospora*-Wildtyp und Pile 1. Lediglich eine Änderung der Verteilung zweier Metaboliten zwischen Mycel und Kulturfiltrat war zu erkennen.

Den weiteren Untersuchungen wurde auch die nun zur Verfügung stehende Δpks-Mutante unterzogen. Zum Zweck der einfacheren Isolierung wurde zu dem synthetischen, mineralhaltigen Glucose-Medium SWG gewechselt. Die Verwendung eines Biomalz-Mediums (BMM) diente zur besseren Vergleichbarkeit zu den Studien aus Bochum. Extrakte der drei Stämme aus Ruhekulturen (4 Wo) und Schüttelkulturen (7 d) in den Medien SWG und BMM wurden dünnschichtchromatographisch sowie mittels HPLC, und HPLC-MS untersucht. Auch hier traten sowohl zwischen den einzelnen Stämmen, als auch zwischen den verschiedenen Kultivierungen keine merklichen Unterscheide auf.

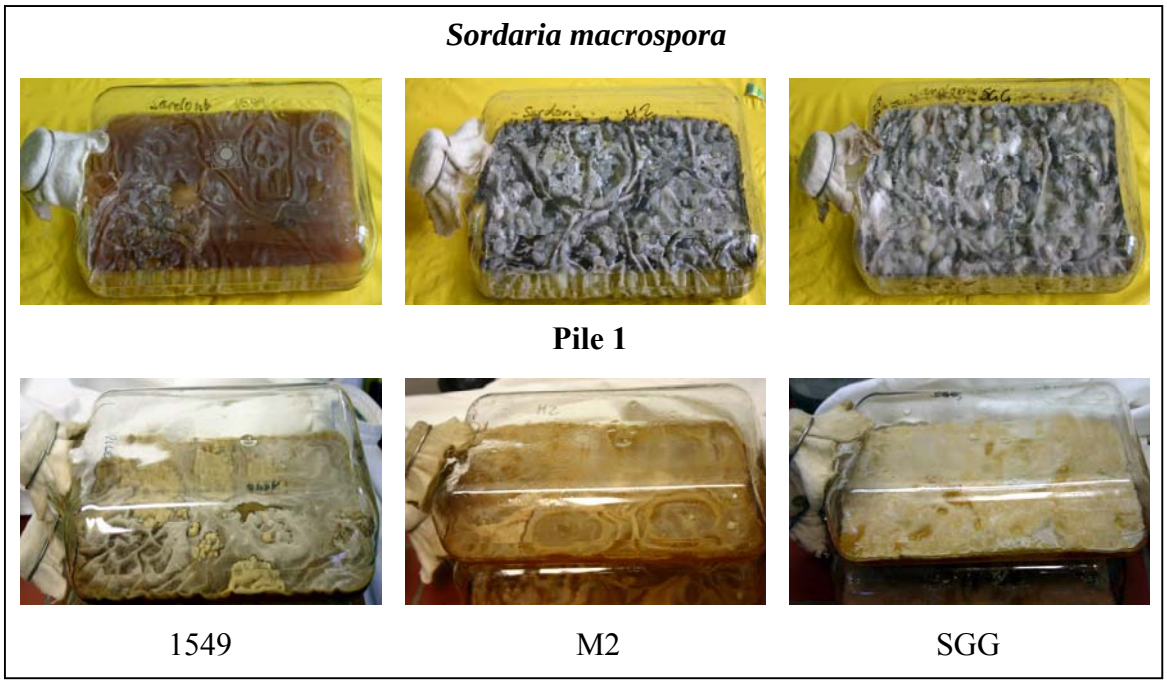


Abbildung 47: Färbung der Ruhekulturen von *Sordaria macrospora* und Pile 1 durch Melaninbildung.

Auch eine zeitabhängige Untersuchung der Ruhekulturen in den Medien M2 und SWG nach 7, 14, 21 und 28 d Inkubationszeit brachte keine weiteren Erkenntnisse. Es steht also zu vermuten, dass die Intermediate im Wildtyp zu schnell metabolisiert werden und demnach nicht akkumulieren. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass auch in Pile 1, wie in der Δpks –Mutante, keine Biosynthese des Pentaketids stattfindet und somit auch keine Zwischenprodukte auftreten

5.3.2 Einsatz von Biosyntheseinhibitoren

Da in den vorangegangenen Experimenten auch im Wildtyp keine Zwischenprodukte der Melaninbiosynthese nachzuweisen waren, musste davon ausgegangen werden, dass die Intermediate im Wildtyp zu schnell metabolisiert werden. Eine Akkumulation der Zwischenprodukte kann aber durch verschiedene Biosynthesehemmstoffe erreicht werden. Dies sollte Zunächst mit Hilfe von Tricyclazol (**57**) untersucht werden.

Tricyclazol inhibiert den Reduktionsschritt von 1,3,6,8-Tertahydroxynaphtalin zu Scytalon[107] sowie die 1,3,8-Trihydroxynaphthalinreductase und verhindert somit ebenfalls die Umsetzung von **54** zu **55** (s. Abbildung 46).[116]

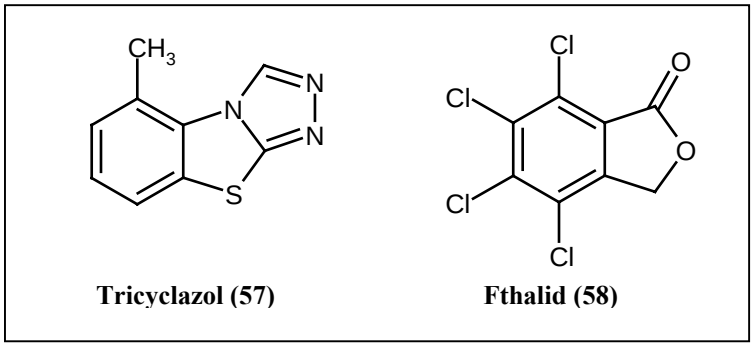


Abbildung 48: Melaninbiosyntheseinhibitoren.

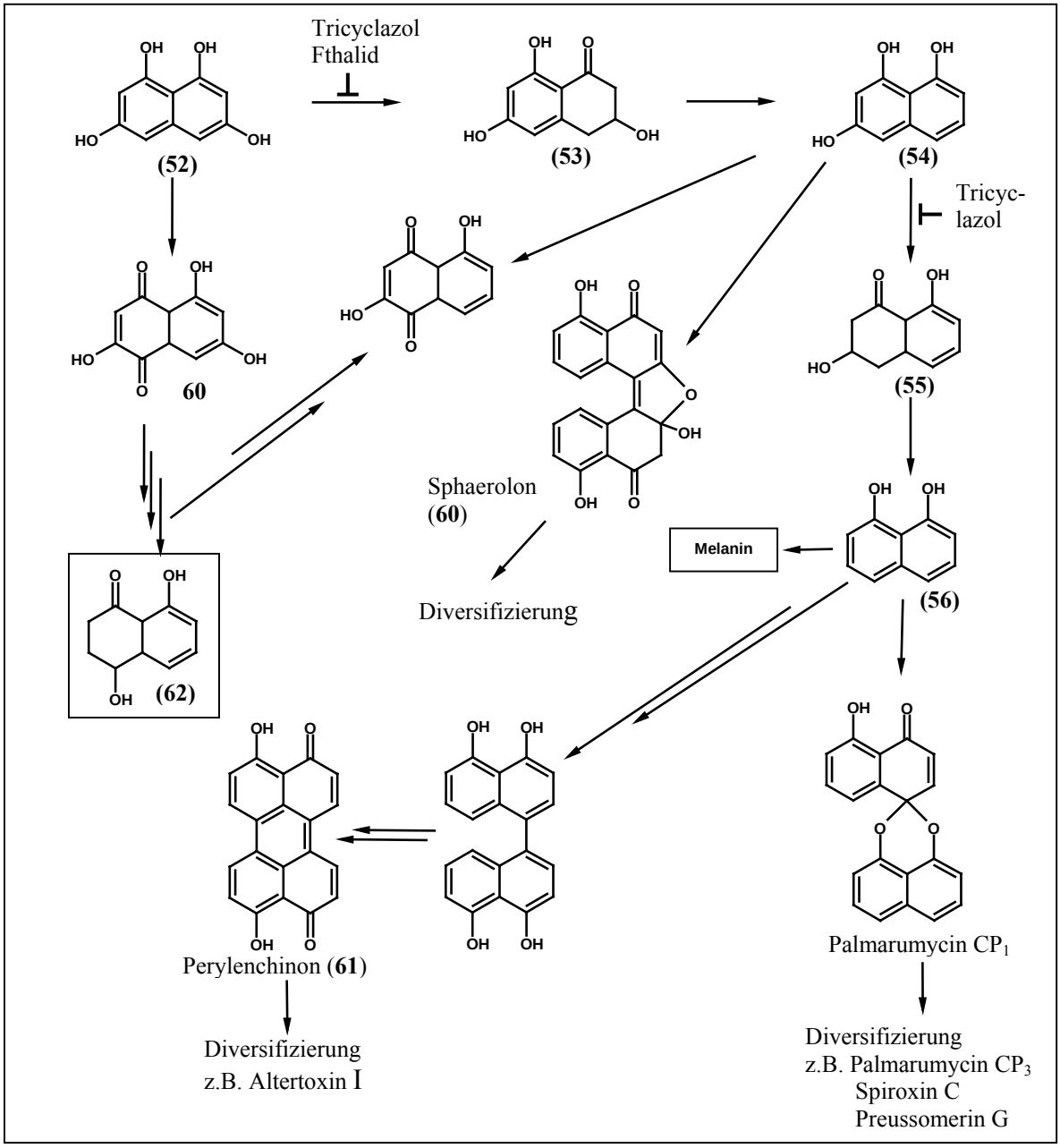


Abbildung 49: Mit der Biosynthese der DHN-Melanine verknüpfte Verbindungen.

Neben Zwischenprodukten der Melaninbiosynthese könnten so auch Sekundärstoffe isoliert werden, deren Biosynthese unter Normalbedingungen nicht oder nur minimal stattfindet. Dies kann aus einem größeren Rohstoffangebot bzw. Angebot von sonst schnell auf anderen Wegen metabolisierten Vorläufern oder dem Anschalten sonst stillgelegter Biosynthesegene resultieren.[112]

Beispiele hierfür finden sich in Abbildung 49 aus der auch der Bezug zu A 3.1.7 hervorgeht. Verschiedene dieser Nebenprodukte weisen interessante antibakterielle und immunsuppressieve Eigenschaften auf.[117]

Es wurden Ruhekulturen angefertigt, denen zum SWG-Medium 5 mg/L Tricyclazol (**57**) beigefügt waren. Nach vier Wochen Inkubationszeit war die Hemmung der Melaninbiosynthese deutlich an der Farbe der Kulturen zu erkennen.

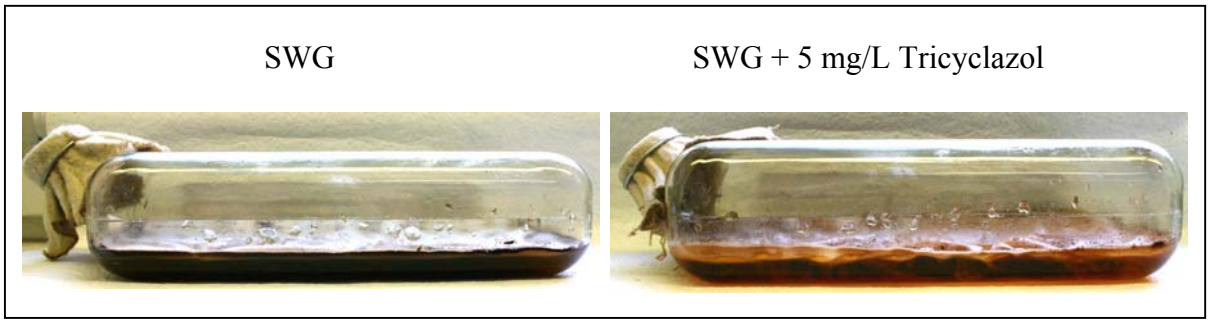


Abbildung 50: Farbänderung bei durch Tricyclazol gehemmter Melaninbildung.

Die Extrakte wurden wie beschreiben hergestellt und mittels analytischer HPLC untersucht.

Im Mycelextrakt fanden sich keine Unterschiede zwischen der Kultivierung mit und ohne Tricyclazol. Das Chromatogramm des Kulturfiltratextrakts hingegen zeigte Abweichungen zwischen den Kulivierungen. Ein Peak im HPLC-Chromatogramm des Extraktes aus der Kultivierung mit dem Enzyminhibitor stach besonders hervor. Diesem konnte nach Rücktestung der Isolate Feroxidin (**63**) zugeordnet werden, ein Metabolit der jedoch auch aus den Kultivierungen ohne Inhibitoren hervorging. Ebenfalls deutlich erhöht war auch der Peak, der dem später isolierten Isoscleron (**62**) entspricht.

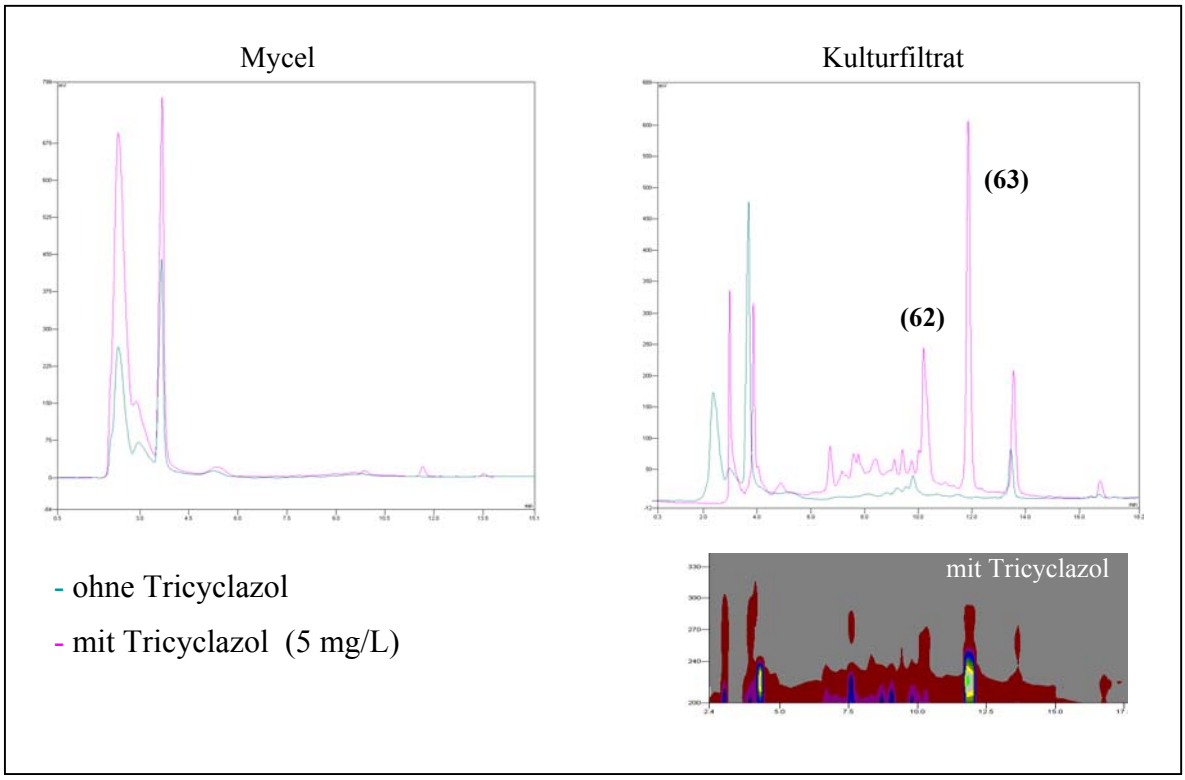


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte mit UV-Spektrum.

Aufgrund seiner fungiziden Wirkung hat Tricyclazol auch das Wachstum und somit die Produktivität der Stämme beeinflusst. Deswegen wurde ein gleichartiger Versuch mit Fthalid (5 mg/L) wiederholt, das wie Tricyclazol den Reduktionsschritt von 1,3,6,8-Tertahydroxynaphtalin zu Scytalon (**53**) hemmt.[118] Ziel war es die Produktivität zu erhalten und damit die Isolierung einzelner Komponenten zu vereinfachen. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie unter Rücktestung der Fraktionen per analytischer HPLC, um die auffälligen Substanzpeaks der Retentionszeit und des UV-Spektrums zu identifizieren und zu isolieren. Aus den Extrakten, deren Dünnschichtchromatogramme in Abbildung 52. dargestellt sind, konnten zwei Metabolite isoliert werden, die mit der Melaninbiosynthese verknüpft sind.

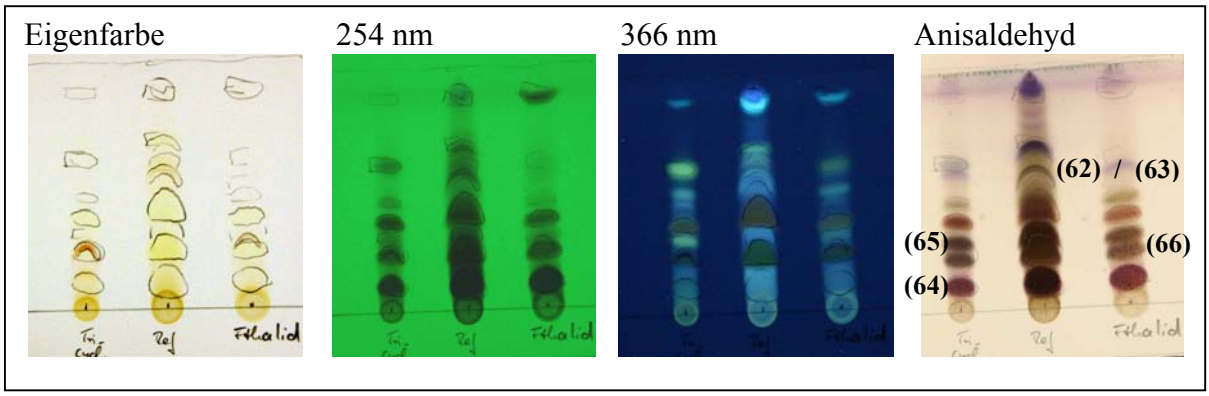
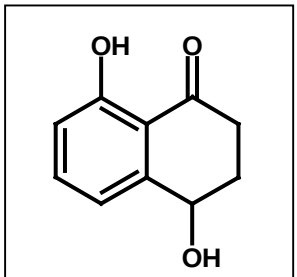


Abbildung 52: Dünnschichtchromatogramme der Kulturfiltratextrakte der Kultivierung mit Tricyclazol (links), ohne Inhibitor (mitte), mit Fthalid (rechts).

5.3.3 Isoscleron (62)

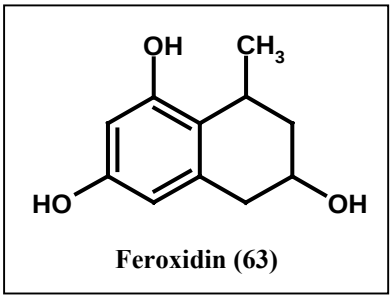
Aus vier Litern einer vierwöchigen Kultivierung von *Sordaria macrospra* in P-Kolben im SWG-Medium bei Raumtemperatur und Tageslicht wurde ein Kulturfiltratextrakt erstellt. Nach Chromatographie an Kieselgel (Gradient Dichlormethan/Methanol 95:5, 9:1, 3:1) und anschließender Trennung an Sephadex LH20 (Aceton) wurden 3.1 mg eines Gemisches zweier Substanzen **62** und **63** (A 5.3.4) erhalten.



Isoscleron (62)

Aus einem DCI-MS-Spektrum ging für **62** die Masse 178 g/mol hervor. Die ^{1}H-NMR-Spektren zeigten, dass **62** und **63** im Verhältnis 0.6:1 vorlagen, und die Signale somit gut zu unterscheiden waren. **62** konnten drei Signale benachbarter, aromatischer und fünf aliphatische Protonen zugeordnet werden. Dem ^{13}C-NMR-Spektrum waren zehn Signale von **62** zu entnehmen, darunter die sechs aromatischer Kohlenstoffatome und eines Ketons. Die Verschiebungen zweier Signale (δ = 163.3, 67.7) implizieren, dass die entsprechenden Kohlenstoffatome Hydroxygruppen tragen. Durch Vergleich mit Literaturdaten wurde für **62** die Struktur von Isoscleron festgelegt.[119] Dieses ist ein Nachfolgeprodukt von Flaviolin (**59**), und zweigt somit von der Melaninbiosymthese ab, wie Abbildung 49 zu entnehmen ist (hervorgehoben).

5.3.4 Feroxidin (63)



Im Gemisch mit **62** war eine zweite Substanz zu identifizieren. **63** erzeugte im ^{1}H-NMR-Spektrum Signale von elf Protonen. Die Kopplungskonstante der Signale bei $\delta = 6.24$ und 6.28 von $^{4}J = 1$ Hz zeigt die meta-Stellung der aromatischen Protonen auf. Das Dublett einer Methylgruppe ($J = 6.0$ Hz) wies auf die Nachbarschaft zu einer Methingruppe hin. Ein Multiplett der Intensität 4 und eines der Intensität 1 ($\delta = 4.65$-4.70) deutete auf zwei Methyleneinheiten neben einem protonentragenden Stereozentrum, welches eine Hydroxylgruppe trägt, hin. Dem ^{13}C-NMR-Spektrum waren elf Signale zu entnehmen. In Verbindung mit der aus einem DCI-MS-Spektrum hervorgegangenen molaren Masse von 194 g/mol ergab sich die Summenformel zu $C_{11}H_{14}O_3$. Dies implizierte das Vorhandensein von drei Hydroxylgruppen. Es wurde auf die Strukturformel von Feroxidin (**63**) geschlossen, was sich anhand von 2D-NMR-Spektren bestätigen ließ.

Feroxidin ist bisher lediglich als Pflanzenmetabolit bekannt und wurde bis auf die Stereochemie nicht weiter untersucht.[120] Ein Vergleich der Stereochemie war in diesem Fall nicht möglich, da aus dem Gemisch heraus kein Drehwert zu bestimmen war. Bisher wurde angenommen, dass Feroxidin aus einem decarboxylierten Hexaketid hervorgeht.[120] Es lässt sich nach dieser Vorstellung allerdings keine Faltung für das Polyketid entwickeln, die dem pilzlichen Ursprung gerecht würde.[121]

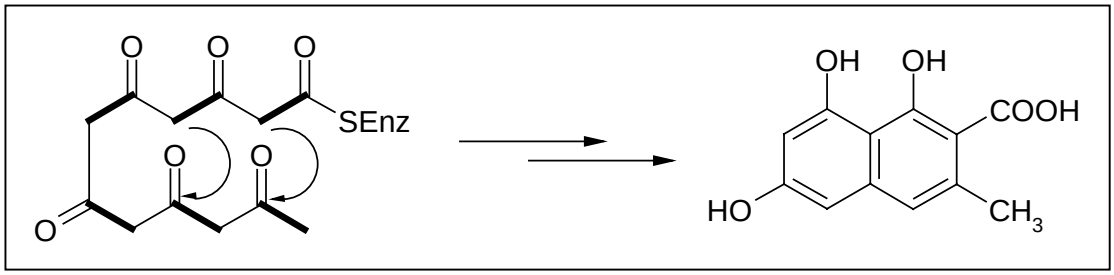


Abbildung 53: Faltung und Zyklisierung eines Hexaketides, wie sie für Pilzmetabolite (F-Modus) zu erwarten ist[121] und das daraus resultierendes Substitutionsmuster.

