**Aufbau einer HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank
und ihre Anwendung im Screening
arktischer und antarktischer Meeresbakterien**

Dissertation

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

vorgelegt von

Imelda Schuhmann

aus Surabaya, Indonesien

Göttingen 2005

D7

Referent: Prof. Dr. H. Laatsch

Korreferent: Prof. Dr. A. Zeeck

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von Juni 2002 bis Mai 2005 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Laatsch durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Laatsch danke ich für die interessante Aufgabenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Naturstoffe aus marinen Organismen.....	2
1.2	Arktische und antarktische Meereisbakterien	4
1.3	Symbiotische und pathogene Mikroorganismen	6
2	Aufgabenstellung.....	9
3	Screening der Bakterienstämme.....	11
3.1	Biologisches Screening	11
3.2	Chemisches Screening.....	12
4	HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank.....	15
4.1	Aufbau einer HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank.....	15
4.1.1	HPLC-Bedingungen	15
4.1.2	UV/VIS-Diode-Array-Detektor	16
4.1.3	Electrospray-Massenspektrometrie	16
4.1.4	Die ESI-MS/MS-Methode.....	18
4.1.5	UV/VIS-MS/MS-Bibliotheken.....	24
4.2	Methodenanalyse.....	26
5	Fragmentierungen ausgewählter Substanzen	30
5.1.	Actinomycine	31
5.2.	Diketopiperazine	43
6	Untersuchung ausgewählter Stämme aus arktischen und antarktischen Habitaten.....	46
6.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. T268	46
6.1.1	Bestimmung der Taxonomie	46
6.1.2	Isatin	46
6.1.3	3-Hydroxy-3-acetonyloxindol.....	47
6.1.4	3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol	49
6.1.5	Ubichinon Q8	50

6.1.6	Ubichinon KQ5	51
6.1.7	Ubichinon KQ2	56
6.1.8	β -Carbolin-Derivate	57
6.1.9	Glutarsäure-Derivate	59
6.1.10	Indolderivate.....	60
6.1.11	Sonstige Metaboliten.....	61
6.2	<i>Salegentibacter holothuriorum</i> T436	63
6.2.1	Bestimmung der Taxonomie	63
6.2.2	4-Nitrophenol	63
6.2.3	4-Hydroxy-3-nitro-phenyl-Derivate.....	64
6.2.4	3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-Derivate.....	71
6.2.5	Pyriculamid	75
6.2.6	7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3'-Nitro- daidzein)	76
6.2.7	5,7-Dihydroxy-3-(3,5-dinitro-4-hydroxy-phenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3',5'-Dinitro-genistein)	77
6.2.8	Nitro- <i>N</i> _{β} -acetyltryptamine.....	79
6.2.9	Salegentipyrrol A	81
6.2.10	Salegentipyrrol B.....	83
6.2.11	4,5-Dinitro-3-methoxy-phenol	84
6.2.12	4,6-Dinitro-2-methoxy-phenol	85
6.2.13	Sonstige Metaboliten.....	85
6.2.14	Isolierte Nitrophenole.....	87
6.2.15	ESI-Fragmentierung der aromatischen Nitroverbindungen	91
6.3	<i>Actinomyces</i> sp. T426.....	94
6.3.1	Tryptophol und <i>p</i> -Hydroxybenzoesäuremethylester	94
6.4	<i>Actinomyces</i> sp. T421	95
6.4.1	<i>trans</i> -3-Methylthioacrylsäure.....	95
6.4.2	Benzoessäure und Phenyllessigsäure.....	96
6.5	Stamm T846	97
6.5.1	3-Indolylcarbonsäure und 3-Indolylcarbaldehyd	97
6.5.2	3-(Methylthio)propansäure.....	97
6.5.3	1,3,5-Triazin	98
6.6	Stamm T406	98

6.6.1	2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol	99
6.6.2	Ubichinon Q7	101
6.6.3	SS-43405e	101
6.6.4	Indolderivate.....	102
6.6.5	Cyclo(Dehydroalanyl-Isoleucyl)	103
6.6.6	2-Phenylethanol.....	105
6.7	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ACT7651	105
6.7.1	2'-Desoxyuridin	105
6.7.2	2'-Desoxythymidin.....	106
6.7.3	2'-O-Methyluridin.....	106
6.7.4	Enterocin	107
6.7.5	5-Desoxyenterocin	108
6.7.6	<i>trans</i> -Zimtsäureamid	110
6.7.7	Venturicidin A.....	110
7	