Deswegen ist davon auszugehen, dass zunächst ein Pentaketid wie 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalin ((**52**), Abbildung 49) vorlag, welches nachträglich, zum Beispiel durch Methionin, methyliert wurde.

Die beiden beschriebenen Metabolite ließen sich auch in den Extrakten der Kulturen mit Tricyclazol und Fthalid nachweisen, wie es nach dem in Abbildung 49 dargestellten Biosyntheseschema zu erwarten ist. In den Rohprodukten der Mutanten waren diese Substanzen jedoch nicht nachweisbar. Dies bestätigt den Zusammenhang mit der Melaninbiosynthese und unterstützt die Vermutung, dass Feroxidin aus einem Pentaketid hervorgeht.

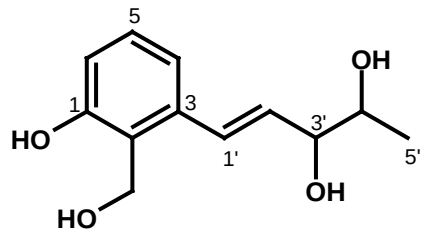
5.4 Isolierung von Hexaketiden aus *Sordaria macrospora*

Im Zuge der Suche nach Zwischen- oder Nebenprodukten der Melaninbiosynthese bot es sich an, die Hauptmetabolite der Stämme zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um Hexaketide. Es wurde bereits gezeigt, dass Hexaketide verstärkt in gehemmten DHN-Melanin-produzierenden Organismen auftreten.[122] In diesem Falle traten die Hexaketide aber gleichmäßig in allen Rohprodukten des Wildtyps auf. Auch in denen der Mutanten waren sie nachzuweisen. Ein Zusammenhang mit der Melaninbiosynthse ist in diesem Fall also auszuschließen.

5.4.1 Sordariol (64)

Aus vier Litern der mit Tricyclazol versetzten Kulturen entstand ein Kulturfiltratextrakt, der säulenchromatographisch an Kieselgel (Gradient Chloroform/Methanol 9/1 → 3/1) fraktioniert wurde. Eine der so entstandenen Fraktionen brachte durch Chromatographie an Sephadex (MeOH) **64** in einer Ausbeute von 11.3 mg hervor. Die Substanz war stark UV-löschend (254 nm) und färbte mit Anisaldehyd in Hitze intensiv purpurfarben an.

Ein DCI-MS-Spektrum zeigte eine molare Masse von 224 g/mol auf. Dem ^{1}H-NMR-Spektrum waren die Signale einer Methylgruppe (zum Dublett aufgespalten), einer phenolischen Hydroxygruppe, einer Methylengruppe und sieben Methingruppen zu entnehmen. Drei der Methinprotonen ließen sich anhand ihrer Verschiebung (δ = 6.71 bis 7.0) und des ABC-Kopplungsmusters einem trisubstituierten Aromaten zuordnen. Zwei weitere Signale (δ = 6.98 und 6.19) ließen auf eine *trans*-Doppelbindung schließen (^{3}J = 16 Hz). Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte 12 Signale, davon sechs aromatischer und zwei



Sordariol (64)

olefinischer Kohlenstoffatome. Aus diesen Informationen ließ sich die Summenformel $C_{12}H_{16}O_4$ ableiten. Eine Datenbankrecherche[61,62] ergab als Strukturvorschlag Sordariol (**64**), was sich anhand von 2D-NMR-Spektren bestätigen ließ.
Wie schon der Name erkennen lässt, ist Sordariol als Metabolit von *Sordaria macrospora* bekannt.[123]

5.4.2 (-)-Cyclosordariolon (65)

Aus dem unter A 5.4.1 beschriebenen Rohextrakt bzw. dessen erster Fraktionierung wurde eine weitere Fraktion bearbeitet, indem sie an Sephadex LH20 (MeOH) chromatographiert wurde. Nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (Säule D, isokratisch, 35% Acetonitril) waren 5.3 mg eines gelben amorphen Feststoffs zu erhalten, was einer Ausbeute von 1.3 mg/L entspricht. Das EI-MS-Spektrum dieses Metaboliten zeigte eine molare Masse von 220 g/mol. Dem ^{1}H-NMR-Spektrum war das Vorhandensein einer Methylgruppe, zweier cisständiger olefinischer Protonen (δ = 6.14 und 7.97, ^3J = 10 Hz) und zweier benachbarter aromatischer Protonen (δ = 6.91 und 7.94, J = 5.5 Hz) zu entnehmen. Außerdem zeigte ein Signal der relativen Intensität 2 mit einer Verschiebung von δ = 5.00 eine Hydroxymethylengruppe an. Das ^{13}C-NMR-Spktrum wies 12 Signale auf, von denen sechs einem aromatischen System zuzuordnen waren. Anhand der Verschiebung eines dieser Signale (δ = 156.5) stand zu vermuten, dass der Aromat ebenfalls eine Hydroxylgruppe trägt. Eine Sauerstoffsubstitution konnte auch für das quartäre Kohlenstoffatom festgelegt werden, welches durch ein Signal bei δ = 77.5 angezeigt wurde. Die Auswertung der 2D-NMR-Spektren führte zum Cyclosodariolon (**65**).

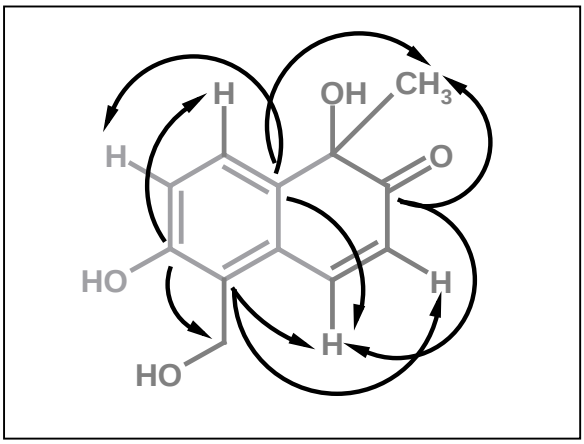


Abbildung 54: Ausgewählte HMBC-NMR-Korrelationen in **65**.

Der Vergleich des Drehwerts ($[\alpha]_D^{20}$ = -210 (c = 0.1, MeOH)) mit Literaturdaten zeigte, dass es sich um (-)-Cyclosordariolon handelte, dessen Stereochemie bisher nicht bekannt ist.[124]

Cyclosordariolon (**65**) kann durch Zyklisierung und Oxidation aus Sodariol hervorgehen, wie in Abbildung 55 dargestellt ist. Da das Keton **67** bereits aus *Sordaria macrospora* bekannt

ist,[124] kann davon ausgegangen werden, dass zuerst an C-3' oxidiert wird und erst in einem nächsten Schritt durch Oxidation an C-4' ein nucleophiles Zentrum entsteht.

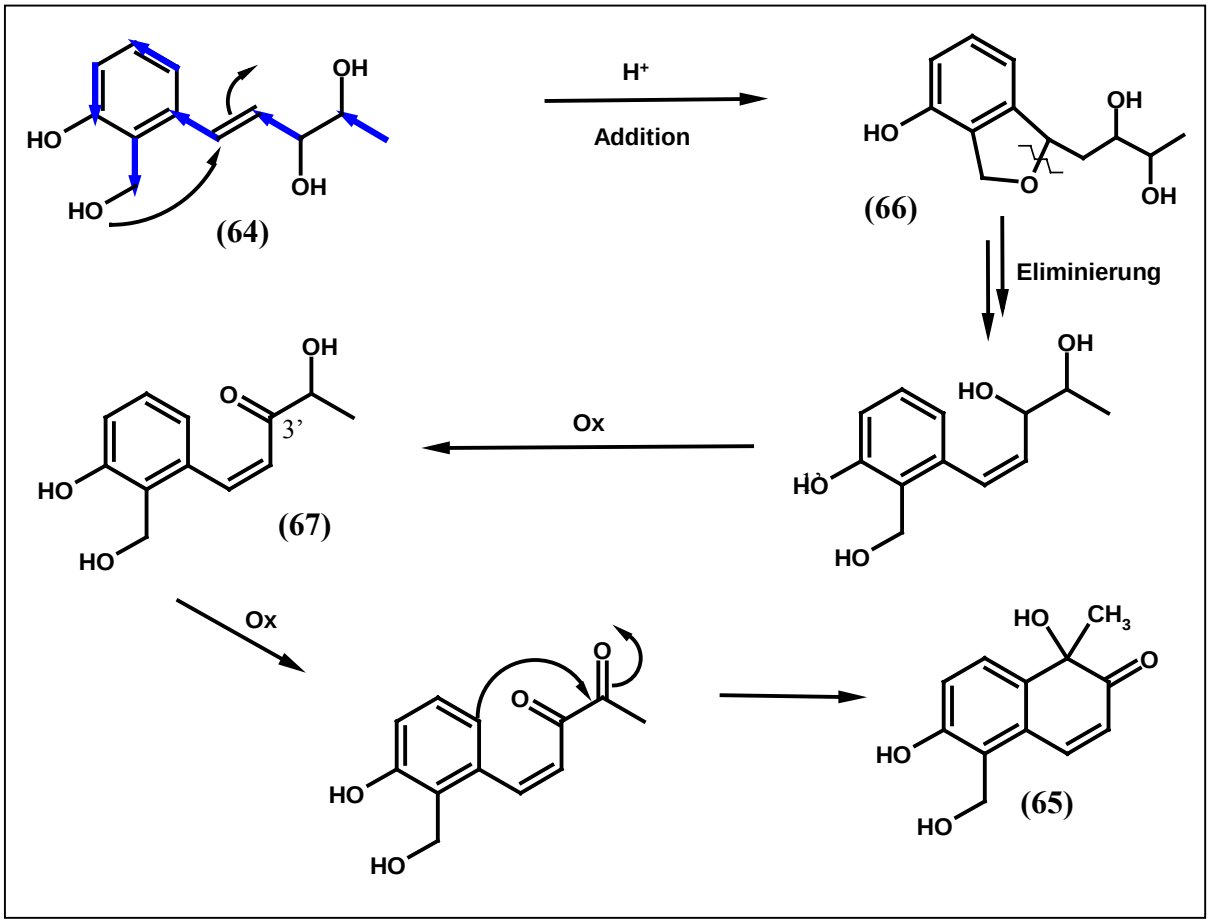
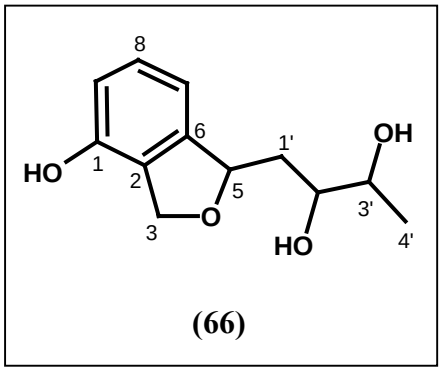


Abbildung 55: Genese von **64** aus Acetat und Bildung von **66** und **65** durch Zyklisierung von Sordariol (**64**).

5.4.3 1-(1,3-Dihydro-4-hydroxy-isobenzofuran-1-yl)butan-2,3-diol (66)

Der Extrakt aus vier Litern Ruhekultur unter Zusatz von Fthalid wurde an Kieselgel (Gradient Chloroform/Methalol 9:1 → 3:1) und Sephadex LH20 (MeOH) fraktioniert. Mittels semipräparativer HPLC konnten 13.2 mg der weißen amorphen Reinsubstanz erhalten werden, was einer Ausbeute von 3.3 mg/L entspricht.



Aus einem ESI-MS-Spektrum ging die molare Masse von 224 g/mol hervor. Das ^{1}H-NMR-Spektrum wies deutliche Ähnlichkeiten zu dem des Sordariols auf. Anstatt der olefinischen Protonen waren dem Spektrum eine Methylengruppe und ein Proton in Nachbarschaft zu

Sauerstoff zu entnehmen. Das ^{13}C-Spektrum ließ die entsprechenden Vergleiche zur Sordariolstruktur zu. Unter Berücksichtigung der Masse konnte ein Ringschluss zu einem Fünfring formuliert werden, wie er in Abbildung 55 dargestellt ist. Die postulierte Struktur bestätigte sich anhand von 2D-Spektren.

5.5 Zusammenfassung

Der Versuch Zwischen- bzw. Nebenprodukte der Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora* mittels HPLC-MS-Spektrometrie zu identifizieren, brachte nicht die erwarteten Ergebnisse. Mit dieser empfindlichen Methode hätten auch geringe Mengen der Metabolite nachweisbar sein sollen.

Auch die Isolierung der Metabolite gestaltete sich schwieriger als erwartet. Mit Isoscleron (**62**) und Feroxidin (**63**) waren lediglich zwei Nebenprodukte der Melaninbiosynthese zu isolieren, die sich durch den Einsatz von Enzyminhibitoren akkumulierten.

Auch aus 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin können Melanine gebildet werden. Diese weisen dann eine eher rötliche Färbung auf,[125] wie sie im Experiment mit Tricyclazol zu beobachten war. Das könnte erklären, warum nur wenige Metabolite aus diesen Experimenten zu erhalten waren.

Sordariol (**64**) und dessen Zyclisierungsprodukte (**65, 66**) sind typische Metabolite von *Sordaria macrospora* und entstehen unabhängig von der Melaninbiosynthese.

6 Sekundärmetabolite aus Actinomyceten

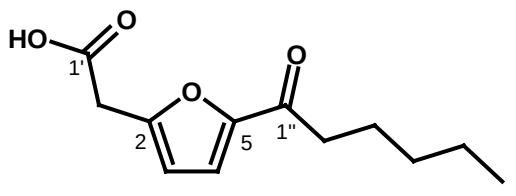
Die Substanzen, die in diesem Kapitel näher beschrieben werden, gingen aus zwei im Arbeitskreis von H. P. FIEDLER durchgeführten HPLC-DAD-Screenings[126] hervor. Hierbei werden Retentionszeiten und UV-Spektren einzelner Komponenten im Rohextrakt mit denen aus einer internen Datenbank verglichen und so bekannte Substanzen meist vor der Isolierung identifiziert. Diese Methode ist ein effizienter Weg bei der Suche nach neuen Naturstoffen.

6.1 2-Carboxymethyl-5-(1-oxohex-1-yl)furan (68)

Bei dem Stamm MT1.11 handelt es sich um eine *Dermacoccus* Spezies, die aus einem Sediment aus der Challenger-Deep (-10898 m) des Mariannengrabens stammt. Die Substanz **68** wurde als Reinsubstanz zwecks Charakterisierung erhalten.

In einem ESI-MS-Spektrum zeigte sich, dass die Substanz bei der Ionisierung zu starker Clusterbildung neigt. Dies deutet auf das Vorhandensein einer Säure hin. Die molare Masse ließ sich aus diesem Experiment zu 224 g/mol bestimmen. Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigte Signale von 15 Protonen. Ein zum Triplett aufgespaltenes Signal einer Methylgruppe und vier Methylensignale konnten anhand eines COSY-NMR-Spektrums als zusammenhängende Kette identifiziert werden. Eine weitere Methylengruppe wurde als Singulett bei $\delta = 3.71$ angezeigt. Zwei Signale der relativen Intensität 1 legten anhand der Verschiebung ($\delta = 6.43$, 7.28) und der relativ niedrigen Kopplungskonstante ($^{3}J = 4$ Hz) das Vorhandensein eines Fünfringaromaten nahe. Das in der relativen Intensität unter eins liegende Singulett bei $\delta = 7.89$ stammt von einem an ein Heteroatom gebundenen Proton, vermutlich der postulierten Säuregruppe.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte lediglich 10 Signale, aus den 2-D-NMR-Spektren konnte auf zwei weitere Kohlenstoffatome zurückgeschlossen werden. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Summenformel zu $C_{12}H_{16}O_4$. Neben den schon aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum abgeleiteten Gruppen zeigten sich im ^{13}C-NMR-Spektrum zwei Signale mit $\delta = 153.0$ und 157.3. Diese konnten nun sicher einem Furanring zugeordnet werden. Ein Signal bei $\delta = 191.5$ implizierte das Vorhandensein einer Ketofunktion. Anhand von 2D-NMR-Spektren ließen



2-Carboxymethyl-5-(1-oxohex-1-yl)furan (68)

sich die Fragmente zu der Struktur von 2-Carboxymethyl-5-(1-oxohex-1-yl)furan (**68**) zusammenfügen.

Diese Struktur ist neu. Zwar sind einfache Furane unter den Naturstoffen weit verbreitet, Substituenten, wie in **68** sind unter ihnen allerdings nicht vertreten. [61,62,127]

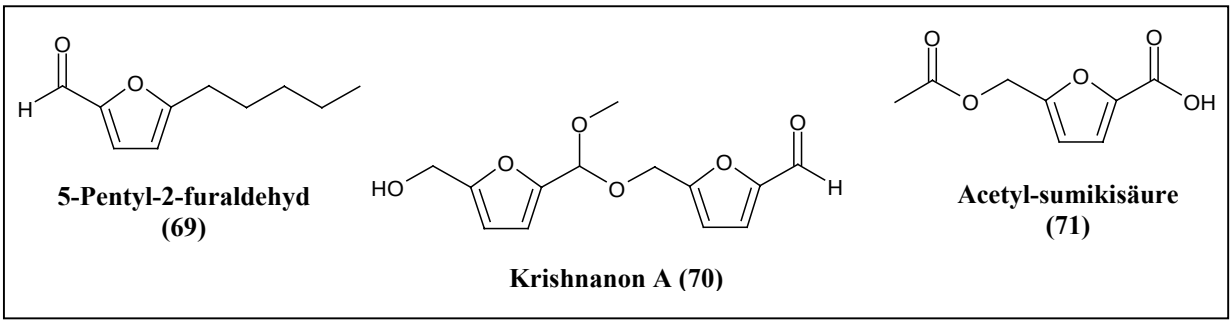
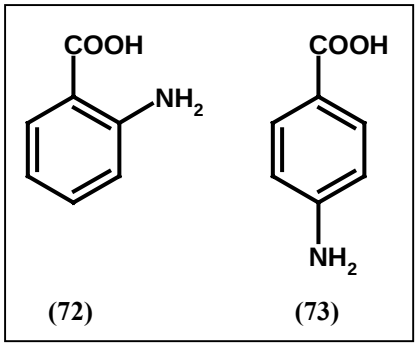


Abbildung 56: Beispiele für 1,5-disubstituierte Furane in der Naturstoffchemie.

6.2 Aminobenzoesäuren aus MT5.2 (72), (73)

Bei dem Stamm MT5.2 handelt es sich um eine *Streptomyces* sp. aus dem gleichen Sediment wie der Stamm MT1.11. In diesem Falle wurde ein Rohprodukt erhalten, welches durch Chromatographie an Sephadex LH20 fraktioniert wurde. Im Vergleich der HPLC-DAD-Spektren war eine Fraktion auszumachen, welche scheinbar die Zielsubstanz enthielt. Durch Trennung mittels semipräparativer HPLC (Säule D, isokratisch: 45% Acetonitril) konnten zwei Substanzen erhalten werden, die der Zielsubstanz entsprechen mussten. Anhand von EI-MS-Spektren und einem internen Datenbankabgleich der Fragmentierungsmuster lag die Vermutung nahe, dass es sich um Aminobenzoesäuren handelte. Entsprechend ergab sich die molare Masse zu 137 g/mol. Aus dem ^{1}H-NMR-Spektren waren die Substitutionsmuster am Aromaten zu entnehmen. Bei **72** handelt es sich um Anthranilsäure und bei **73** um para-Aminobenzoesäure. Ein ^{13}C-Spektrum bestätigte die Vermutung.



Anscheinend entstand durch die Überlagerung der beiden Substanzen im HPLC-Chromatogramm ein UV-Spektrum, welches eine neue und damit isolierungswerte Substanz vorspiegelte.

6.3 NTK-250 A (74/75) und B (76/77)

Die Substanzen NTK-250 A und B waren in einem Reinheitsgrad von ca. 80% als gelbe amorphe Feststoffe erhalten worden. Verschiedene säulenchromatographische Methoden und HPLC-Trennungen brachten keine weitere Aufreinigung. Aus diesem Grund wurde zunächst angenommen, dass sich die Substanzen zersetzen. Weitere Trennversuche fanden daraufhin unter Lichtausschluss, Vermeidung von Temperaturen über Raumtemperatur und unter Ausschluss von Methanol und Chloroform statt, um möglichst schonende Bedingungen einzuhalten. Als diese Maßnahmen auch nicht zum Erfolg führten, lag die Vermutung nahe, dass ein Isomerengemisch vorliegt, welches entweder mit herkömmlichen Methoden nicht zu trennen war oder, dass sich diese Isomere in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Unter dieser Annahme fand die Strukturaufklärung anhand der Mischspektren statt.

6.3.1 NTK 250A (74/75)

HPLC-ESI-MS Spektren lieferten die molare Masse der Komponente A mit 321 g/mol. Mit dieser Information ließ sich eine ESI-MS-Hochauflösung aufnehmen, welche die Summenformel $C_{20}H_{19}NO_3$ ergab. Aus dieser Summenformel ergaben sich zwölf Doppelbindungsequivalente. Eine Datenbankrecherche anhand dieser Summenformel[89,61] führte zu keinem bekannten Naturstoff.

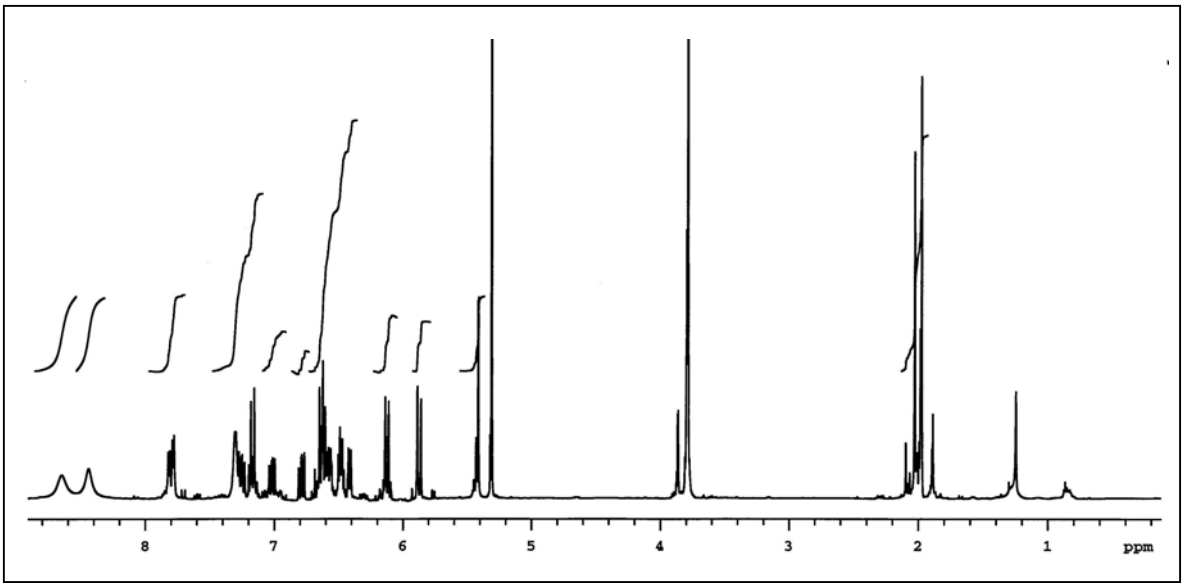


Abbildung 57: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD_2Cl_2) von NTK-250 A (**74**/**75**).

Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum ließ sich das Mengenverhältnis der zwei Isomere zu **74**:**75** = 1.4:1.0 bestimmen. Die Strukturaufklärung konzentrierte sich zunächst auf die Hauptkomponente .

Dem ^{1}H-NMR-Spektrum der Komponente A waren hierfür die Signale zweier Methylgruppen zu entnehmen, eine Methoxylfunktion (δ = 3.79), die zweite an einen olefinischen Strukturteil (δ = 1.98) gebunden. Zwei Protonensignale der relativen Intensität 1 (δ = 5.41, 5.89) zeigten neben einer kleinen Kopplung (^4J = 2.0 Hz) eine deutliche Korrelation im COSY-NMR-Spektrum. Ersteres zeigte außerdem eine COSY-Korrelation zum Signal der Methoxygruppe. Anhand von Korrelationen im HMBC-NMR-Spektrum konnte dieser Einheit auch die Esterfunktion (δ = 171.3) zugeordnet werden. Ein weiteres Kohlenstoffatom mit Resonanz bei δ = 159.2 vervollständigte, angezeigt durch Korrelationen im HMBC-NMR-Spektrum, das erste Strukturelement, ein 4-Methoxy-α-pyron (s. Abbildung 58). Die weiteren Signale zwischen δ = 6.1 und 7.8 zeigten starke Überlappungen untereinander und mit denen des zweiten Isomers. Aus den immerwiederkehrenden Aufspaltungsmustern zum Dublett vom Dublett mit ca. 11 und 15 Hz war zu schließen, dass es sich um ein Polyen, überwiegend in *trans*-Konfiguration, handelt. Dafür sprach auch das UV-Spektrum der Substanz (λ_{max} = 427, 405, 314 nm).

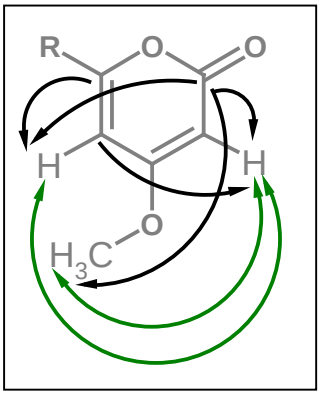


Abbildung 58: HMBC-Korrelationen: schwarz, COSY-Korrelationen: grün.

Um strukturverwandte Naturstoffe zu finden, wurde eine zweite Datenbankrecherche mit dem bereits identifizierten Pyron und einem fünf Doppelbindungen umfassenden Polyen als Strukturelemente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 59 dargestellt.

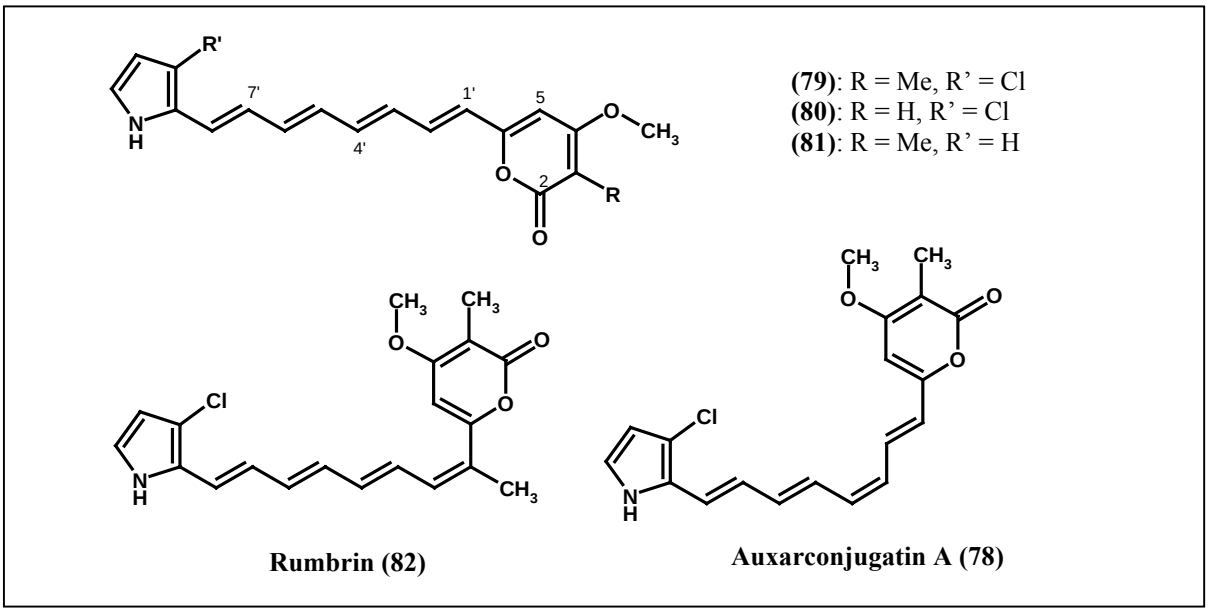


Abbildung 59: Aus Dantenbankrecherche erhaltene Strukturen: all-*trans*-Auxarkonjugatin A (**79**), Auxarkonjugatin B (**80**), Auxarkonjugatin C (**81**) und Rumbrin (**82**).

Ein Vergleich der NMR-Spektrendaten ließ vermuten, dass eine deutliche Strukturähnlichkeit zu den erhaltenen Treffern aus der Recherche vorliegt.[132]

Tabelle 9: Vergelich der Chemischen Verschiebungen von (**74**) und (**80**)

Nr.	**NTK-250 A (74)** (Hauptkomponente) [CD_2Cl_2]		**Auxarconjugatin B[132] (80)** [d_6-Dmso]	
	δ_H (Hz)	**δ_C**	**δ_H (Hz)**	**δ_C**
2		171.3		162.6
3	5.41, d (2.0)	88.7	5.58, d (2.0)	88.4
OCH_3	3.79, d (2.0)	56.3	3.8, s	56.3
4		160.6		170.8
5	5.89, d (2.0)	101.1	6.23, d (2.0)	100.7
6		159.2		158.4
1'	6.12, d (16.0)	118.6	6.29, d (15.2)	121.6
2'	7.18, d (16.0)	139.6	7.04, dd (15.2, 11.6)	135.2
3'		137.6	6.47, dd (14.3/11.6)	130.5
3'-CH_3	1.98, s	12.6	-	-
4'	6.48, d (11.0)	136.8	6.72, dd (14.3, 11.3)	138.9
5'	6.55-6.68, m	135.9	6.40, dd (14.7, 11.3)	131.1
6'	7.02, dd (11.0, 15.0)	131.6	6.61, dd (14.7, 11.3)	136.9
7'	6.48, dd (11.0,15.0)	127.9	6.76, dd (15.6, 11.8)	124.7
8'	6.55-6.68, m	129.8	6.52, d (15.6)	120.8

Die Tieffeldverschiebungen zweier außerordentlich breiter Signale im Protonenspektrum (δ = 8.4, 8.6) sprach dafür, dass, wie bei den Vergleichsverbindungen, das Polyenelement in ein aromatisches, stickstoffhaltiges Ringsystem übergeht. Aus der Summenformel war bereits ersichtlich, dass entweder die Polyenkette um eine Einheit länger sein musste, als die der Auxarkonjugatine, oder anstatt eines Pyrrols zum Beispiel ein Pyridinrest vorlag.
Aus der Lage der Absorptionsmaxima im UV-Spektrum und der molaren Extinktion kann anhand von Tabellenwerten auf die Anzahl der Doppelbindungen eines Polyens geschlossen werden.[128] Die für NTK-250 A ermittelten Werte ließen sich allerdings nicht mit den Tabellenwerten vergleichen. Dies kann zum Beispiel auf die Konjugation zum Heteroaromaten zurückzuführen sein. Außerdem standen lediglich Vergleichswerte aus Messungen in Benzol zur Verfügung, während **74**/**75** ausschließlich in Dichlormethan löslich ist. Lösungsmittelbedingte Effekte und das Vorliegen der Isomerie könnten eine solche Auswertung ebenfalls behindern.

Das heteroaromatische Strukturelement aufzuklären gestaltete sich schwierig, da die entsprechenden Signale mit denen des Isomers überlagerten und die Kopplungsmuster nicht zu erkennen waren. Die beiden Signale bei δ = 8.4 und 8.6 zeigten HSQC-Korrelationen zu dem selben Kohlenstoffsignal (δ = 147.9), und anhand der relativen Intensitäten war nicht zu entscheiden, ob beide Signale beiden Isomeren zuzuordnen waren oder je eines für zwei Protonen des selben Isomers stand.
Anhand von Korrelationen im COSY-NMR-Spektrum zu diesen Signalen, wurden dem heteroaromatischen Strukturelement zwei weitere Signale zugeordnet. Das Erste (δ = 7.78) spaltete mit ^3J = 8.0 Hz zum Dublett auf. Diese Kopplungskonstante deutet auf einen Pyridinring hin, da für ein Pyrrol kleinere Kopplungen von $^3J \cong 3$ Hz zu erwarten sind.[129] Das zweite Signal trat als breites Singulett bei δ = 7.30 auf. Auch für diese beiden Signale stand nicht fest, ob sie jeweils für zwei Protonen des selben Isomers standen oder von je einem Proton beider Isomere stammten. Es konnte also weder aus dem Kopplungsmuster noch von den Signalintensitäten auf das Substitutionsmuster am Aromaten geschlossen werden.
Die COSY-Korrelation zwischen den Protonen bei δ = 7.78 und 7.30 deutete darauf hin, dass beide Signale aus beiden Isomeren stammten. Das wiederum bedeutete, dass kein symmetrischer Pyridinrest vorliegen konnte. Die Korrelationen, die zu dieser Schlussfolgerung führten sind in Abbildung 60 dargestellt.

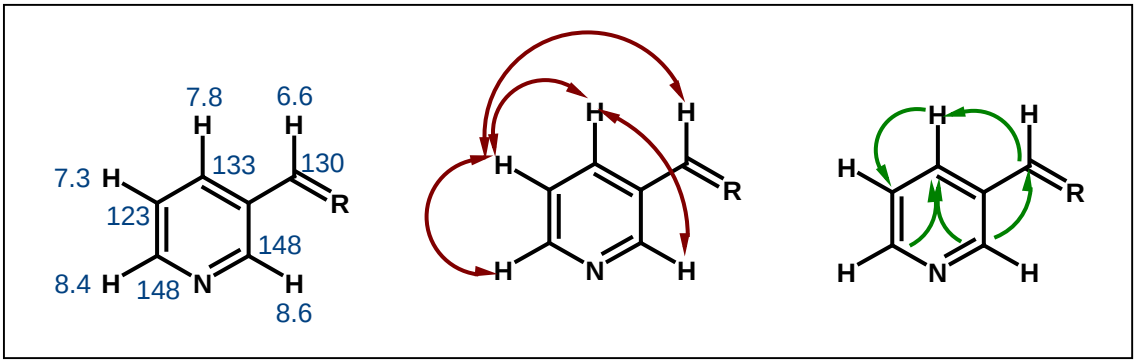


Abbildung 60: Pyridinrest; Links**:** Chemische Verschiebung [ppm], Mitte: COSY-NMR-Korrelationen, Rechts: HMBC-NMR-Korrelationen.

Auch die entsprechenden Verschiebungen der dazugehörigen ^{13}C-NMR-Signale (δ = 147.9, 133.4 und 123.0) und die HMBC-Korrelationen sprachen für dieses Strukturelement. Das quartäre Kohlenstoffatom des Rings fand jedoch keine Entsprechung im ^{13}C-NMR-Spektrum und war auch nicht durch Korrelationen im HMBC-NMR-Spektrum auszumachen. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit denen des Naturstoffs Naveonon A (**83**) ünterstützte die Vermutung, dass ein Pyridinrest vorliegt. Es ist allerdings nicht zu erklären, warum das Signal bei δ = 7.3 als breites Singulett erschien und nicht zum Dublett vom Dublett aufspaltete.

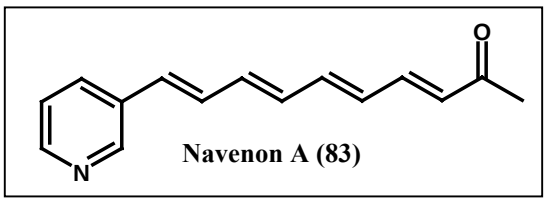
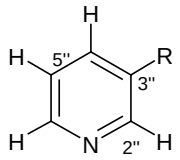


Tabelle 10: Vergleich der NMR-Daten des Pyridinrests von **74/75** und **83**.

	**NTK-250 A** [CD_2Cl_2]		**Navenon A**[130] [$CDCl_3$]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2’’	8.64, bs	147.9	8.60, s	148.4
3’’	-	-	-	132.0
4’’	7.78, d (8.0 Hz)	133.4	7.75, d (8.0 Hz)	132.7
5’’	7.30, bs	124.1	7.26, dd (8,5 Hz)	123.5
6’’	8.44, bs	147.9	8.45, d (5.0 Hz)	148.7

Es blieb noch zu klären, in welcher Konfigurationsabfolge die Doppelbindungen vorliegen und an welcher Position der Kette die Methylgruppe lokalisiert ist. Eine Position direkt neben dem Pyron wie im Rumbrin (**82**) konnte ausgeschlossen werden, da keinerlei HMBC-Korrelationen zum Ring bestanden, jedoch weitreichende andere Korrelationen zu beobachten waren. Die bestmögliche Interpretation der vorliegenden Daten spiegelt sich in Abbildung 61 wieder.

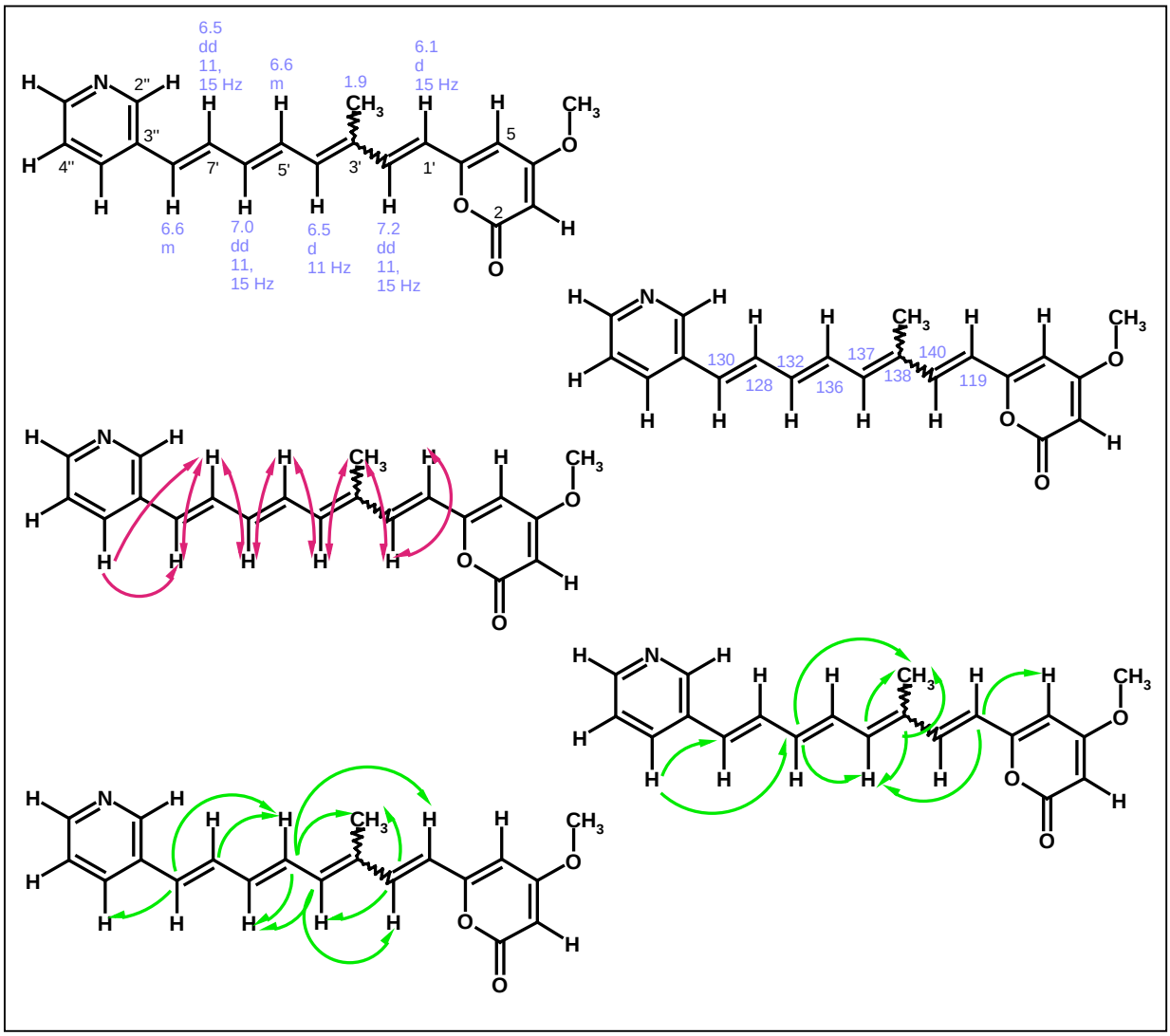


Abbildung 61: Strukturaufklärung des Polyenfragments; Blau: Chemische Verschiebung [ppm] und Kopplungskonstanten, Rot: COSY-NMR-Korrelationen, Grün: HMBC-NMR-Korrelationen.

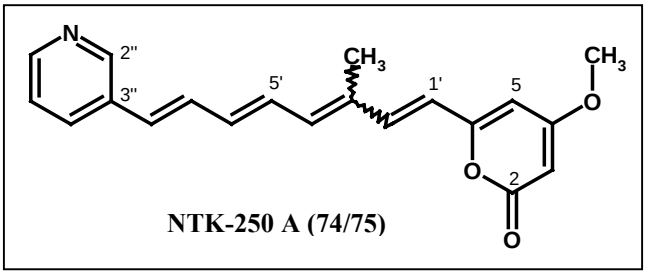
Es ist zu erkennen, dass HMBC-Korrelationen nicht nur als ^{3}J-, sondern auch als ^{2}J-Kopplungen oder Fernkopplungen interpretiert werden müssten. Besonders unwahrscheinlich erscheint die Korrelation von C-7' zu 1'-H, die über sechs Bindungen reicht. Eine Interpretation, in der die entsprechenden Kohlenstoffatome näher zueinander stehen, würde jedoch mehrere Fernkopplungen im COSY- und HMBC-NMR-Spektrum erfordern.

Um besser aufgelöste Signale zu erhalten, bot es sich an, NTK-250 A in einem aromatischen Lösungsmittel erneut zu vermessen. Hierbei entstehen spezifische Assoziate mit dem Lösungsmittel, die durch Anisotropieeffekte eine Veränderung der relativen chemischen Verschiebung erzeugen.[131] Wie bereits beschrieben, ist **74/75** in Benzol unlöslich. In Pyridin hingegen zersetzte sich die Substanz.

Die Struktur der Minderkomponente wurde anhand von Analogien zur der Hauptsubstanz ermittelt. Auch bei der Minderkomponente ließen sich die immerwiederkehrenden Aufspaltungsmustern zum Dublett vom Dublett mit ca. 11 und 15 Hz beobachten. Die Protonen sind demnach auch hier jeweils *trans*-ständig, Es konnte also davon ausgegangen werden, dass eine Isomerie nur an C-3', an das die Methylgruppe gebunden ist, vorliegen kann. Es ließ sich allerdings nicht zuordnen in welcher der Konfigurationen jeweils die Hauptkomponente bzw. die Nebenkomponente vorliegt.

Tabelle 11: Chemische Verschiebungen der NTK-250 A Komponenten in CD_2Cl_2.

Nr.	**NTK-250 A (74)** Hauptkomponente		**NTK-250 A (75)** Nebenkomponente	
	δ_H (Hz)	**δ_C**	**δ_H (Hz)**	**δ_C**
2		171.3		171.3
3	5.41, d (2.0)	88.7	5.43, d (2.0)	88.8
OCH_3	3.79, d (2.0)	56.3	3.78, d (2.0)	56.3
4		160.6		160.6
5	5.89, d (2.0)	101.1	5.86, d (2.0)	101.2
6		159.2		159.0
1'	6.12, d (16.0)	118.6	6.14, d (16.0)	122.3
2'	7.18, d (16.0)	139.6	7.18, d (16.0)	136.1
3'		137.6		137.6
3'-CH_3	1.98, s	12.6	2.02, s	12.9
4'	6.48, d (11.0)	136.8	6.42, d (11.0)	134.3
5'	6.55-6.68, m	135.9	6.55-6.68, m	142.8
6'	7.02, dd (11.0, 15.0)	131.6	6.77, dd (11.0, 15.0)	131.0
7'	6.48, dd (11.0,15.0)	127.9	7.24, dd (11.0,15.0)	127.6
8'	6.55-6.68, m	129.8	6.55-6.68, m	130.2
2''	8.64, bs	147.9	8.64, bs	147.9
3''		n.b.		n.b.
4''	7.78, d (8.0)	133.4	7.78, d (8.0)	133.5
5''	7.30, bs	124.1	7.30, bs	124.1
6''	8.44, bs	147.9	8.44, bs	147.9



Es ist beschrieben, dass Auxarconjugatin A (**78**) mit seinem all-*trans*-konfigurierten Isomer (**79**) im Gleichgewicht vorliegt.[132] Ein ähnliches Gleichgewicht kann auch bei NTK-250 A vermutet werden.

6.3.2 NTK-250 B (76/77)

Aus einem EI-MS-Experiment ging die molare Masse von NTK-250 B mit 335 g/mol hervor. Die hochauflösende Massenspektrometrie ergab die Summenformel $C_{21}H_{21}NO_3$, welche zwölf Doppelbindungs-äquivalente implizierte.

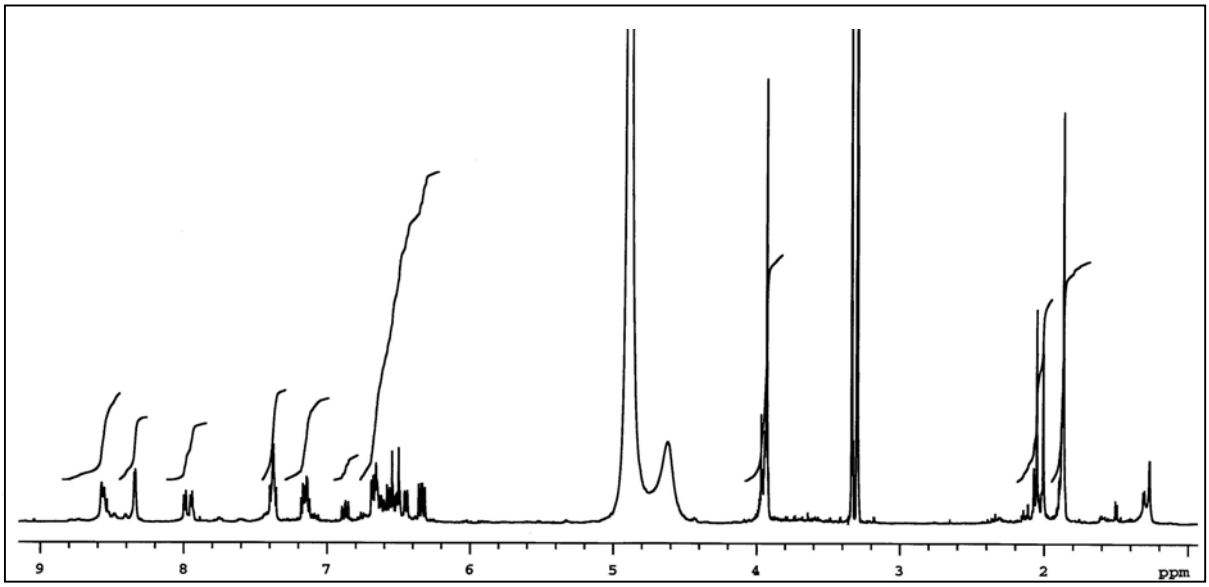
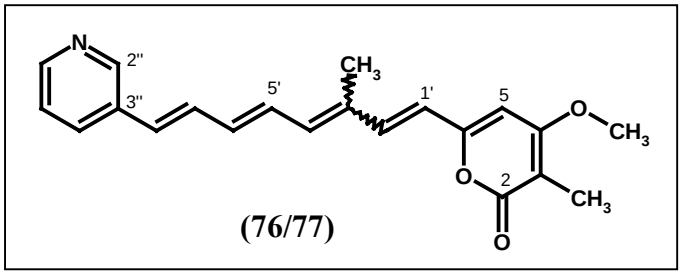


Abbildung 62: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD_2Cl_2) von NTK-250 B (**76**/**77**).

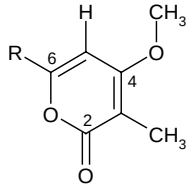
Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum ging die deutliche Ähnlichkeit zu NTK-250 B hervor. Auch hier war ein Isomerengemisch zu erkennen, welches offensichtlich im Verhältnis **76**:**77** = 1:1 vorlag. Vermutlich aufgrund der geringen Substanzmenge fehlten im HSQC-NMR-Spektrum einige Korrelationen. So waren zunächst aus dem HSQC-Experiment lediglich drei Methylgruppen und zehn Methingruppen zu identifizieren. Der Summenformel nach fehlten

also fünf Methingruppen. Eine schlüssige Auswertung ließ sich allein aus den NMR-Spektren dieser Substanz also nicht bewerkstelligen. Die Struktur von **76/77** wurde daher anhand von Analogien zu der zuvor identifizierten Struktur von **74/75** abgeleitet.



Anhand von HMBC-NMR-Korrelationen zu C-2 und C-5 des α-Pyronrings konnte die Position der zusätzlichen Methylgruppe ($\delta_H = 1.88$, $\delta_C = 8.73$) an C-3 festgestellt werden. Der Vergleich der NMR-Daten zu denen von Auxarkonjugatin C (**81**) unterstützte diese Annahme.

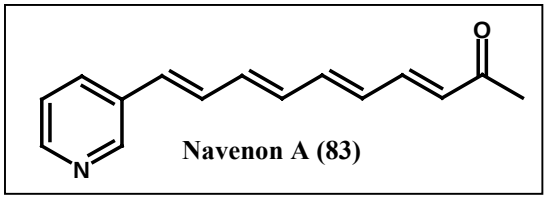
Tabelle 12: Vergleich der Chemischen Verschiebungen des Pyrons aus **76/77** und **81**.

	**NTK-250 B** [CD_3OD]		**Auxarconjugatin C**[132] [d_6-Dmso]	
	δ_H (Hz)	**δ_C**	**δ_H (Hz)**	**δ_C**
2		168.9		163.1
3		102.7		100.8
3-CH_3	1.88, s	8.7	1.82, s	8.5
4		159.4		165.7
OCH_3	3.94, s	57.3	3.90, s	56.4
5	6.53, s	97.5	6.58, s	96.0
6		148.7		157.0

6.3.3 Diskussion

Die Struktur der Pyridinyl-octatetraenyl-pyrone kann nur als Strukturvorschlag formuliert werden. Die NMR-Informationen beinhalten Unsicherheiten, die bisher nicht zu klären waren. Die Überlagerung der Signale bedeuten große Schwierigkeiten bei der Interpretation der Spektren. Oftmals ist nicht zu erkennen, ob zwei Signale der Isomeren benachbart sind oder ob eine Aufspaltung eines Signals durch eine ^3J-Kopplung vorliegt. Durch Vergleichsmessungen an einem Spektrometer mit geringerer Frequenz könnten diese Unterscheidungen getroffen werden, da sich Verschiebungen dabei geringfügig ändern würden, Kopplungskonstanten aber gleich blieben.[129] Da die Substanzen sich jedoch bei dem Versuch sie in Pyridin zu vermessen zersetzten war dieses nicht mehr möglich.

Bei Navenon A, einem Pyridinyl-decatetraenon, konnte das Problem der sich überlagernden Signale durch Zusatz von $Eu(fod)_3$ zur NMR-Probe gelöst werden. Die Signale erschienen separiert und ließen sich somit auswerten.[133]



Navenon A (83)

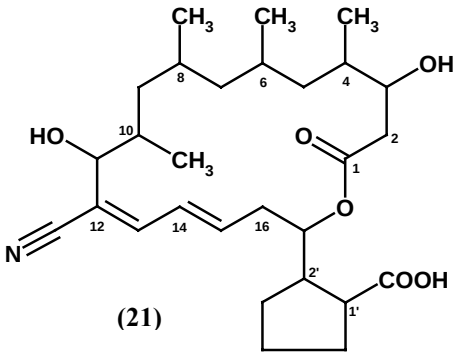
Die Konfiguration an C-3' ließe sich mittels NOESY-NMR-Spektren bestimmen. Korrelationen zu dem Proton auf der gleichen Seite der Kette wären zu erwarten. Außerdem könnte durch Korrelationen mit umgekehrter Phase zwischen den entsprechenden Signalen (zum Beispiel der Methylgruppe oder der benachbarten Protonen) der Übergang von einem Isomer in das andere sichtbar gemacht werden. Dazu sollte die Umwandlungsgeschwindigkeit in der NMR-Zeitskala liegen. Anhand der Vergleichbarkeit mit Retinol kann eine Energiebarriere von ca. 4-6 kJ/mol erwartet werden.[134] Dies ließe eine Umwandlung innerhalb der NMR-Zeitskala zu.[135]

^4J-^{1}H-^{1}H-Kopplungen zur Methylgruppe hätten Hinweise über die Konfiguration an C-3' geben können.[136] In den vorhandenen Spektren waren jedoch keine zu erkennen.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

7.1 Borrelidin (21)

Die Biosynthese von *trans*-Cyclopentandicarbonsäure (CPDA) (**24**), der Startereinheit des Borrelidins (**21**), wurde untersucht. Hierzu fanden Fütterungsexperimente mit verschiedenen isotopenmarkierten Vorläufern statt. Fütterungen von [3,5-$^{13}C_2$]Tyrosin und [U-$^{13}C_9$]Tyrosin bewiesen, dass CPDA nicht, wie von P. F. LEADLAY und J. A. SALAS[52] postuliert, direkt aus Tyrosin hervorgeht. Auch die Genese aus Glucose konnte ausgeschlossen werden.



(21)

Glycerin hingegen konnte durch erfolgreichen Einbau und deutliche Ausbeutesteigerung als Vorläufer der CPDA identifiziert werden.

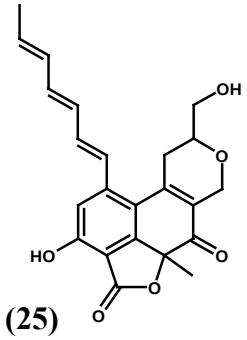
Die Startereinheit kann anhand der Fütterungsergebnisse in zwei Bereiche mit unterschiedlicher Biogenese unterteilt werden. C-3', C-4' und C-5' bilden die erste (untere) Einheit. Sie kann aus Acetat sowie Glycerin aufgebaut werden, und die Fütterungsergebnisse zeigen, dass sie über eine symmetrische Zwischenstufe entsteht. Die zweite (obere) Einheit umfasst C-17, C-2', C-1' und die Carboxylgruppe. Die Ergebnisse der Fütterungen von [U-$^{13}C_9$]Tyrosin und [1,4-$^{13}C_2$]Bernsteinsäure zeigen, dass die Biosynthese der C_4-Einheit eng mit Fumarat verknüpft sein muss. Auch die obere Einheit nimmt Glycerin in Form zweier C_2-Einheiten (C-17/C-2' und C-1'/COOH) auf.

Ein genauer Biosyntheseweg für die *trans*-Cyclopentandicarbonsäure steht noch aus.

7.2 Metabolite endophytischer Pilze

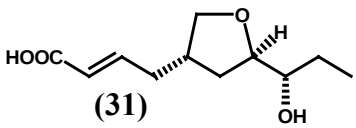
Aus marinen Algen konnten fünf endosymbiontisch lebende Pilze isoliert werden. Diese wurden in das BMBF Verbundprojekt *„Endophytische Pilze aus Algen und Pflanzen verschiedener Meeresbiotope“* integriert und dem Biologisch/Chemischen Screening, erweitert um das OSMAC-Verfahren, unterzogen. Anhand der Ergebnisse des Chemischen Screenings wurden vier Stämme zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

Aus *Epicoccum purpurascens* Kornati 1a wurde der bekannte Pilzmetabolit Acetosellin (**25**) isoliert. Die Struktur des 1983 beschriebenen *Epicoccum purpurascens naphtopyran* (**26**) konnte aus dem biosynthetischen Zusammenhang heraus zu Acetosellin berichtigt werden



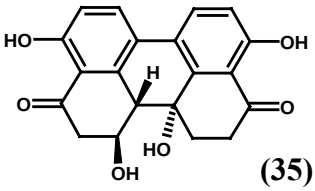
(25)

Aus *Nodulosporum* sp. Kornati 1b konnte mit Communiol B (**31**) ein seltenes 1,4-substituiertes Furan isoliert werden.

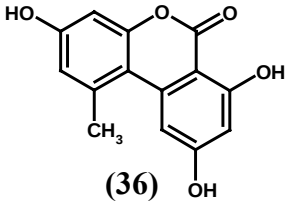


(31)

Aus *Alternaria* sp. Kornati 3c wurden mit Alternariol (**36**) und Altertoxin I (**35**) gattungstypische, toxische Sekundärstoffe isoliert. Allantoin (**38**) ging ebenfalls aus diesem Stamm hervor.



(35)

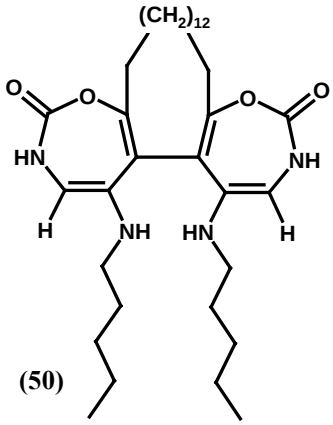


(36)

Innerhalb dieses Projekts wurde für den Stamm Aspergillus niger Gozo 14 mittels HPLC-MS/DAD- Analyse ein Profil der gebildeten Aflatoxine erstellt.

7.3 Glaukothalin

Der blaue Farbstoff Glaukothalin (**50**) stammt aus dem marinen Bakterium *Rheinheimera baltica* spp. (Stamm HP1). Durch gezielte Variationen der Kultivierungsbedingungen und Entwicklung einer neuen Isolierungsstrategie konnte die Ausbeute des Farbstoffs um das Fünfzigfache auf 3 mg/L gesteigert werden. Dies bildete die Grundlage, um die von M. THORWEST vorgeschlagene Struktur zu überarbeiten. Mit Hilfe verschiedener Techniken der Massen-Spektrometrie konnte eine neue



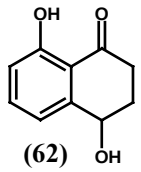
(50)

Summenformel ($C_{34}H_{56}N_4O_4$) ermittelt werden. Unter Zuhilfenahme zusätzlicher NMR-Spektren, einschließlich ^{15}N-HSQC und –HMBC, und der Programme Web-COCON und ACD-LABS wurde ein neuer Strukturvorschlag entwickelt. Dieser beschreibt ein symmetrisches Dimer aus zwei Siebenringcarbamaten mit Aminopentylseitenkette. Diese Strukturlemente sind über eine aliphatische C_{14}-Kette verbrückt. Glaukothalin stellt eine völlig neuartige Strukturklasse dar.

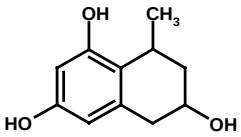
7.4 Pilzliche Melaninbiosynthese

Die Melaninbiosynthese in S*ordaria macrospora* erfolgt über den bekannten Dihydroxynaphthalinweg. Zur Identifizierung von Zwischen- und Nebenprodukten dieses Biosyntheseweges wurden die Metabolitenspektren des Wildtyps sowie zweier melaninfreier Mutanten eingehend untersucht und verglichen.

Der Einsatz der Enzyminhibitoren Fthalid (**58**) und Tricyclazol (**57**) am Wildtyp hatte eine Hemmung der Melaninbiosynthese zur Folge und unterstützte die Isolierung von Metaboliten. Mit Isoscleron (**62**) und Feroxidin (**64**) konnten zwei eng mit der Melaninbiosynthese verknüpfte Nebenprodukte isoliert werden. Rückschließend aus diesen Experimenten konnte für Feroxidin die Genese aus Tetrahydroxynaphthalin (**52**) formuliert werden, wohingegen in der Literatur bisher ein Hexaketid als Vorläufer postuliert wurde.

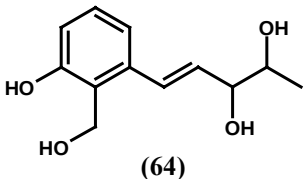


(62)

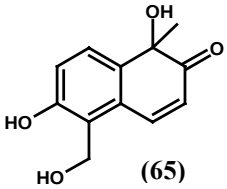


(63)

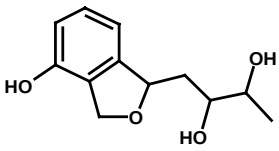
Des Weiteren wurden im Zuge der Charakterisierung des Stammes dessen Hauptmetabolite isoliert. Hierbei handelte es sich um Sordariol (**64**) und zwei zyklisierte Derivate (**65**, **66**).



(64)



(65)

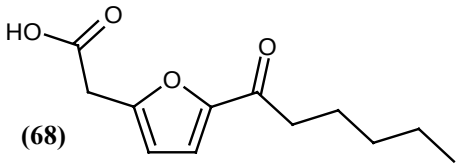


(66)

7.5 Sekundärmetabolite aus Actinomyceten

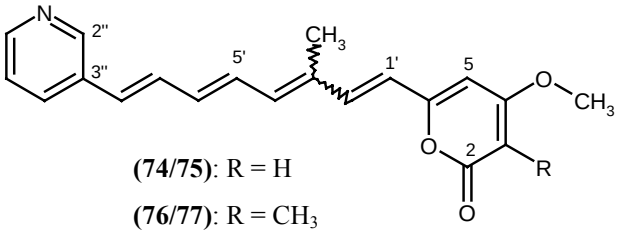
Die Strukturen von drei neuen Sekundärmetaboliten, die aus einem HPLC-DAD basierten Screening im Arbeitskreis von H.-P. FIEDLER hervorgingen, konnten aufgeklärt werden.

2-Carboxymethyl-5-(1-oxohex-1-yl)furan (**68**) ist ein 2,5-substituiertes Furan, wie es unter Naturstoffen weit verbreitet ist. Die Substituenten hingegen sind unter diesen nicht vertreten. Der Produzent dieser Verbindung, ein *Dermacoccus*-Stamm, stammt aus einer Sedimentprobe aus dem Mariannengraben.



(68)

Die Substanzen NTK-250 A (**74**) und B (**76**) lagen jeweils im Gleichgewicht mit einem Doppelbindungsisomer vor. Die Strukturen konnten aus den Mischspektren der Isomere heraus aufgeklärt werden. Es handelt sich um Pyridinyl-octatetraenyl-pyrone, die Ähnlichkeiten zu den Auxarconjugatinen (**78-81**) und Rumbrin (**82**) zeigen.



(74/75): R = H

(76/77): R = CH_3

B EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeines

1.1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren:

EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak (I = 100 %) und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas NH_3. **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla bzw. Bruker Daltonics (AWI), **APCI-MS** (microTOF) Bruker Daltonics (AWI).

Infrarotspektren (IR):

Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 1600 als KBr-Presslinge gemessen, sh = Schulter.

Elektronenspektren (UV):

Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Fa. *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ε hat die Dimension [1000 cm^2 mol^{-1}], sh = Schulter; Lösungsmittel/HCl bzw. Lösungsmittel/NaOH: Zu 2 mL Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH gegeben.

Drehwerte:

Alle Drehwerte wurden mit einem Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 343 bestimmt, die Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in [10^{-1} deg cm^2/g] angegeben, die Konzentrationen c in [10^{-2} g/ml], Referenz: Natrium D-Linie (589 nm).

^{1}H-NMR-Spektren:

Varian Inova-600 (600 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Unity-300 (300 MHz), *Bruker* Avance-600. Chemische Verschiebungen in δ-Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz (Hz).

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, ddt = Dublett vom Dublett vom Triplett, dt = Dublett vom Triplett, t = Triplett, td = Triplett vom Dublett, q = Quartett, qd = Quartett vom Dublett, quint = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett, br = breit.

Alle ^{1}H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

^{13}C-NMR-Spektren:

Varian Inova-600 (150.8 MHz), *Varian* Inova-500 (125.7 MHz), *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz), *Varian* Unity-300 (75.5 MHz), *Bruker* Avance-600. Chemische Verschiebungen in δ-Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard.

^{13}C-^{1}H-Multiplizitäten sind aus HSQC- und APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

^{15}N-HMBC:

Bruker Avance-600.

2D-NMR-Spektren:

^{1}H,^{1}H-COSY (**^{1}H,^{1}H-Co**rrelated **S**pectroscop**y**), **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingular **Q**uantum **C**oherence), **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**onnectivity), **TOCSY** (**To**tal **C**orrelation **S**pectroscop**y**), **1,1- Adequate**.

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC):

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

Sprühreagenzien:

Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.[iii] Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120°C erwärmt.

Anisaldehyd (**Anis**, Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd wird in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Ehrlichs Reagenz (**Ehrlich**, Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

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

Säulen- und Gelchromatographie:

ICN Kieselgel 60 (KG), 32–63 µm, *Fluka* Sephadex® LH-20.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Analytische HPLC:

Pumpe: K*ontron* 322; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360; Diode-Array-Detektor: *Kontron* 440; Autosampler: *Kontron* 360 mit analytischer Aufgabeschleife; Software*: Kontron* Kromasystem 2000™ Version 1.60.

Säule A: *Jasco* Nucleosil 100 C-18, 5 µm, 250 x 3 mm, Flussrate 0.5 mL/min.

Säule B: Kromasil 100 C-18, 5 µm, 250 x 3 mm, Flussrate 0.5 mL/min.

Säule C: *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm.

Programm 1: 15 % Acetonitril auf 100 % Acetonitril in Wasser +0.1 % TFA in 20 min.

(Semi-)Präparative HPLC:

Pumpe: *Jasco* PU-1587; UV-Detektor: *Jasco* UV 1575; manuelles Probenaufgabeventil: *Rheodyne* mit 2.0 mL Aufgabeschleife; Chromatographiesoftware: *Jasco* Borwin; Steuersoftware: *Jasco* Borwin HSS-1500;

Säule D: *Jasco* Nucleosil 100 C-8, 5µm, 250 x 8 mm, Flussrate 2.5 mL/min.

Säule E: Kromasil, C-18, 5µm, 250 x 8 mm, Flussrate 2.5 mL/min.

Säule F: Nucleosil 100 C-8, 5µm, 250 x 20 mm, Flussrate 17.0 mL/min.

[iii] MERCK, *Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie*, E. MERCK, Darmstadt, **1998**.

Programm 2: 55 % Acetonitril in H_2O isokratisch.

LC-MS:

Pumpe: *Flux Instruments* Rheos 4000; Autosampler: *Jasco* AS-851 (0–100 µL variable Aufgabeschleife); UV-Detektor: *Linear* UVIS-205; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Steuersoftware HPLC: *Flux Instruments* Janeiro; Datensystem: *Finnigan* Xcalibur; Vorsäule: *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm;

Säule: *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm.

Programm: 20 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 10 min 100 % Methanol;

Flussrate: 300 µL/min; UV-Detektion: 254 nm, Massendetektion: positive und negative Ionen.

Lösungsmittel:

Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und bidestilliertes Wasser verwendet. Lösungsmittel für die semipräparative HPLC wurden im Ultraschallbad (5 min) und durch anschließendes Durchleiten von Helium (5 min) entgast.

1.3 Mikrobiologische Methoden

Nährmedienbestandteile:

Fluca: Malzextrakt

Roth: Caseinpepton, Stärke, α-D(+)-Glucose

Merck: Caseinpepton, $CaCO_3$, α-D(+)-Glucose

Oxoid: Hefeextrakt, Fleischextrakt, Hefeextrakt

Marcor: Cornsteep Powder

VWR: D-(–)-Mannit

Applichem: Glycerin, $CaCO_3$

Quickvital: Haferkleie mit Keim

Difco: Agar, Trypton, MB 2216

Henselwerk GmbH: Sojamehl fettarm

Dachser: Biomalz

Nährmedien:

Für alle Nährmedien wurde soweit nicht anders beschrieben demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 M NaOH bzw. 0.5 M HCl eingestellt. Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121°C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

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).

$M2^+$: Malzextrakt (10 g/L), Hefeextrakt (4 g/L), Glucose (4 g/L), $CaCO_3$ (0.5 g/L), pH = 7.0; für die Stammhaltung Zusatz von Agar (20 g/L).

SM: Entfettetes Sojamehl (20 g/L), D-(–)-Mannit (20 g/L), pH = 7.3.

Ha: Haferkleie (20 g/L), pH = 7.0.

SGG: Glucose (10 g/L), Glycerin (10 g/L), Stärke (10 g/L), Cornsteep Powder (2.5 g/L), Caseinpepton (5 g/L), Hefeextrakt (2 g/L), NaCl (1 g/L), $CaCO_3$ (3 g/L), pH = 7.0.

G20: Glycerin (20 g/L), Malzextreakt (10 g/L), Hefeextrakt (4 g/L).

LB: Hefeextrakt (5 g/L), Trypton (10 g/L), NaCL (0.5 g/L).

LB^{++}: Hefeextrakt (5 g/L), Trypton (10 g/L), NaCL (20 g/L), $MgCl_2$ (5.9 g/L), $MgSO_4$ (3.2 g/L), $CaCl_2$ (1.8 g/L), KCl (0.55 g/L), KBr (0.1 g/L).

MB2216: MB2216 (37.4 g/L).

E2: Glucose(20 g/L), Hafermehl (20 g/L), entfettetes Sojamehl (20 g/L).

1158: Malzextrakt (20 g/L), Glucose (10 g/L), Hefeextrakt (2 g/L), $(NH_4)_2HPO_4$, pH = 6.0.

1549: Glucose (30 g/L), $NaNO_3$ (3 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g/L), KCl (0.5 g/L), $FeSO_4$ (0.01 g/L).

SWG: Westergard's Stammlösung (200 mL/L), Arginin (1 g/L), Glucose (20 g/L), lösliche Stärke (40 g/L), Biotin Stammlösung (1 mL/L), pH = 6.5.

Westergard's Stammlösung: KNO_3 (5 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $MgSO_4$*7 H_2O (2.5 g/L), NaCl (0.5 g/L), $CaCl_2$ (0.5 g/L), Spurenelementlösung (0.5 ml/L).

Spurenelementlösung: Zitronensäure (46 g/L), $ZnSO_4$*7 H_2O (50 g/L), $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$*6 H_2O (10 g/L), $CuSO_4$*5 H_2O (2.5 g/L), $MnSO_4$*H_2O (0.5 g/L), H_3BO_4 (0.5 g/L), Na_2MoO_4*2 H_2O (0.5 g/L).

BMM: Maismehl (25 g/L) [bei 60°C über Nacht gerührt und dann abfiltriert], Biomalz (8 g/L), pH = 6.5.

Celite: *Diatomite*.

Enzyminhibitoren:

Sigma Aldrich: Tricyclazol PESTANAL®, 99.7%

Kukeha Chemical Industry CO, LTD: Fthalid, 99.9%

Isotopenmarkierte Verbindungen:

Alle verwendeten Verbindungen waren, soweit nicht anders angegeben, zu 99 % isotopenmarkiert und wurden bezogen von:

Chemotrade GmbH: [U-$^{13}C_3$]Glycerin, [2-^{13}C]Malonsäure, [3,5-$^{13}C_2$]Tyrosin, [U-$^{13}C_6$]Glucose, [U$^{13}C_9$]Tyrosin (98%)

Cambridge Isotope Laboratories Inc.: Na-[1,2-$^{13}C_2$]Acetat

Eurisotop: [1,4-$^{13}C_2$]Bernsteinsäure

H. Floss: (*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin (69%ee), (*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin (16%ee)

Schüttler und Fermenter:

Braun Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat® RM, Querschüttlebrett, gebaut: *Universität Göttingen*, *Braun* Certomat® BS1, *Braun* [Certmoat® U /Certomat® HR], 10 L-Airlift-Fermenter, gebaut: *Uni Dortmund*.

Zentrifugen:

Sigma 4K10, Sigma 5K.

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex super RK 106.

Ultra-Turrax:

IKA® Werke, T 50 Basic.

Plattendiffusionstest:

Auf die mit den verschiedenen Testkeimen angeimpfte Agarplatte wurden Filterplättchen (Durchmesser: 6 mm, Dicke: 0.5 mm) gelegt, die mit 15 µL Substanzlösung (in Methanol oder Chloroform gelöst, c = 1 mg/mL) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Als Testkeime dienten *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* und *Candida albicans*. Die Agarplatten wurden 24 h bei 25°C (*C. albicans*) bzw. 37°C (*B. subtilis*, *E. coli* und *S. aureus*) inkubiert.

Zusammensetzung der Nährböden für die Plattendiffusionstests:

Bac. subt. und *E. coli*: Glucose (5 g/L), Trinatriumcitrat x 2 H_2O (0.5 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), K_2HPO_4 (7 g/L), $MgSO_4$ x 7 H_2O (0.1 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1 g/L) und Agar (15 g/L), keine pH-Einstellung.

Staph. aureus.: Bacto Nutrient Broth (8 g/L), NaCl (5 g/L) und Agar (15 g/L), keine pH-Einstellung.

Cand. albicans: Hefeextrakt (4 g/L), Malzextrakt (10 g/L), Glucose (4 g/L) und Agar (15 g/L), pH = 5.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach der 30minütigen Sterilisation hinzugegeben.

2 Biosynthese von Borrelidin (21)

2.1 Stammhaltung

2.1.1 Agarplatten

Die Haltung des Stammes Streptomyces sp. S1495 erfolgte in Petrischalen mit $M2^+$-Medium (2 % Agar), welche 7 d bei 28 °C inkubiert und bei 8 °C maximal drei Monate lagerten.

2.1.2 Langzeitkonservierung

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden Agarstückchen mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Halmen aus Polypropylen ausgestanzt. Diese wurden in einen zweiten Halm gesteckt, der, mit einer ausgeglühten Tiegelzange an beiden Seiten zugeschmolzen, der sterilen Aufbewahrung diente. Die Lagerung erfolgte in einem Dewar über flüssigem Stickstoff bei – 196 °C.

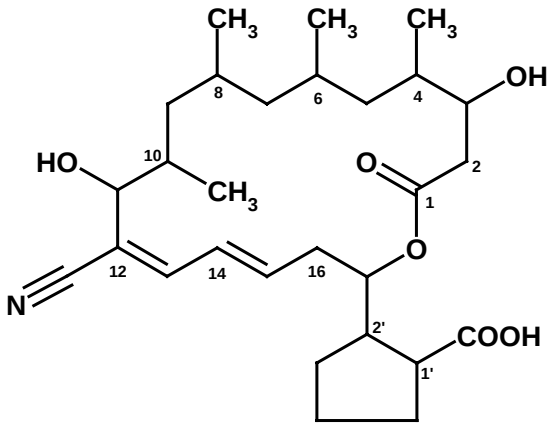
2.2 Kultivierung

Der Stamm S1495 wurde in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffkappen in 100 mL SM-Medium bei 28°C und 180 rpm über 60 h kultiviert. Die Kulturbrühe, versetzt mit Celite, ließ sich durch Vakuumfiltration in Mycel und Kulturfiltrat trennen. Das Mycel wurde

verworfen, während der pH-Wert des Kulturfiltrats auf 4.5 eingestellt wurde, wonach dessen Extraktion mit dreimal equivalentem Volumen Ethylacetat erfolgte.

2.3 Isolierung und Charakterisierung

Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel (CH_2Cl_2/MeOH 9:1, 15 x 5 cm) chromatographiert. Durch anschließende Reinigung mittels semipräparativer HPLC (Säule D, Programm 2) konnten zwischen 2 und 11 mg Borrelidin (**21**) erhalten werden.



Weißer Feststoff

$C_{28}H_{43}NO_6$ (489.65 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: grün-grau (Anis).

R_f = 0.54 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

ESI-MS: *m/z* = 512 $[M+Na]^+$, 534 $[2M+Na-H]^+$.

HR-ESI-MS: *m/z* = 512.2682 $[M+Na]^+$.

Berechnet: m/z = 512.29836 (Δ = 0.20 ppm).

$[\alpha]_D^{20}$ = +67° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3435, 2958, 2924, 2213, 1709, 1636, 1560, 1458, 1411, 1382, 1268 (sh) 1187, 1042, 973, 756 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 0.77 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, 9-H_a), 0.83 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, 8-CH_3), 0.84 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, 6-CH_3), 0.85 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 4-CH_3), 0.95 (ddd, *J* = 12.5, 6.0, 3.5 Hz, 1H, 7-H_a), 0.97 (m, 1H, 5-H_a), 1.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 10-CH_3), 1.05 (ddd, *J* = 12.5, 2.5, 2.5 Hz, 1H, 7-H_b), 1.21 (m, 2H, 9-H_b, 5-H_b), 1.38 (ddt, *J* = 8.0, 8.0, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 1.59-1.66 (m, 1H, 8-H), 1.70-7.74 (m, 1H, 4'-H_a), 1.76-1.87 (m, 5H, 10-H, 6-H, 4-H, 4'-H_b, 5'-H_a), 1.94-2.01 (m, 2H, 3'-H_b, 4'-H_b), 2.22 (dd, *J* = 16.5, 10.5 Hz, 1H, 2-H_a), 2.37 (dt, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 2.43 (dd, *J* = 16.5, 3.5 Hz, 1H, 2-H_b), 2.49-2.54 (m, 1H, 16-H_a), 2.55 (ddd, *J* = 15.0, 5.0, 4.5 Hz, 1H, 16-H_b), 2.67 (ddt, *J* = 11.0, 8.0, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.92 (ddd, *J* = 10.5, 4.0, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 4.17 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 11-H), 4.97 (dt, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 1H, 17-H), 6.33 (ddd, *J* = 15.0, 10.0, 4.5 Hz, 1H, 15-H), 6.57 (dd, *J* = 10.0, 15.0 Hz, 1H, 14-H), 6.90 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 13-H) ppm.

^{13}C-NMR (150.8 MHz, CD_3OD): δ = 15.4 (q, C10-CH_3), 18.6 (q, C8-CH_3), 19.2 (q, C4-CH_3), 20.9 (q, C6-CH_3), 26.2 (t, C-4'), 27.6 (d, C-8), 28.5 (d, C-6), 30.6 (t, C-3'), 32.8 (t, C-5'), 36.0 (d, C-10), 36.7 (t, C-16), 37.1 (d, C-4), 38.4 (t, C-2), 39.1 (t, C-9), 44.7 (t, C-5), 47.2 (d, C-2'), 49.1 (t, C-7), 51.7 (d, C-1'), 72.9 (d, C-3), 73.0 (d, C-11), 77.7 (d, C-17), 117.3 (s, C12-CN), 119.9 (s, C-12), 128.8 (d, C-14), 140.6 (d, C-15), 145.6 (d, C-13), 173.3 (s, C-1), 181.0 (s, COOH) ppm.

2.4 Fütterung von (isotopenmarkierten) Vorläufern

Die Kultivierung und Aufarbeitung erfolgte nach B 2.2 für isotopenmarkierte Verbindungen jeweils im 1 L-Maßstab, für unmarkierte Vorläufer in je zwei Kolben à 100 mL Nährmedium. Die in 30, respektive 6 mL, sterilem, bidestilliertem Wasser gelösten Substanzen wurden zur 36., 42. und zur 48. h zu den Kulturlösungen gegeben. Die unmarkierten Säuren wurden dabei einmal in der sauren und in einer neutralisierten Lösung verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen der Vorläufer sind

Tabelle 13 zu entnehmen. Nach 60 h fand die Aufarbeitung der Kulturen statt. Die Isolierung von **21** erfolgte nach B 2.3. Im Falle der unmarkierten Vorläufer schloss sich an die Aufarbeitung eine Ausbeuteabschätzung mittels analytischer HPLC an.

Tabelle 13: Fütterungsmodalitäten.

Vorläufer	Konzentration [mmol/L]	Menge [mg/L]	Ausbeute an (**21**) [mg]
Bernsteinsäure	3	354	10%*
Bernsteinsäure	2	236	100%*
Bernsteinsäure	1	118	100%*
Fumarsäure	3	348	100%*
Glyoxalsäure	3	222	100%*
Na-[1,2-$^{13}C_2$]Acetat	6	500	2.5 / 4.9
[U-$^{13}C_6$]Glucose	6	1116	2.0
[2-^{13}C]Malonsäure	6	630	2.9
[U$^{13}C_9$]Tyrosin	2.6	500	2.4
[3,5-$^{13}C_2$]Tyrosin	2.6	500	2.2
[U-$^{13}C_3$]Glycerin	3	310	4.1
[U-$^{13}C_3$]Glycerin Glycerin unmarkiert	1 4	103 405	2.1
[U-$^{13}C_3$]Glycerin Glycerin unmarkiert	2 1	206 101	3.8
(*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin Glycerin unmarkiert	2 1	207 101	8.2
(*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$]Glycerin Glycerin unmarkiert	2 1	207 101	11.1
[1,4-$^{13}C_2$] Bernsteinsäure	2	236	2.6

Die Anreicherungen sowie die Kopplungskonstanten in Borrelidin aus den Experimenten mit isotopenmarkierten Vorläufern sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

* Relativ zu parallelen Kultivierungen ohne Zusatz, mittels HPLC-Analyse bestimmt.

Tabelle 14: Einbauraten der Einzelanreicherungen in Borrelidin (**21**).

	δ [ppm]	Einbaurate [%]			
		[2-^{13}C]-Malonat	[3,5-$^{13}C_2$]-Tyrosin	[1,4-$^{13}C_2$]-Bernsteinsäure	(*2S*)-[1,2-$^{13}C_2$] Glycerin
C-1	173.3	-0.74	-0.41	-0.10	0.58
C-2	38.4	11.33	0.53	0.15	0.00
C-3	72.9	-0.41	0.06	0.22	0.00
C-4	37.1	0.16	-0.01	-0.07	-0.03
C-5	44.7	-0,21	0.09	0.27	0.18
C-6	28.5	0.09	-0.08	-0.12	-0.05
C-7	49.1	0.29	-1.10	-0.76	0.49
C-8	27.6	0.15	-0.05	0.00	-0.02
C-9	39.1	-0.02	0.20	0.32	0.19
C-10	36.0	-0.01	-0.04	-0.06	-0.04
C-11	73.0	-0.58	-0.06	0.25	0.01
C-12	119.9	-0.42	0.00	0.00	-0.07
C-13	145.6	-0.77	-0.43	0.01	0.45
C-14	128.8	7.60	0.21	-0.05	-0.21
C-15	140.6	-0.76	-0.43	0.06	0.47
C-16	36.7	9.11	0.42	0.05	-0.20
C-17	77.7	-0.72	-0.36	0.23	0.46
COOH	181.0	-0.17	-0.52	0.71	-0.15
C-1’	51.7	-0.15	-0.84	-0.19	-0.60
C-2’	47.2	-0.24	-0.28	0.11	-0.25
C-3’	30.6	-0.29	-0.05	-0.02	0.17
C-4’	26.2	0.99	0.10	-0.03	-0.16
C-5’	32.8	-0.20	-0.07	0.03	0.08
12-CN	117.3	-0.74	-0.41	0.02	0.07
4-CH_3	19.2	-0.17	-0.14	0.15	-0.08
6-CH_3	20.9	-0.02	-0.03	-0.10	0.01
8-CH_3	18.6	0.19	0.17	-0.03	0.07
10-CH_3	15.4	-0.05	0.04	-0.14	-0.07

Tabelle 15: $^{1}J_{C\text{-}C}$-Kopplungskonstanten in Borrelidin (**21**).

	δ [ppm]	$^{1}J_{C\text{-}C}$-Kopplungskonstante [Hz]				
		[1,2-$^{13}C_2$]-Acetat	[U-$^{13}C_6$]-Glucose	[U-$^{13}C_9$]-Tyrosin	[U-$^{13}C_3$]-Glycerin	(*2R*)-[1,2-$^{13}C_2$] Glycerin
C-1	173.3	58.5	58.7	58.1	58.2	58.2
C-2	38.4	58.5	57.6	58.7	58.7	58.7
C-3	72.9					
C-4	37.1					
C-5	44.7					
C-6	28.5					
C-7	49.1					
C-8	27.6					
C-9	39.1					
C-10	36.0					
C-11	73.0					
C-12	119.9					
C-13	145.6	56.0	56.0	56.1	56.0	56.0
C-14	128.8	56.0	56.0	56.1	56.0	56.0
C-15	140.6	43.2	43.8	43.2	43.2	43.2
C-16	36.7	43.2	43.3	43.2	43.2	43.3
C-17	77.7			41.6	40.8	41.1
COOH	181.0			58.1	56.6	56.6
C-1’	51.7			31.8, 56.5	56.6	56.6
C-2’	47.2			31.8, 41.6	40.7	40.6
C-3’	30.6	32.0/32.6	32.5/32.6	32.0/32.5	32.3/32.5	32.6/32.0
C-4’	26.2	32.6	32.5	32.5	32.5	32.6
C-5’	32.8	32.0	32.6	32.0	32.3	32.0
12-CN	117.3					
4-CH_3	19.2					
6-CH_3	20.9					
8-CH_3	18.6					
10-CH_3	15.4					

3 Arbeiten an Pilzen von den Kornaten

3.1 Isolierung der Pilze

Die verwendeten Algen stammen aus dem Inselgebiet der Kornaten (Kroatien) und wurden aus etwa 1-2 m Tiefe gesammelt. Die Oberflächen der Algen wurden sterilisiert, indem sie für ca. 30 s in 70% Methanol getaucht und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen wurden. Durch Zerschneiden unter sterilen Bedingungen ließen sich die Zellzwischenräume öffnen. Die so präparierten Algenstücke wurden auf Agarplatten aufgelegt (M2 und 1158, je 250 mg/L Streptomycin und Penizillin und 2% Agar) und in dieser Form sieben Tage bei 24°C inkubiert. Zur Isolierung der Pilze fanden mehrfache Vereinzelungen über Verdünnungsausstriche der gewachsenen Kolonien statt.

3.2 Stammhaltung

3.2.1 Agarplatten

Kornati 1a, 3a und 3c wuchsen auf 1158-, Kornati 1b und 2a auf $M2^+$-Agarplatten (2% Agar). Diese wurden bei 24°C inkubiert und ließen sich bei 8°C für maximal drei Monate lagern.

3.2.2 Langzeitkonservierung

Die Langzeitkonservierung erfolgte analog zu B 2.1.2.

3.3 Durchführung des Chemischen Screenings

Das Chemische Screening fand in Ruhekulturen statt. Hierzu wurden je zwei P-Kolben mit einem Liter Medium (SGG, M2, G20, 1158 und 1549) befüllt und sterilisiert. Zur Inokulation diente 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte. Die Inkubation erfolgte über vier Wochen bei Raumtemperatur und Tageslicht. Von den so erhaltenen Kulturen wurden Mycel und Kulturfiltrat mittels Filtration getrennt. Die Erstellung des Mycelextraktes erfolgte durch Extraktion über 15 min mit Aceton im Ultraschallbad. Der pH-Wert des Kulturfiltrats wurde auf 5 eingestellt, wonach die Extraktion mit Ethylacetat erfolgte. Beide Extrakte wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt.

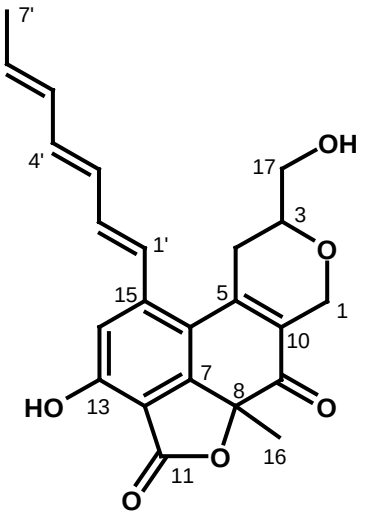
3.4 Chemisches Screening von Kornati 3a auf Acetosellinbildung

Neben den wie unter 3.3 beschrieben erhaltenen Extrakten, wurden auf die gleiche Weise Extrakte von Schüttelkulturen von Kornati 3a angefertigt. Wiederum fanden die Medien SGG, M2, G20, 1158 und 1549 Verwendung. Kulturen, die auf dem Rundschüttler (120 rpm bzw.180 rpm, 28°C, 4d) inkubierten wuchsen in 300 mL Erlenmeyerkolben (je zwei mit und zwei ohne Schikane), welche mit je 100 mL Nährlösung befüllt waren; Diejenigen, die auf dem Querschüttler (120 spm) inkubierten, in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane, befüllt mit 200 mL Nährlösung. Alle erhaltenen Extrakte unterlagen einer Untersuchung mittels HPLC-MS, wobei das aus Kornati 1a isolierte Acetosellin (**25**) als Referenz diente.

3.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Metabolite

3.5.1 Acetosellin (25)[63]

Aus dem vereinigten Mycel- und Kulturfiltratextrakt aus einer 2L-Ruhekultur von *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 1a) in SGG-Medium ließ sich **25** mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient: $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2$/MeOH 4:1, 7x20 cm) und Sephadex LH20 (MeOH, 1.5 m) in einer Ausbeute von 3.7 mg/L erhalten.



Gelber Feststoff

$C_{23}H_{22}O_6$ (394.42 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Orange fluoreszierend (366 nm).

Anfärbeverhalten: grau/blau (Anis).

R_f = 0.36 ($CHCl_3$/MeOH 9:1) schleifend.

ESI-MS: *m/z* = 417 $[M+Na]^+$, 811 $[2M+Na]^+$,
393 $[M-H]^-$, 787 $[2M-H]^-$.

HR-ESI-MS: *m/z* = 393.1344570 $[M-H]^-$.

Berechnet: *m/z* = 393.1343620 $[M-H]^-$ (Δ = 0.24 ppm).

$[\alpha]_D^{20}$ = + 235 (c=0.1, CH_3OH).

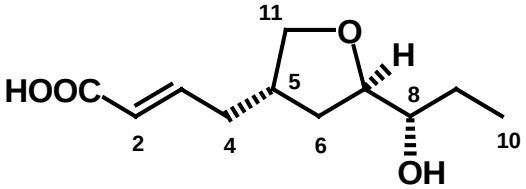
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.80 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 3H, 7'-H_3), 1.81 (s, 3H, 16-H_3), 2.66 (dt, *J* = 18.0, 1.0 Hz, 1H, 4-H_a), 2.79-2.87 (m, 1H, 4-H_b), 3.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 17-H_a), 3.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 3-H), 3.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 17-H_b), 4.33 (dt, *J* = 17.0, 3.0 Hz, 1H, 1-H_a), 4.71 (dd, *J* = 17.0, 2.0 Hz, 1H, 1-H_b), 5.85 (dq, *J* = 15.0, 7.0 Hz, 1H, 6'-H), 6.17 (ddd, *J* = 15.5, 10.0, 1.5 Hz, 5'-H), 6.34 (dd, *J* = 15.0,10.0 Hz, 1H, 3'-H), 6.40 (dd, *J* = 15.0, 10.0 Hz, 1H, 4'-H), 6.68 (dd, *J* = 15.0, 10.0 Hz, 1H, 2'-H), 6.84 (s, 1H, 14-H), 7.02 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, 1'-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 18.6 (q, C-7'), 28.6 (q, C-16), 33.4 (t, C-4), 65.3 (t, C-17), 65.5 (t, C-1), 75.4 (d, C-3), 86.6 (s, C-8), 110.3 (s, C-12), 117.5 (d, C-14), 118.0 (s, C-10), 128.6 (s, C-6), 129.8 (d, C-1'), 131.1 (d, C-3'), 132.9 (d, C-5'), 133.3 (d, C-6'), 137.2 (d, C-2'), 137.9 (d, C-4'), 146.9 (s, C-5), 147.1 (s, C-15), 157.6 (s, C-7), 158.2 (s, C-13), 168.5 (s, C-11), 197.5 (s, C-9) ppm.

3.5.2 Communiol B (31)[67]

Die Kulturfiltratextrakte aus 2L-Ruhekulturen von *Nodulosporium* sp. (Stamm Kornati 1b) aus den Medien 1549 und G20 wurden vereinigt. Nach Fraktionierung der vereinigten Extrakte an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) und Aufreinigung an Sephadex LH20 (Aceton, 1.5 m) lagen 28 mg **31** als Reinsubstanz vor. Dies entspricht einer Ausbeute von 7 mg/mL.

Farbloses Öl



$C_{11}H_{18}O_4$ (214.26 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: grün/grau (Anis).

R_f = 0.60 ($CHCl_3$/MeOH 9:1) schleifend.

ESI-MS: *m/z* = 237 $[M+Na]^+$, 451 $[2M+Na]^+$, 213 $[M-H]^-$, 427 $[2M-H]^-$.

$[\alpha]_D^{20}$ = -4 (c = 0.1, CH_2Cl_2); +93.3 (c=0.0075, CH_2Cl_2).

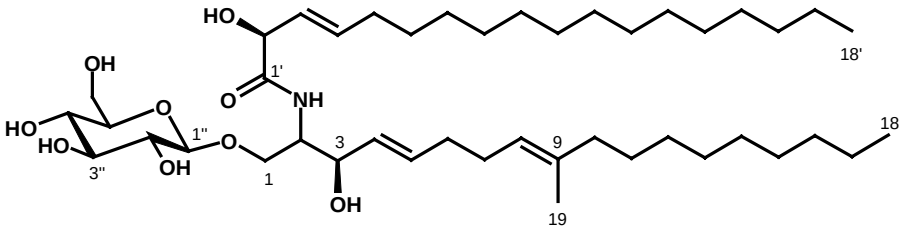
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 10-H), 1.28-1.36 (m, 1H, 9-H), 1.52-1.59 (m, 1H, 9-H), 1.62 (ddd, *J* = 6.0, 8.0, 13.0 Hz, 1H, 6-H), 2.04 (ddd, *J* = 6.5, 8.5, 13.0 Hz, 1H, 6-H), 2.24-2.33 (m, 2H, 4-H), 2.38 (m, 1H, 5-H), 3.38 (dd, *J* = 6.5, 8.5 Hz, 1H,

11-H), 3.43 (ddd, J = 4.0, 5.0, 9.0 Hz, 1H, 8-H), 3.83 (ddd, J = 5.0, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 7-H), 3.97 (dd, J = 6.5, 8.5 Hz, 1H, 11-H), 5.84 (td, J = 1.5, 15.0 Hz, 1H, 2-H), 6.91 (dt, J = 7.5, 15.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 9.3 (q, C-10), 26.1 (t, C-9), 32.0 (t, C-6), 35.2 (t, C-4), 38.0 (d, C-5), 72.7 (t, C-11), 74.29 (d, C-8), 81.6 (d, C-7), 122.5 (d, C-2), 147.5 (d, C-3), 168.6 (s, C-1) ppm.

3.5.3 Cerebrosid C (34)[60]

Der Mycelextrakt aus 2 L-Ruhekulturen von *Epicoccum purpurascens* (Stamm Kornati 3a) in SGG-Medium wurde an Kieselgel fraktioniert (Gradient: CH_2Cl_2/MeOH 9:1 zu 3:1) und eine der erhaltenen Fraktionen an Sephadex LH20 (MeOH, 1.5 m) gereinigt. Dadurch ließen sich 9.4 mg (4.7 mg/L) Cerebrosid C (**34**) erhalten.



Farbloses Öl

$C_{43}H_{79}NO_9$ (754.09 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.10 ($CHCl_3$/MeOH 9:1) schleifend.

ESI-MS: *m/z* = 755 $[M+H]^+$, 1509 $[2M+H]^+$.

$[\alpha]_D^{20}$ = -10 (c = 0.1, MeOH).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 6H, 18-H_3, 18'-H_3), 1.27-1.34 (m, 36H, 12-H_2 bis 17-H_2, 6'-H_2 bis 17'-H_2), 1.35-1.42 (m, 2H, 11-H_2), 1.59 (s, 3H, 19-H_3), 1.97 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 10-H_2), 2.01-2.09 (m, 6H, 6-H_2, 7-H_2 und 5'-H_2), 3.19 (dd, J = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 2''-H), 3.27 (m, 1H, 4''-H), 3.29 (m, 1H, 5''-H)*, 3.35 (td, J = 9.0, 1.0 Hz, 1H, 3''-H)*, 3.66 (dd, J = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6''-H_2), 3.70 (dd, J = 10.5, 3.5 Hz, 1H, 1-H_a), 3.86 (dd, J = 12.0, 1.5 Hz, 1H, 6''-H_b), 3.95-3.99 (m, 1H, 2-H), 4.10-4.15 (m, 2H, 1-H_b, 3-H), 4.27 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1''-H), 4.43 (dd, J = 6.0, 1.0 Hz, 1H, 2'-H), 5.13 (t, J = 6.8 Hz, 1H, 8-H), 5.45

(ddt, J = 15.0, 7.2, 1.0 Hz, 1H, 4-H), 5.48 (ddt, J = 15.0, 6.0, 1.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.71 (dtd, J = 15.0, 5.5, 1.0 Hz, 1H, 5-H), 5.83 (dtd, J = 15.0, 6.8, 1.0 Hz, 1H, 4'-H) ppm.

^{13}C-NMR (150.8 MHz, CD_3OD): δ = 14.5 (q, C-18, C-18'), 16.2 (q, C-19), 23.8 (t, C-17, C-17'), 28.8 (t, C-7), 29.1 (t, C-11), 30.4 – 30.9 (t, C-12 bis C-15, C-6' bis C-15'), 33.1 (t, C-16, C-16'), 33.4 (t, C-5'), 33.8 (t, C-6), 40.8 (t, C-10), 54.6 (d, C-2), 62.6 (t, C-6''), 69.6 (t, C-1), 71.5 (d, C-4''), 72.9 (d, C-3), 74.1 (d, C-2'), 75.0 (d, C-2''), 77.9 (d, C-5'')*, 78.7 (d, C-3'')*, 104.7 (d, C-1''), 124.8 (d, C-8), 129.0 (d, C-3'), 131.0 (d, C-4), 134.5 (d, C-5), 134.7 (d, C-4'), 136.7 (s, C-9), 175.4 (s, C-1') ppm.

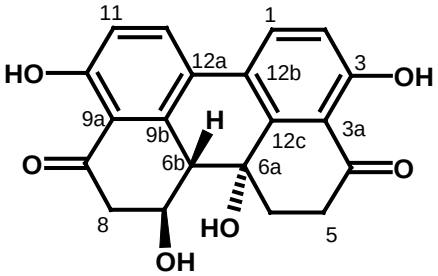
*Zuordnung nicht eindeutig.

Die Zuordnung der NMR-Daten erfolgte nach Literaturangabe[137].

3.5.4 Altertoxin I (35)[86]

Die Mycelextrakte aus 2L-Ruhekultur von *Alternaria* sp. (Stamm Kornati 3c) in den Medien SGG und G20 wurden vereinigt. Nach Fraktionierung der vereinigten Extrakte an Kieselgel (Gradient: CH_2Cl_2/MeOH 1:0 → 98:2 → 3:1) und Aufreinigung an Sephadex LH20 (MeOH, 1.5 m) lagen 5.8 mg (1.5 mg/L) **35** Reinsubstanz vor.

Gelber, amorpher Feststoff



$C_{20}H_{16}O_4$ (352.34 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Gelb fluoreszierend (366 nm).

Anfärbeverhalten: rot/braun (Anis).

R_f = 0.57 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

EI-MS: *m/z* = 352 (100) $[M]^+$, 334 (8), 316 (42), 291 (17).

$[\alpha]_D^{20}$ = +238 (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3418, 2926, 2857, 1643, 1459, 1379, 1232, 1183, 1058, 1015 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-Aceton): δ = 2.44 (ddd, J = 2.0, 15.0, 15.0 Hz, 1H, 6-H_a), 2.60 (dd, J = 9.0, 17.5, 1H, 8H_a), 2.62 (ddd, J = 2.5, 15.0, 17.5 Hz, 1H, 5-H_a), 3.00 (dd, J = 9.0, 17.5), 3.08 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 6b-H), 3.17 (dd, J = 2.0, 17.5 Hz, 1H, 5-H_b) 3.18 (dt, J = 2.5, 15.0 Hz, 1H, 6H_b), 4.41 (bs, 1H, 7-OH oder 6a-OH), 4.65 (bs, 1H, 7-OH oder 6a-OH), 4.76 (ddd,

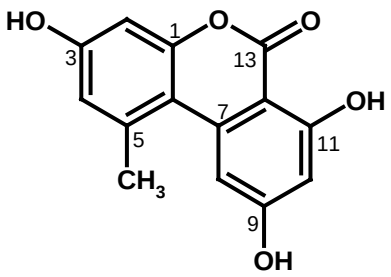
J = 9.0, 9.0, 9.0 Hz), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 1-H), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 12-H), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 2-H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 11-H), 12.41 (s, 1H, 3-OH), 12.77 (s, 1H, 10-OH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, d_6-Aceton): δ = 34.5 (t, C-5), 36.0 (t, C-6), 48.4 (t, C-8), 52.8 (d C-6b), 66.3 (d, C-7), 69.5 (s, C-6a), 114.7 (s, C-3a), 116.8 (d, C11), 117.7 (s, C-9a), 119.1 (d, C-2), 124.6 (d, C-12b), 125.9 (s, C-12a), 133.4 (s, C-12), 133.5 (s, C-1), 138.7 (s, C-12c), 141.4 (s, C-9b), 162.3 (s, C-10), 162.8 (s, C-3), 204.7 (s, C-9), 206.8 (s, C-4) ppm.

3.5.5 Alternariol (36)[90]

Die wie unter B 3.5.4 beschrieben vereinigten und an Kieselgel chromatographierten Extrakte ergaben eine weitere Fraktion, die, fraktioniert an Sephadex LH20 (MeOH, 1 m), wiederum 14 mg (7 mg/L) Alternariol **36** als Reinsubstanz hervorbrachte.

Farbloses Öl



$C_{14}H_{10}O_5$ (258.23 g/mol).
UV-löschend (254 nm).
fluoreszierend (366 nm).
Anfärbeverhalten: gelb (Anis).
R_f = 0.53 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).
EI-MS: m/z = 258 (100) $[M]^+$, 230 (9), 174 (3).
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3438, 3169, 2952, 1610, 1424, 1351, 1256, 1165 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 2.75 (s, 3H, 5-CH_3), 6.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 10-H), 6.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 6.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.19 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 8-H) ppm.

^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ = 25.9 (q, 5-CH_3), 98.7 (s, C-12), 102.5 (d, C-10), 102.8 (d, C-2), 106.4 (d, C-8), 110.2 (s, C-6), 118.6 (d, C-4), 138.9 (s, C-5 oder C-7), 139.8 (s, C-5 oder C-7), 153.5 (s, C-3), 159.9 (s, C-1), 166.2 (s, C-11), 167.0 (s, C-13), 177.0 (s, C-9) ppm.

3.5.6 Allantoin (38)[92]

Die wie unter B 3.5.4 beschrieben vereinigten und an Kieselgel chromatographierten Extrakte ergaben eine weitere Fraktion, die zunächst an Sephadex LH20 (MeOH) fraktioniert wurde. Darauf folgte Chromatographie an Flash-Kieselgel (CH_2Cl_2/MeOH 7:1) und Umkristallisation aus CH_2Cl_2 um 23.1 mg **38** (5.8 mg/L) zu erhalten.

Farbloser Feststoff

$C_4H_6N_4O_3$ (158.12 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

fluoreszierend (366 nm).

Anfärbeverhalten: blau/grau (Anis).

R_f = 0.15 (CH_2Cl_2/MeOH 7:1).

EI-MS: *m/z* = 158 (6) $[M]^+$, 130 (86), 115 (42), 87 (100), 60 (60), 44 (87).

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-Dmso): δ = 3.33 (s, 2H, 1-NH_2), 5.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 3-NH), 8.02 (s, 1H, 1-NH), 10.44-10.55 (bs, 1H, 5-NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, d_6-Dmso): δ = 62.3 (d, 3-C), 156.6 (s, C-1), 157.4 (d, C-5), 173.4 (s, C-6) ppm.

3.5.7 Sterigmatocystin (40)[94]

2 L Ruhekulturen von *Aspergillus flavus* (Stamm Gozo 14) in SGG-Medium inkubierten vier Wochen bei Raumtemperatur und Tageslicht. Der, durch Extraktion des durch Filtration erhaltenen Mycels mit Aceton im Ultraschallbad erhaltene, Mycelextrakt wurde an Kieselgel ($CHCl_3$/Methanol 9:1) fraktioniert. Darauf folgte eine Trennung an Sephadex LH20 ($CHCl_3$), die 8.2 mg **40** als Reinsubstanz hervorbrachte.

Gelber Feststoff

$C_{18}H_{12}O_6$ (324.29 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: gelb/orange (Anis).

R_f = 0.73 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

ESI-MS: *m/z* = 347.6 $[M+Na]^+$, 671.3 $[2M+Na]^+$.
HR-ESI-MS: *m/z* = 325.0707190 $[M+H]^+$.
Berechnet: *m/z* = 325.0706646 (Δ = 0.17 ppm).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3425, 3099, 2926, 1649, 1587, 1459, 1268, 1233, 1127. cm^{-1}.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.97 (s, 3H, 18-H_3), 4.76 (dt, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 1H, 15-H), 5.42 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 16-H), 6.39 (s, 1H, 11-H), 6.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 17-H), 6.72 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 6.79 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 14-H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 5-H) 13.20 (s, 1H, 3-OH) ppm.

^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 48.0 (d, C-15), 56.8 (q, C-18), 90.4 (d, C-11), 102.5 (d, C-16), 105.9 (s, C-13), 106.5 (s, C-9), 108.9 (s, C-2), 111.2 (d, C-4), 113.2 (d, C-6), 113.2 (s, C-14), 135.7 (d, C-5), 145.3 (d, C-17), 154.0 (s, C-8), 154.9 (s, C-7), 162.2 (s, C-3), 163.2 (s, C-12), 164.5 (s, C-10), 181.3 (s, C-1) ppm.

4 Arbeiten an *Rheinheimera baltica* (Stamm HP1)

4.1 Stammhaltung

4.1.1 Agarplatten

Petrischalen mit MB 2216-Agar mit 4 g/L Arginin dienten zur Stammhaltung. Die Kultivierung erfolgte bei Raumtemperatur im Tageslicht für 7 d. Bewachsene Platten wurden bei 8°C für maximal einen Monat gelagert.

4.1.2 Langzeitkonservierung

Die Langzeitkonservierung erfolgte analog zu 2.1.2.

4.2 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

4.2.1 Agarkulturen

Zunächst wurden verschiedene Medien getestet: LB, LB + NaCl (0, 15, 20, 33 g/L), LB^{++}, MB2216, MB2216 + Arginin (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 g/L), MB2216 + Succinat (2 bzw. 4 mg/L). Die Medien wurden mit Leitungswasser hergestellt, sterilisiert, in Petrischalen gefüllt und inokuliert. Die Kultivierung erfolgte mit jeweils zwei Agarplatten bei 8, 15, RT, 28°C. Außerdem fand jeweils eine Kultivierung bei Raumtemperatur im Tageslicht statt.
Im Folgenden wurden kleine P-Kolben (0.5 L) mit MB2216 + Arginin (4 g/L) und 20 später 25 g/L Agar verwendet. Zur Beimpfung dieser musste das Mycel mit etwas sterilem Wasser aufgenommen und diese Emulsion dann auf dem Agar verteilt werden. Die Kultivierung dauerte bei Raumtemperatur im Tageslicht 7 Tage an.
Zur Beurteilung der Methoden diente die optische Kontrolle der Kulturen sowie der Dünnschichtchromatogramme ihrer Extrakte.

4.2.2 Flüssigkulturen

Die ersten Variationen der Kultivierungsbedingungen wurden in je zwei 200 mL Kolben, befüllt mit 100 mL Medium, getestet. In MB2216 Medium dauerte die Kultivierung 7 d an. Variiert wurde die Konzentration der Zusätze Arginin (2, 4, 6 g/L) und Succinat (2, 4 g/L), Kultivierungsgefäß (mit bzw. ohne Schikane), Schüttelfrequenz (180, 120 rpm) und Temperatur (15, 22, 28°C).
In einer zweiten Versuchsreihe kamen 200 mL Kolben mit je 100 mL Nährlösung ohne Schikane bei 120 rpm über 7 d bei 28 °C zum Einsatz. Hier umfassten die Variationen Schüttelkulturen mit verschiedenen Feststoffzusätzen: Seramis™, 8 g/L Agar, 1.5x3 cm Kieselgel-DC-Platte, Aktivkohle, Seesand, Siedesteine, Filterpapier, Zellstoff und Watte.
Das dritte Screening fand in je zwei 200 mL Kolben, befüllt mit 100 mL Medium und 20x20 cm Zellstoff (5 g), bei 120 rpm und 28°C über 7 d statt. Es wurde die Zugabe von Arginin, Asparagin, Lysin und Succinat (0.1, 0.2 und 0.4 g/L) und Glucose (1 und 2 g/L) getestet.
Als letzte Variation erfolgte die Kultivierung in 500 mL Kolben, befüllt mit 200 mL MB2216 Medium und 20x20 cm Zellstoff, bei 28°C über 7 d auf dem Querschüttler.
Zur Beurteilung der Methoden diente wiederum die optische Kontrolle der Kulturen sowie der Dünnschichtchromatogramme ihrer Extrakte.

4.3 Isolierung von Glaukothalin (50)

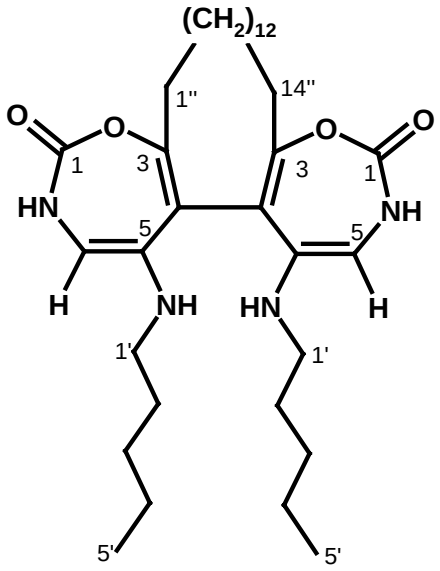
Die Kultivierung auf Agar fand mit MB2216 Medium (25 g/L Agar) unter Zusatz von 4 g/L Arginin in P-Kolben (0.5 L) statt. Sie dauerte 7 d bei Raumtemperatur unter Einfluss von Tageslicht.

Flüssigkulturen wurden in 200 mL Kolben, befüllt mit 100 mL MB2216 Medium und 20x20 cm Zellstoff (5 g) bei 28°C und 120 rpm über 7 d angelegt.

In beiden Fällen wurde das Mycel gefriergetrocknet und anschließend durch eine mehrfache Folge aus Verreiben mit $CHCl_3$, Extraktion mit $CHCl_3$ im Ultraschallbad und Filtration extrahiert. Das Lösungsmittel war durch Verdampfen im Vakuum zu entfernen. Der so erhaltene Extrakt, chromatographiert an Sephadex LH20 ($CHCl_3$), ergab Glaukothalin in Ausbeuten zwischen 3 und 5 mg/L.

4.4 Charakterisierung von Glaukothalin (50)

Blauer, amorpher Feststoff.



$C_{34}H_{56}N_4O_4$ (584.85 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: schwach blau (Anis).

R_f = 0.98 ($CHCl_3$/MeOH 90:1)

0.32 ($CHCl_3$).

EI-MS (%): *m/z* = 584 (100) $[M]^+$, 429 (10), 111 (10), 97 (15), 57 (20).

HR-EI-MS: *m/z* = 584.315.

DCI-MS: *m/z* = 585 (100) $[M+H]^+$, 203 (43), 186 (60).

ESI-MS: *m/z* = 607 $[M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: *m/z* = 607.40126 $[M+Na]^+$.

Berechnet: *m/z* = 607.419377 $[M+Na]^+$ (Δ = 1.23 ppm).

APCI-MS: *m/z* = 585.433 $[M+H]^+$, 416.2389.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_5-Pyridin): δ = 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 5'-H_3), 1.2 (m, 22H, 1''-H bis 14''-H, 4'-H_2), 1.37 (sext, *J* = 7.5 Hz, 4H, 3'-H_2), 1.73 (quin, *J* = 7.0 Hz, 4H, 2'-H_2), 3.39 (dt, *J* = 7.0 Hz, 4H, 1'-H_2), 6.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 5-NH), 8.82 (s, 2H, 6-H), 13.3 (br, 2H, 6-NH) ppm.

^{13}C-NMR (150.8 MHz, d_5-Pyridine): δ = 14.3 (q, C-5'), 22.9 (t, C-4'), 27.5 (t, C-3'), 28.8 (t, C-2'), 29.6, 29.7, 29.9, 30.0, 32.2 (t, C-1'' bis C-14''), 43.6 (t, C-1'), 105.7 (d, C-6), 125.6 (s, C-4), 137.2 (s, C-5), 161.8 (s, C-1), 167.1 (s, C-3) ppm.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$/d-TFA): δ = 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H ,5'-H_3), 1.2 (m, 2''-H bis 13''-H, 4'-H_2), 1.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, 1''-H_2, 14''-H_2), 1.41 (sext, *J* = 7.5 Hz, 4H, 3'-H_2), 1.81 (quin, *J* = 7.0 Hz, 4H, 2'-H_2), 3.54 (dt, *J* = 7.0 Hz, 4H, 1'-H_2,), 8.92 (s, 2H, 6-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$/d-TFA): δ = 13.9 (q, C-5'), 22.7 (t, C-4'), 26.5 (t, C-3'), 27.1 (t, C-2'), 29.0, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 32.0 (t, C-1'' bis C-14''), 49.7 (t, C-1'), 123.4.7 (d, C-6), 126.2 (s, C-4), 132.7 (s, C-5), 161.6 (s, C-1), 162.5 (s, C-3) ppm.

^{15}N-HMBC-NMR (600 MHz, d_5-Pyridin) (Referenziert auf Pyridin δ = -66 ppm): δ = -82 (5-NH), -168 (6-NH) ppm.

4.5 Versuche zur Kristallisation

Lösungen der Konzentration 10 mg/mL in Pyridin bzw. $CHCl_3$ wurden für mehrere Wochen im Aromaröhrchen im Kühlschrank ruhig gelagert. Später wurde in den Deckeln dieser Röhrchen eine Kanüle platziert, sodass ein langsamer Verdampfungsprozess einsetzte.
Ein erneuter Versuch lief gleichermaßen ab, wobei den Lösungen ein Tropfen H_2O bzw. später TFA oder Tetrachlorethan bzw. minimal Weinsäure zugesetzt wurde.
In einem weiteren Experiment löste sich in DMSO suspendierter Farbstoff durch Erwärmen auf ca. 90 °C und sollte bei langsamem Abkühlen im Dewar kristallisieren.

4.6 Chemische Derivatisierungen

4.6.1 Acetylierung

In einem ersten Experiment wurden 0.8 mg (1.4 mmol) Glaukothalin, gelöst in 0.4 mL Pyridin, mit 0.3 mL Acetanhydrid für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.
In einem weiteren Experiment ging der Zugabe des Acetanhydrids die Aktivierung durch eine Spatelspitze DMAP voran. Das Rohprodukt wurde dünnschichtchromatographisch und mittels HPLC-MS untersucht.

4.6.2 Alkylierung von Heteroatomen

Eschweiler-Clarke Alkylierung:
Testreaktion: 1 eq Tetrahydrochinolin ($3.5 \cdot 10^{-4}$ mol, 47.2 mg) in $CHCl_3$ (3.5 mL, 0.1 M) wurde mit 1.15 eq (30 µL) Formailin-Lösung (37%) und 2.5 eq (33 µL) Ameisensäure bei 65 °C für 3 h gerührt.
Zur Aufarbeitung musste das Reaktionsgemisch in Dichlormethan aufgenommen und mit gesättigter K_2CO_3-Lösung gewaschen werden. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variationen:
Raumtemperatur
erhöhte Substratkonzentration (0.15 mol/L)
2.5 eq (40 µL) Formaldehyd (37%)
3 eq Ameisensäure (40 µL)
Reaktionsdauer 6 h
80°C Reaktionstemperatur

Nach Ende der Umsetzung, indiziert durch die Verfärbung, wurde das Rohprodukt im Vakuum zur Trockne eingedampft. Untersuchungen der erhaltenen Gemische mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie gaben anhand der Signalintensitäten Aufschluss über die prozentuale Umsetzung.
Umsetzung von Glaukothalin: 1 eq **50** (5 mg, $8.6 \cdot 10^{-5}$ mol) wurden mit 18.4 eq ($1.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 12 µL) Formalinlösung (37 %) und 2.5 eq (2.15·10-5 mol, 1µL) Ameisensäure versetzt und

für 6 h unter Rühren bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Umsetzung der Testsubstanz.

Reduktive Methylierung:

Glaukothalin wurde unter Argonatmosphäre in trockenem THF suspendiert (3.0 mg/5 µmol in 2 mL) und mit 10 mg NaH (2.5 mmol, 60% in Mineralöl) bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender Zugabe von 40 mg (0.28 mmol) Methyliodid refluxierte die Lösung 14 h. Die Aufarbeitung der Reaktionslösung nach Abkühlen auf Raumtemperatur umfasste die Hydrolyse durch Zugabe von 5 mL NaOH (1M) sowie 10 mL CH_2Cl_2 mit anschließendem 20minütigem Rühren. Im Folgenden wurden weitere 10 mL CH_2Cl_2 hinzugefügt, um das Reaktionsprodukt zu extrahieren. Die erhaltene organische Phase trocknete über Na_2SO_4 wonach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum das Rohprodukt ergab, welches dünnschichtchromatographisch zu untersuchen war.

4.6.3 Reduktionen

Reduktion mit Borhydriden:

Je ca. 1 mg **50** wurden in 0.5 mL $CHCl_3$ gelöst und dann mit einer guten Spatelspitze $NaCNBH_3$ bzw. $NaBH_4$ versetzt. Die zu erwartende Farbänderung diente als Kriterium zur Beobachtung des Fortgangs der Reaktion während die Lösungen bei Raumtemperatur rührten. Im Fall von $NaCNBH_3$ betrug die Reaktionsdauer 3 d. In einem zweiten Experiment wurde die Reaktionstemperatur auf 60 °C erhöht.

Bei der Reduktion mit $NaBH_4$ ließ sich durch Zugabe von 2 Tropfen HCl (0.5M) eine Entfärbung der Reaktionslösung erzeugen. Diese Reaktion wurde bei 0 °C wiederholt.

Alle Rohprodukte unterlagen einer dünnschichtchromatographischen ($CHCl_3$/MeOH 99:1) Untersuchung.

Reduktion mit Pd/C/H_2:

6 mg des Farbstoffs gelöst in 1 mL Pyridin wurden mit 50 mg Pd/C (10 %) versetzt und 20 h unter H_2-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt ließ sich durch Chromatographie an Kieselgel ($CHCl_3$/MeOH 99:1) in drei unterschiedliche Fraktionen trennen.

4.7 Isolierung und Charakterisierung weiterer Metabolite

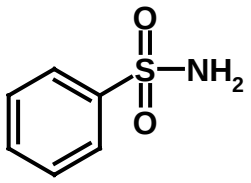
4.7.1 GT2A34

Der blaue Farbstoff GT2A34 ließ sich durch Chromatographie des Rohextraktes an Sephadex LH20 ($CHCl_3$) in Ausbeuten von (0.3 mg/L) erhalten. GT2A34 ist unlöslich in MeOH, CH_2Cl_2, Aceton, Ethylacetat, mäßig löslich in $CHCl_3$ und Pyridin.
DCI-MS: *m/z* = 346 $[M+NH_4]^+$

4.7.2 Benzolsulfonamid (51)[106]

Das Kulturfiltrat von 2.8 L Flüssigkulturen wurde zwei mal mit Ethylacetat extrahiert. Der farblose Feststoff ließ sich in einer Ausbeute von 7.5 mg/L durch Chromatographie des Rohprodukts an Kieselgel ($CHCl_3$/MeOH 9:1-3:1) und Sephadex LH20 (MeOH) erhalten.

Farbloser, kristalliner Feststoff.
$C_6H_7NO_2S_2$ (157.11 g/mol).
UV-löschend (254 nm).
Anfärbeverhalten: blau-violett (Anis).
R_f = 0.49 ($CHCl_3$/MeOH 9:1) schleifend
EI-MS (%): *m/z* = 157 (21) $[M]^+$, 141 (13), 93 (39), 77 (100), 51 (62), 50 (23).



^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.88 (br, 2H, NH_2), 7.50 (ddt, *J* = 7.0, 7.0, 2.0 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.57 (ddt, *J* = 7.0, 7.0, 2.0 Hz, 2H, 1-H, 4-H), 7.92 (dt, *J* = 7.0, 2 Hz, 2H, 2-H, 6-H) ppm.

^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 127.0 (d, C-3, C-5), 130.0 (d, C-2, C-6), 133.2 (d, C-4), 144.9 (s, C-1) ppm.

5 Melaninbiosynthese in *Sordaria macrospora*

5.1 Stammhaltung und Langzeitkonservierung

Petrischalen mit Minimalmedium oder M2 Agar dienten zur Stammhaltung. Die Entwicklung erfolgte bei 24°C für 7 d. Bewachsene Platten wurden bei 8°C für maximal drei Monate gelagert.
Die Langzeitkonservierung geschah analog zu B 2.1.2.

5.2 Screening nach Zwischen- bzw. Nebenprodukten der Melaninbiosynthese

5.2.1 Vergleich zwischen WT, Pile 1 und Δpks-Mutante

Schüttelkulturen in den Medien 1549, SGG, M2, G20, E2, 1158 und M2+NaCl (33%) wurden angesetzt. Dazu dienten je Medium zwei 300 mL Erlenmeyerkolben à 100mL sterilisierter Nährlösung, die mit 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert waren. Nach viertägiger Inkubation bei 180 rpm und 28°C erfolgte die Trennung von Mycel und Kulturfiltrat mittels Filtration. Die Extraktion des Kulturfiltrats fand mit Ethylacetat statt, die des Mycels mit Aceton im Ultraschallbad. Diese Vorgehensweise zur Aufarbeitung der Kulturen wurde für alle nachfolgenden Experimente beibehalten.
Die Kultivierung in Ruhekulturen von Pile 1 und dem Wildtyp erfolgte in SGG, M2, 1549 SWG und BMM, die der Δpks-Mutante in BMM und SWG-Medium. Standardmäßig dauerte die Kultivierung bei Raumtemperatur und Tageslicht vier Wochen an, wobei je Medium zwei P-Kolben mit je 1 L Medium mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft waren. In M2 und SWG-Medium fand außerdem eine zeitabhängige Untersuchung statt, zu deren Zweck nach 7, 14, 21 und 28 Tagen die Aufarbeitung wie oben beschrieben erfolgte.
Alle so erhaltenen Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie, analytischer HPLC und HPLC-MS untersucht und verglichen.

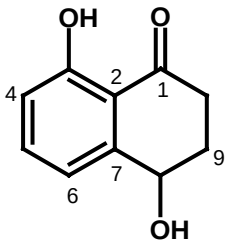
5.2.2 Einsatz von Biosyntheseinhibitoren

Diese Versuche fanden in je 4 L M2 und SWG-Medium statt. Die Ruhekulturen wurden wie oben beschrieben entwickelt und aufgearbeitet. Den Medien waren vor dem Sterilisieren 5 mg/L der folgenden Biosyntheseinhibitoren zugesetzt worden; Tricyclazol: M2 und SWG, Fthalid: SWG.

5.3 Isolierung von Sekundärstoffen aus *Sordaria macrospora*

5.3.1 Isoscleron (62)[119]

Isoscleron wurde im Gemisch mit Feroxidin wie unter B 5.3.2 beschrieben erhalten.



Farbloser, amorpher Feststoff.
$C_{10}H_{10}O_3$ (178.19 g/mol).
UV-löschend (254 nm).
R_f = 0.48 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).
DCI-MS: *m/z* = 179 $[M+H]^+$, 196 $[M+ NH_4]^+$.

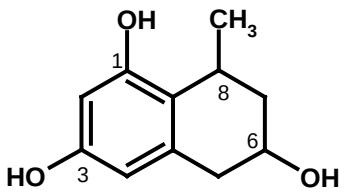
^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-Aceton): δ = 2.07-2.14 (m, 1H, 10-H_a), 2.29-2.35 (m, 1H, 10-H_b), 2.71 (ddd, *J* = 5.0, 10.0, 17.0 Hz, 1H, 9-H_a), 2.80-2.94 (m, 1H, 9H_b), 4.89 (dd, *J* = 5.0, 8.0 Hz, 1H, 8-H), 6.82 (dd, *J* = 1.0, 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.11 (dd, *J* = 1.0, 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.52 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 5-H), 12.46 (s, 1H, 3-OH) ppm.

^{13}C-NMR (150.0 MHz, d_6-Aceton): δ = 32.5 (t, C-10), 35.9 (t, C-9), 67.7 (d, C-8), 116.1 (s, C-2), 117.0 (d, C-4), 118.3 (d, C-6), 137.5 (d, C-5), 149.1 (s, C-7), 163.3 (s, C-3), 205.0 (s, C-1) ppm.

5.3.2 Feroxidin (63)[120]

Aus vier Litern einer vier wöchigen Kultivierung von *Sordaria macrospra* in P-Kolben und SWG-Medium bei Raumtemperatur und Tageslicht wurde ein Kulturfiltratextrakt erstellt. Nach Chromatographie an Kieselgel (Gradient CH_2Cl_2/MeOH 95:5, 9:1, 3:1) und

anschließender Trennung an Sephadex LH20 (Aceton) ergaben sich 3.1 mg eines Gemisches zweier Substanzen **63** und **64** (B 5.3.1).



Farbloser, amorpher Feststoff.

$C_{11}H_{14}O_3$ (194.23 g/mol).

UV-löschend (254 nm)

R_f = 0.48 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

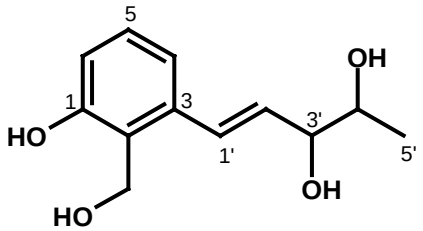
DCI-MS: *m/z* = 195 $[M+H]^+$, 212 $[M+NH_4]^+$, 460 $[2M+ NH_4]^+$.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-Aceton): δ = 1.44 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 8-CH_3), 2.80-2.94 (m, 4H, 7-H_2, 5-H_2), 4.65-4.70 (m, 1H, 6-H), 6.24 (d, *J* = 1 Hz, 1H, 2-H), 6.28 (m, 1H, 4-H) ppm.

^{13}C-NMR (150.0 MHz, d_6-Aceton): δ = 11.1 (q, 8-CH_3), 30.3 (t, C-5), 35.1 (t, C-7), 76.2 (d, C-6), 102.0 (d, C-2), 107.6 (d, C-4), 116.1 (s, C-8_a), 143.0 (s, C-4_a), 165.6 (s, C-1, C-3) ppm.

5.3.3 Sordariol (64)[123]

Sordariol konnte aus verschiedenen Extrakten mit unterschiedlichen Methoden isoliert werden. Unter anderem entstand aus vier Litern der mit Tricyclazol versetzten Kulturen ein Kulturfiltratextrakt, der säulenchromatographisch an Kieselgel (Gradient Chloroform/Methanol 9/1 → 3/1) fraktioniert wurde. Eine der so erzeugten Fraktionen brachte durch Chromatographie an Sephadex (MeOH) **64** in einer Ausbeute von 11.3 mg hervor (2.8 mg/L).



Farbloser, amorpher Feststoff.

$C_{12}H_{16}O_4$ (224.26 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

Anfärbeverhalten: purpur (Anis).

R_f = 0.13 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

DCI-MS: *m/z* = 242 $[M+NH_4]^+$.

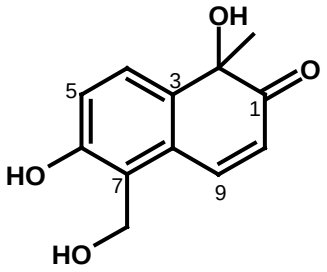
$[\alpha]_D^{20}$ = +83 (c = 0.1, MeOH).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 1,18 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 5'-H_3), 3.87 (dq, *J* = 7.0, 6.0 Hz, 1H, 4'-H), 4.07 (dd, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 1H, 3'-H), 4.79 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H, 2-CH_2), 6.19 (dd, *J* = 7.0, 16.0 Hz, 1H, 2'-H), 6.71 (dd, *J* = 1.0, 7.5 Hz, 1H, 4-H), 6.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.00 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.07 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 1'-H), 10.04 (s, 1H, 1-OH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 18.9 (q, C-5'), 56.6 (t, 2-CH_2), 71.7 (d, C-4'), 78.0 (d, C-3'), 115.4 (d, C-4), 118.7 (d, C-5), 125.2 (s, C-2), 129.7 (d, C-1'), 130.6 (d, C-6), 132.5 (d, C-2'), 139.7 (s,C-3), 157.3 (s, C-1) ppm.

5.3.4 (-)-Cyclosordariolon (65)[124]

Aus dem unter B 5.3.3 beschriebenen Rohextrakt bzw. dessen erster Fraktionierung wurde eine weitere Fraktion bearbeitet, indem sie an Sephadex LH20 (MeOH) chromatographiert wurde. Nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (Säule D, isokratisch, 35% Acetonitril) waren 5.3 mg (1.3 mg/L) **65** zu erhalten.



Gelber, amorpher Feststoff.
$C_{12}H_{12}O_4$ (220.19 g/mol).
UV-löschend (254 nm).
Fluoreszierend (366 nm).
Anfärbeverhalten: braun-violett (Anis).
R_f = 0.54 ($CHCl_3$/MeOH 4:1).
EI-MS: *m/z* = 220 (30) $[M]^+$, 192 (100), 189 (32), 187 (49), 177 (40), 174 (79), 159 (83), 131 (72), 103 (56), 91 (25), 77 (43).
$[\alpha]_D^{20}$ = -210 (c = 0.1, MeOH).

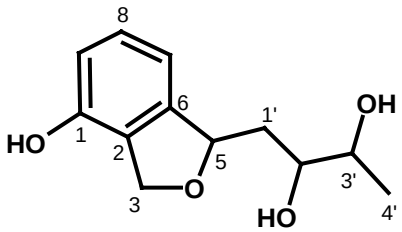
^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 1.45 (s, 3H, 2-CH_3), 5.00 (d, *J* = 1 Hz, 2H, 7-CH_2), 6.14 (d, *J* = 10 Hz, 1H, 10-H), 6.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 5-H), 7.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 4-H), 7.97 (d, *J* = 10 Hz, 1H, 9-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 32.2 (q, 2-CH_3), 55.0 (t, 7-CH_2), 77.5 (s, C-2), 118.3 (d, C-5), 124.3 (d, C-10), 126.3 (s, C-7), 127.3 (d, C-4), 129.9 (s, C-8), 138.9 (s, C-3), 143.3 (d, C-9), 156.5 (s, C-6), 206.8 (s, C-1) ppm.

5.3.5 1-(1,3-Dihydro-4-hydroxy-isobenzofuran-1-yl)butan-2,3-diol (66)[123]

Aus vier Litern Ruhekultur mit Zusatz von Fthalid gingen durch Chromatographie an Kieselgel (Gradient $CHCl_3$/MeOH 9:1 → 3:1) mehrere Fraktionen hervor, von denen eine an Sephadex LH20 (MeOH) fraktioniert wurde. Mittels semipräparativer HPLC (Säule D, isokratisch 40 % Acetonitril) konnten 13.2 mg (3.3 mg/L) **66** als Reinsubstanz erhalten werden.

Farbloser, amorpher Feststoff.



$C_{12}H_{16}O_4$ (224.25 g/mol).
UV-löschend (254 nm).
Anfärbeverhalten: braun (Anis).
R_f = 0.57 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).
ESI-MS: *m/z* = 247 $[M+Na]^+$, 471 $[2M+Na]^+$, 223 $[M-H]^-$, 447 $[2M-H]^-$.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 4'-H_3), 1.79 (ddd, *J* = 5.0, 8.0, 14.5 Hz, 1'-H), 2.08 (ddd, *J* = 3.5, 5, 14.5, 1H, 1'-H), 3.63 (dq, *J* = 6.0, 6.5 Hz, 1H, 3'-H), 3.68-3.74 (m, 1H, 2'-H), 5.34-5.41 (m, 1H, 5-H), 6.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 6.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7-H), 7.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 8-H) ppm

^{13}C-NMR (150.0 MHz, CD_3OD): δ = 18.6 (q, C-4'), 40.5 (t, C-1'), 71.5 (t, C-3), 71.6 (d, C-3'), 74.9 (d, C-2'), 84.5 (d, C-5), 113.4 (d, C-7), 114.9 (d, C-9), 125.9 (s, C-2), 130.2 (d, C-8), 145.2 (s, C-6), 152.9 (s, C-1) ppm.

6 Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten

6.1 2-Carboxymethyl-5-(1-Oxohex-1-yl)furan (68)

Weißer, kristalliner Feststoff

$C_{12}H_{16}O_4$ (224.26 g/mol)

Schwach UV-löschend (254 nm).

R_f = 0.59 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

ESI-MS: *m/z* = 269 $[M+2Na-H]^+$, 515 $[2M+3Na-2H]^+$, 761 $[3M+4Na-3H]^+$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3423, 1662, 1616 (sh), 1516, 1384, 1053, 1024, 795 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 0.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, 6''-H_3), 1.30-1.39 (m, 4H, 5''-H_2, 4''-H_2), 1.63-1.70 (m, 2H, 3''-H_2), 2.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2''-H_2), 3.70 (s, 2H, 2'-H_2), 6.43 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 3-H), 7.28 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 4-H) ppm.

^{13}C-NMR (150.8 MHz, CD_3OD): δ = 14.3 (q, C-6''), 23.5 (t, C-5''), 25.4 (t, C-3''), 32.6 (t, C-4''), 38.9 (t, C-2''), 111.6 (d, C-3), 120.7 (d, C-4), 153.0 (s, C-5), 157.3 (s, C-2), 191.5 (s, C-1'') ppm.

6.2 NTK-250 A (74/75),

6-[8-(Pyridin-3-yl)-1,3,5,7-octatetraen-1-yl]-4-methoxy-α-pyron

NTK-250 A wurde als Gemisch zweier Komponenten erhalten.

Gelber, amorpher Feststoff.

$C_{20}H_{19}NO_3$ (321.38 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

R_f = 0.48 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

ESI-MS: *m/z* = 322 $[M+H]^+$.

HR-ESI-MS: *m/z* = 322.1437750 $[M+H]^+$.

Berechnet: *m/z* = 322.1437699 (Δ = 0.016 ppm).

UV (CH_2Cl_2): λ_{max}(lgε) = 314 (4.04), 405 (4.60), 427 (4.56) nm.
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428, 1670, 1631, 1543, 1456, 1409, 1259, 1097, 1027, 803 cm^{-1}.

Hauptkomponente (74)

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_2Cl_2): δ = 1.98 (s, 3H, 3'-CH_3), 3.79 (d, *J* = 2 Hz, 3H, 4-OCH_3), 5.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 5.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5-H), 6.12 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.48 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 4'-H), 6.48 (dd, *J* = 11.0, 15.0 Hz, 1H, 7'-H), 6.55-6.68 (m, 2H, 5'-H, 8'-H), 7.02 (dd, *J* = 11.0, 15.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.18 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 2'-H), 7.30 (bs, 1H, 5''-H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 8.44 (bs, 1H, 6''-H), 8.64 (bs, 1H, 2''-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_2Cl_2): δ = 12.6 (q, 3'-CH_3), 56.3 (q, 4-OCH_3), 88.7 (d, C-3), 101.1 (d, C-5), 118.6 (d, C-1'), 124.1 (d, C-5''), 127.9 (d, C-7'), 129.8 (d, C-8'), 131.6 (d, C-6'), 133.4 (d, C-4''), 135.9 (C-5'), 136.8 (d, C-4'), 137.6 (s, C-3'), 139.6 (d, C-2'), 147.9 (d, C-2'', C-6''), 159.2 (s, C-6), 160.6 (s, C-4), 171.3 (s, C-2) ppm.

Minderkomponente (75)

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_2Cl_2): δ = 2.02 (s, 3H, 3'-CH_3), 3.87 (d, *J* = 2 Hz, 3H, 4-OCH_3), 5.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 5.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5-H), 6.14 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.42 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 4'-H), 7.24 (dd, *J* = 11.0, 15.0 Hz, 1H, 7'-H), 6.55-6.68 (m, 2H, 5'-H, 8'-H), 6.77 (dd, *J* = 11.0, 15.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.18 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 2'-H), 7.30 (bs, 1H, 5''-H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 8.44 (bs, 1H, 6''-H), 8.64 (bs, 1H, 2''-H) ppm.

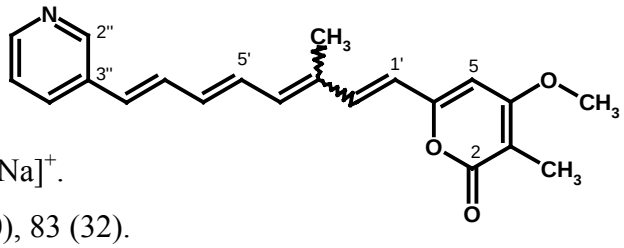
^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_2Cl_2): δ = 12.9 (q, 3'-CH_3), 56.3 (q, 4-OCH_3), 88.8 (d, C-3), 101.2 (d, C-5), 122.3 (d, C-1'), 124.1 (d, C-5''), 127.6 (d, C-7'), 130.2 (d, C-8'), 131.0 (d, C-6'), 133.5 (d, C-4''), 134.3 (d, C-4'), 136.1 (d, C-2'), 137.6 (s, C-3'), 142.8 (C-5'), 147.9 (d, C-2'', C-6''), 159.0 (s, C-6), 160.6 (s, C-4), 171.3 (s, C-2) ppm.

6.3 NTK-250 B (76/77)

6-[8-(Pyridin-3-yl)-1,3,5,7-octatetraen-1-yl]-3-methyl-4-methoxy-α-pyron

NTK-250 B wurde als Gemisch zweier Komponenten erhalten.

Gelber, amorpher Feststoff.



$C_{21}H_{21}NO_3$ (335.40 g/mol).

UV-löschend (254 nm).

R_f = 0.48 ($CHCl_3$/MeOH 9:1).

ESI-MS: *m/z* = 358 $[M+Na]^+$, 693.6 $[2M+Na]^+$.

EI-MS: *m/z* (%) = 335 (100) $[M]^+$, 139 (40), 83 (32).

HR-EI-MS: *m/z* = 335.152100 $[M]^+$.

Berechnet: *m/z* = 335.152115 (Δ = 0.04 ppm).

UV (MeOH): $\lambda_{max}(\lg\varepsilon)$ = 320 (4.04), 390 (4.11), 409 (4.13), 429 (4.02) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3446, 1656, 1636, 1543, 1461, 1385, 1157, 1019, 610 (sh) cm^{-1}.

Hauptkomponente (76)

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.88 (s, 3H, 3-CH_3), 2.06 (s, 3H, 3'-CH_3), 3.94 (s, 3H, 4-OCH_3), 6.34 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.48 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 4'-H), 6.53 (s, 1H, 5-H), 6.65-6.73 (m, 1H, 5'-H), 7.18 (m, 2H, 2'-H, 7'H), 7.36-7.44 (m, 2H, 6'-H, 8'-H), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 8.35 (bs, 1H, 5''-H), 8.56-8.62 (bs, 2H, 2''-H, 6''-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (q, 3-CH_3), 12.8 (q, 3'-CH_3), 57.3 (q, 4-OCH_3), 97.5 (d, C-5), 102.7 (s, C-3), 123.4 (d, C-1'), 125.4 (d, C-8'), 129.1 (d, C-7'), 131.0 (C-5'), 132.17 (d, C-6'), 133.2 (d, C-2'), 134.8 (d, C-4''), 135.5 (d, C-4'), 138.8 (s, C-3'), 148.6 (d, C-5''), 148.7 (d, C-2'', C-6''), 148.7 (s, C-6), 159.4 (s, C-4), 168.9 (s, C-2) ppm.

Minderkomponente (77)

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.88 (s, 3H, 3-CH_3), 2.02 (s, 3H, 3'-CH_3), 3.94 (s, 3H, 4-OCH_3), 6.38 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.48 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 4'-H), 6.57 (s, 1H, 5-H),

6.65-6.73 (m, 1H, 5'-H), 7.18 (m, 2H, 2'-H, 7'H), 7.36-7.44 (m, 2H, 6'-H, 8'-H), 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 8.35 (bs, 1H, 5''-H), 8.56-8.62 (bs, 2H, 2''-H, 6''-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (q, 3-CH_3), 12.6 (q, 3'-CH_3), 57.3 (q, 4-OCH_3), 97.7 (d, C-5), 102.5 (s, C-3), 119.7 (d, C-1'), 125.4 (d, C-8'), 129.0 (d, C-7'), 130.4 (C-5'), 132.2 (d, C-6'), 133.2 (d, C-2'), 134.8 (d, C-4''), 135.5 (d, C-4'), 138.8 (s, C-3'), 148.6 (d, C-5''), 148.7 (d, C-2'', C-6''), 148.7 (s, C-6), 159.6 (s, C-4), 168.3 (s, C-2) ppm.

C LITERATURVERZEICHNIS

[1] http://www.worldmapper.org/display.php?selected=230 (01.05.2007)

[2] J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 5432-5451.

[3] http://194.6.181.127/ger/swissinfo.html?siteSec=105&sid=6748022 (20.2.2007)

[4] Pharmabrief der BUKO Pharma-Kampagne (Health Action International), **2006**, *1*, 1-5.

[5] http://www.cbwtransparency.org/crisper (20.02.2007)

[6] P.B. Bloland, *Report Nr. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4.*, Genf, **2001**.

[7] R. Pink, A. Hudson, M.-A. Mouriès, M. Bending, *Nature Reviews*, **2005**, *4*, 727-740.

[8] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkngen kompakt*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2005**, 405.

[9] S. Saxena, N. Pant, D.C. Jain, R.S. Bhakuni, *Current Science*, **2003**, *85*, 1314-1328.

[10] R. Jambou, *Lancet*, **2005**, *366*, 1950.

[11] R.G. Rideley, *Nature*, **2002**, *415*, 686-693.

[12] K. Shiomi, S. Omura, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **2004**, *80*, 245-258.

[13] M.P. Glenn, S.-Y. Chang, O. Hucke, C.L.M.J. Verlinde, Kasey Rivas, C. Hornéy, K. Yokoyama, F. S. Buckener, P.R. Pendyala, D. Chakrabarti, M. Gelb, W.C. van Voorhis, S.M. Sebti, A.D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4903-4906.

[14] B. Lell, R. Ruangweerayut, J. Wiesner, M.A. Missinou, a. Schindler, T. Baranek, M. Hintz, D. Hutchinson, H. Jomaa, P.G. Kremsner, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*, 735-738.

[15] B. Pradines, J.M. Rolain, F. Ramiandraosa, T. Fusai, J. Mosnier, C. Rogier, W. Daries, E. Baret, G. Kunesch, J. Le Bras, D. Parzy, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *50*, 177-187.

[16] G. Naggaraj, M. Uma, M.S. Shivayogi, H. Balaram, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 145-149.

[17] C. Gumila, M.-L. Ancelin, A.-M. Delort, G. Jeminet, H. J. Vial, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **1997**, *41*, 523-529.

[18] B.J. Fennell, S. Carolan, G.R. Pettit, A. Bell, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2003**, *51*, 833-841.

[19] M.J. Gardener, *Nature*, **2002**, *419*, 498-511.

[20] A.-K. Müller, M. Labaled, S.H.I. Kappe, K. Matuschewski, *Nature*, **2005**, *433*, 164-167.

[21] I. Paterson, E.A. Anderson, *Science*, **2005**, *310*, 451-453.

[22] R. Breinbauer, M. Manger, M. Scheck, H. Waldmann, *Curr. Med. Chem*, **2002**, *9*, 2129-2145.

[23] R. Breinbauer, I.R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 3002-3015.

[24] Y.-W. Chin, M.J. Balunas, H.B. Chai, A.D. Kinghorn, *The AAPS Journal*, **2006**, *8*, 239-253.

[25] S. Grabley, R. Thiericke, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**, 3-37.

[26] B. Haefner, *Drug Discovery Today*, **2003**, *8*, 536-544.

[27] G. Taraboletti, M. Poli, R. Dossi, L. Manenti, P. Borsotti, G.T. Faircloth, M. Broggini, M. D'Incalci, D. Ribatti, R. Giavazzi, *B. J. C.*, **2004**, *90*, 2418-2424.

[28] V. Knight, J.J. Sanglier, D. DiTullio, S. Braccili, P. Bonner, J. Waters, D. Hughes, L. Zhang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *62*, 446-458.

[29] H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 619-627.

[30] J. Handelsmann et al, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 245-249.

[31] G.L. Challis, D.A. Hopwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2003**, *100*, 14555–14561.

[32] R. Müller, H. B. Bode, *Angew. Chem.,* **2005**, *117*, 6988-7007.

[33] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 251-234.

[34] C. Olano, B. Wilkinson, S.J. Moss, A.F. Braña, Carmen Méndez, P.F.Leadlay, J.A. Salas, *Chem.Comm*, **2003,** *22*, 2780-2782.

[35] T. Berger, L.M. Jamplonsky, M.W. Goldberg *Arch. Biochem.*, **1994**, *22*, 476.

[36] W. Keller-Scheirlein, *Experientia*, **1966**, *22*, 355-359.

[37] K. Anderton, R.W. Rickards, *Nature*, **1965**, *206*, 269.

[38] F.F. Fleming, *Nat. Prod. Rep*,**1999**, *16*, 597-606.

[39] K. Poralla, H. Zähner, *Arch. Mikrobiol.*, **1968**, *61*, 143-153.

[40] J.G. Hurdle, A.J. O'Neill, I. Chopra, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, *49*, 2, 4821-4833.

[41] M. Lumb, P.E. Macey, J. Spyvee, J.M. Whtitmarsh, R.D. Wright, *Nature*, **1965**, *206*, 263-265.

[42] E. Tsuchiya, M. Yukawa, T. Miyakawa, K.-I. Kimura, H. Takahashi, *J. Antibiotics*, **2001**, *54*, *1*, 84-90.

[43] T.Wakabayashi, R. Kageyama, K. Kitoh, Y. Watanabe, *J. Antibiotics.* (Tokyo), **1997**, *50*, 671-676,

[44] T.Kawamura, D. Liu, M.J. Towle, R. Kageyama, N. Tsukahara, T. Wakabayashi, B.A. Littlefield, *J. Atibiotics*, **2003**, *56*, 8, 709-715.

[45] K. Otoguro, H. Ui, A. Ishiyama, M. Kobayashi, H. Togashi, Y, Takahashi, R. Masuma, H. Tanaka, H. Tomoda, H. Yamada, s. Omura, *J. Antibiotics*, **2003**, *56*, 8, 727-729.

[46] C. Olano, B. Wilkinson, S.J. Moss, A.F. Braña, Carmen Méndez, P.F.Leadlay, J.A. Salas, *Chem.Comm*, **2003**, *22*, 2780-2782.

[47] S. Mochizuki, K. Hiratsu, M. Suwa, T. Ishii, F. Sugino, K. Yamada, H. Kinashi, *Mol. Microbiol.*, **2003**, *48*, 6, 1501-1510.

[48] N. Gaitatzis, B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 13082-13090.

[49] B. Wilkinson, G. Foster, B.A.M. Rudd, N.L. Taylor, A.P. Blackaby, P.J. Siebottom, M.J. Dawson, A.D. Buss, S. Gaisser, I.U. Böhm, C.J. Rowe, J. Cortés, P.F. Leadlay, J. Staunton, *Chem. Biol.*, **2000**, *7*, 111-117.

[50] M. Radzom, *Dissertation*, Uni Göttingen, **2006**.

[51] C. Olano, S.J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A.J. Weston, A.F. Braña, C. Méndez, P.F. Leadlay, B. Wilkinson, J.A. Salas, *Mol. Microbiol.* , **2004**, *52*, 1745-1756.

[52] C. Olano, B. Wilkinson, C. Sanchez, S.J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A.J. Weston, A.F. Brana, C.J. Martin, M. Oliynyk, C. Mendez, P.F. Leadlay, J.A. Salas, *Chem. Biol.* , **2004**, *11*, 87-97.

[53] G. Michal, *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **1999**, 61.

[54] T. Schuhmann, *Dissertation*, Uni Göttingen, **2004.**

[55] J. Aust, B. Schulz, U. Wanke, S. Draeger, *Mycol. Res.*, **1993**, *97*, 1447-1450.

[56] www99.mh-hannover.de/vorstand/biologsicherheit/texte/listepil.pdf, letzter Zugriff: 21.02.2007.

[57] J.E. Taylor, K.D. Hyde, E.B.G. Jones, *New Phytol.* , **1999**, *142*, 335-346.

[58] P.F. Cannon, C. M. Simmons, *Mycologia,* **2002**, *94*, *2*, 210–220.

[59] H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 619-627.

[60] J. Bitzer, *Dissertation*, Göttingen, **2005**.

[61] H. Laatsch, *AntiBase* – a database for the identification of natural products, Chemical Concepts, Weinheim, **2004.**

[62] *Dictionary of Natural Products on* CD-ROM, Version 13:2, Chapmann & Hall / CRC, Boca Ranton, (FL), **2004**.

[63] G. Assante, L. Camarada, L. Merlini, G. Nasini, *Symp. Pap.-IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod.* 11th, Sofia, Bulgaria, **1978**, *2*, 171.

[64] G. Nasini, A. Arnone, G. Assante, G. Candiani, O. Vajna de Pava, *Tetrahedron Lett*, **2002**, *43*, 1665-1668.

[65] Tübinger-Göttinger-Gespräche, **2006**.

[66] R. Thomas, *Nat. Pro. Rep.*, **2004**, 21, 224-248.

[67] H. Seto, M. Tanabe, *Tetrahedron Lett*, **2004**, *651*, **1974**.

[68] http://de.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus, letzter Zugriff: 22.02.2007.

[69] E. Börner, *Dissertation,* Freiburg, **2003**.

[70] G.M. Cox, W.A. Schell, R.L. Scher, J.R. Perfect, *J. Clin. Microbiol,* **1994**, *32*, 2301-2304.

[71] L. Born, F. Lieb, J.P. Lorentzen, H. Moeschler, M. Nonfon, R. Söllner, D. Wendisch, *Planta Med.*, **1990**, *56*, 312-316.

[72] Y. Che, J.B. Gloer, J.A. Scott, D. Malloch, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 6891-6894.

[73] S. Kuwahara, M. Enomoto, *Tetrahedron Lett.* , **2005**, *46*, 6297-6300.

[74] J. Murga, E. Falomir, M. Cardaa, J.A. Marcob, *Tetrahedron Lett.* , **2005**, *46*, 8199–8202.

[75] E.L. Eliel, S.H. Wilen, L.N. Mander, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, Wiley VCH, New York, **1994**, 1079–1080.

[76] M. Saito, H. Seto, H. Yonehara, *Agric. Biol. Chem.* , **1983**, *47*, 2935-2937.

[77] M. Quitschau, *Dissertation*, Göttingen, in Arbeit.

[78] S.R. Chhabra, B. Philipp, L. Eberl, M. Givskov, P. Williams, M. Cámara, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, *240*, 279–315.

[79] K. Umemura, N. Ogawa, J. Koga, M. Iwata, H. Usami, *Plant Cell Physiol.* , **2002**, *43*, 7, 778-784.

[80] G. Kawai, Y. Ikeda, *Biochim. Biophys. Acta; Lipid+ Lipidmetabolism*, **1983**, 754, 243-248.

[81] N.H. Schebb, *Diplomarbeit*, Uni Karlsruhe, **2005**.

[82] R.J. Cole, R.H. Cox, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, London, **1981**, 614.

[83] D.H. Watson, *J. Food Prot.* , **1984**, *47*, 485-488.

[84] M. Wittkowski, W. Baltes, W. Krönert, R. Weber, *Zeitschr. f. Lebensmitteluntersuchungen und-Forschung A*, **1983**, *177*, 447-453.

[85] M.E. Stack, E.P. Mazzola, S.W. Page, A.E. Pohland, *J. Nat. Prod.* , **1986**, *49*, 866-871.

[86] M.E. Stack, M.J. Prival, *Appl. Environ. Microbiol*, **1986.**, *52*, 718-722.

[87] http://www.micotoxinas.com.br. (20.2.2007)

[88] S.A. Younis, F.L. Al Rawi, *J. Biol. Sci. Res.*, **1998**, *19*, 245-252.

[89] *Dictionary of Natural Products on* CD-ROM, Version 13:2, Chapmann & Hall / CRC, Boca Ranton, (FL), **2004**.

[90] G.T. Liu, Y.Z. Qian, P. Zhang, W.H. Dong, Y.M. Qi, H.T. Guo, *Chin. Med. J. (Engl)* , **1992**, *105*, 394-400.

[91] E.E. Stinson, W.B. Wise, R.A. Moreau, A.J. Jurewicz, P.E. Pfeffer, *Can. J. Chem.* , **1986**, *64*, 1590-1594.

[92] W. Morse, *Proc. Am. Phil. Soc.*, **1929**, *65*, 3, 196-201.

[93] G.H, Willital, H. Heine, *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* , **1994**, *14*, 193-202.

[94] T.J. Simpson, D.J. Stenzel, *Chem. Comm.*,**1982**, 890-892.

[95] http://www.leatherheadfood.com/eman2/fsheet12.asp, letzter Zugriff: 16.03.2007.

[96] I. Brettar, R. Christen, M.G. Höfle, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* , **2002**, *52*, 1851-1857.

[97] M. Thorwest, *Dissertation*, Göttingen, **2002**.

[98] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, **Aufl. 1**, VCH; Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1994**.

[99] M. Hermansson, G.W. Jones, S. Kjelleberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, *53*, 2338-23342.

[100] S. Berger, S. Braun, H.-O. Kalinowski, *15-NMR-Sektroskopie Band 2*, Georg Thiemeverlag, Stuttgart, New York, **1992**.

[101] ACD/CNMR Predictor, Version 6.12, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, **2002**.

[102] http://cocon.nmr.de.

[103] R.A. Glennon, J.D, Smith, A.M. Ismaiel, M. El-Ashmawy, G. Battaglia, J.B. Fischer, *J. Med.Chem.*, **1991**, *34*, 1094-1098.

[104] H.C. Brown, J.V.B. Kanth, P.V. Dalvi, M. Zaidlewicz, *J.Org.Chem.* , **2000**,*65*, *15*, 4655-4660.

[105] T. Köhler, Z. Ou, J.T. Lee, D. Seidel, V.Lynch, K.M. Kadish, J.L. Sessler, *Angew.Chem.Int.Ed.* , **2005**, *44*, 83-87.

[106] C. Hartig, *Dissertation*, TU Berlin, **2000**.

[107] T.S. Suryanarayanan, J. Ravishankar, G. Venkatesan, T.S. Murali, *Mycol. Res.* , **2004**, 108, *8*, 974-978.

[108] I. Engh, M. Nowrousian, U. Kück, Poster, VAAM Jena, **2005**.

[109] M.L. Bouilant, P. Grout, J. Bernillon, J. Favre-Bonvin, N. Salin, N. Arpin, *Cryptogamie Mycol.*, **1998**, 10, 257-267.

[110] J.D. Nosanchuk, A. Casadevall, *Cell. Microbiol.*, **2003**, *5*, 4, 203-223.

[111] A.A. Bell, M.H. Wheeler, *Ann. Rev. Phytopathol.* , **1986**, *24*, 411-451.

[112] H.B. Bode, A. Zeeck, *Phytochemistry*, **2000**, *55*, 311-316.

[113] G.Tsuji, J. Fujikawa, H. Ishida, O. Horino, Y. Kubo, *J. Plant. Pathol.*, 67, *3*, 1345-2630, **2001**.

[114] M. Nowrousian, C. Ringelberg, J.C. Dunlap, J.J. Loros, U. Kück, *Mol. Genet. Genomics*, **2005**, 273, 137-149.

[115] I. Engh, *Dissertation*, Uni Bochum, in Vorbereitung.

[116] H.B. Bode, *Dissertation*, Uni Göttingen, **2000**.

[117] K. Langfelder, M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, A.A. Brakhage, *Fungal Genetics and Biology.* , **2003**, *38*, 2, 143-158.

[118] O. Schlörke, *Dissertation*, Uni Göttingen, **2006**.

[119] P. Venkatasubbaiah, W.S. Chilton, *J. Nat. Prod.* , **1991**, *54*, 1293-1297.

[120] G. Speranza, P.Manitto, D. Monti, F. Lianza, *Tetrahedron Lett.* , **1990**, *31*, 3077-3080.

[121] R. Thomas, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 612-627.

[122] M.H. Wheeler, B.D. Bruton, L.S. Puckhaber, J. Zhang, R.D. Stipanovic, *J. Agric. and Food Chem.*, **2004**, *52*, 4113-4120.

[123] M.L. Bouillant, J. Favre-Bonvin, N. Salin, J. Bernillon, *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 1517-1519.

[124] M.L. Bouillant, J. Bernillon, J. Favre-Bonvin, N. Salin, *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, **1989**, 44, 719-23.

[125] M.H. Wheeler, *Pest. Biochem. Physiol*, **1995**, *52*, 125-136.

[126] H.P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119–128.

[127] SciFinder Scholar 2004, Chemical Abstracts Service, Columbus (Ohio), **20.2.2007**.

[128] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, New York, **2005**, 11.

[129] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Aufl, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**, 112.

[130] D. Soullez, Y. Ramondenc, G. Pile, L. Duhamel, *Nat. Prod. Lett.*, **1994**, *4*, 203-208.

[131] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**, 59.

[132] T. Hosoe, K. Fukushima, K. Takizawa, M. Miyaji, K. Kawai, *Phytochemistry*, **1999**, 52, 459-463.

[133] H.L. Sleeper, V.J. Paul, W. Fenical, *J. Chem. Ecol.*, **1980**, *6*, 57.

[134] P. Nunh, *Naturstoffchemie*, **4. Aufl.**, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **2006**, 221.

[135] L. Hoffmann, *Dissertation*, Göttingen, **2006**.

[136] E. Pretsch, J. Seibel, W. Simon, T. Clerc, *Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1990**, H205.

[137] U. Höller, G.M. König, A.D. Wright, *J. Nat. Prod.* , **1999**, 62, 114-118.

Danksagung

Im Laufe des Studiums und vor allem während der Doktorarbeit wurden mir viele helfende Hände gereicht. Dafür bedanke ich mich an dieser Stelle ganz herzlich.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanke ich mich bei Sandra Lösgen, Stephanie Grond, Frank Surup, Martin Weitemeyer, Carola Zolke, Christiane Siebert, Herrn Machinek, Oliver Schlörke, Sven Meyer und Diana Wolff. Vor allem Martin aber auch allen anderen danke ich für die Hilfestellungen beim Arbeiten in der NMR-Abteilung.

Für die Aufnahme der HPLC-MS-Spektren und die „Auswertungssitzungen“ danke ich Luise Hoffmann, Nadine Czempinski, Daniel Vollmar, Markus Radzom und Karsten Ströch.
Marko Gentzsch danke ich für Hilfe mit all den unverständlichen Computer- und Druckerproblemen.
Frau Udvarnoki und Herrn Frauendorf danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Sven Meyer hat Zeit und Arbeit in die Aufnahme der NMR- und Massenspektren am AWI investiert und mir COCON nähergebracht. Vielen, vielen Dank.

Für die Hilfe bei mikrobiologischen Arbeiten und mit der widerspenstigen HPLC, das Messen physikalischer Daten und für bei Fragen offene Ohren bedanke ich mich bei Hans-Peter Kroll, Hans-Jörg Langer, Michaela Klingebiel und Verena Brandenburg. Ganz besonders dankbar bin ich in diesem Zusammenhang Jutta Gerber-Nolte. Diese gute Seele hat meine Arbeit ein gutes Stück weit mit getragen und dabei in der größten Chaos-Phase den Mut nicht verloren und die Stellung gehalten.
Diesen Menschen gebührt auch ein großer Dank für die ganzen „Heinzelmännchen-tätigkeiten“, die alles am Laufen halten.

Teile dieser Arbeit wurden von Luise Hoffmann, Oliver Schlörke, Sven Meyer, Diana Wolff, Sandra Lösgen und Nadine Czempinski zur Korrektur gelesen, auch dafür gilt ihnen mein Dank.

Für das herzliche Arbeitsklima, die generell große Hilfsbereitschaft und die Bereitschaft zur Diskussion zahlloser Fragen danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Besonders sei hier Stephanie Grond genannt, die mit ihren interessanten Ideen weiterhalf und vor allem mit ihrem Enthusiasmus beim Tüfteln und Rätseln ansteckt.

Nicht die Freude bei der Arbeit zu verlieren, dabei halfen „die Mädels“. Lui, Sandra, Adrijana – Ihr seid die Größten. Es war mir eine Ehre und ein Vergnügen. Bei allem Spaß wart Ihr mir auch moralische Unterstützung, starke Schulter und Analysten. Wenn es etwas größeres gibt als DANKE, ist es für Euch.

Marc Zimmermann hat mich bei allen „Unwettern“ aufrecht gehalten ohne zu kapitulieren. Seine Unterstützung und sein Verständnis haben alles etwas leichter gemacht. Aber er ist nicht nur der Fels in der Brandung für mich sondern vor allem das Glück.

Meinen Eltern, Annegret Heller-Plitzko und Klaus-Volker Plitzko, bin ich sehr dankbar, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Die Faszination der Chemie hat mein Vater mir früh gezeigt. Seit dem war das hier, was ich tun wollte und nun ist es geschafft - Danke, danke, danke.

Lebenslauf

Am 20.06 1980 wurde ich als Tochter von Klaus-Volker Plitzko und Annegret Plitzko (geb. Möller) in Buchholz i.d.N. geboren. Ich bin deutscher Staatsbürger.

Von Juli 1986 bis Juli 1990 besuchte ich die Grundschule Handeloh. Von August 1990 bis Juni 1992 schloss sich der Besuch der Orientierungsstufe am Kattenberge in Buchholz i.d.N. an. Ab August 1992 war ich Schülerin des Gymnasiums am Kattenberge in Buchholz i.d.N., welches ich im Mai 1999 mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Zum Wintersemester 1999/2000 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen und legte im Oktober 2001 die Diplom-Chemiker-Vorprüfungen ab. Von Oktober 2001 bis April 2004 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel „Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärstoffen aus zwei Streptomycetenstämmen“ an und absolvierte im Mai 2004 die Diplom-Chemiker Hauptprüfung.

Seit Juni 2004 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

Göttingen, 31. Mai 2007

Inken Plitzko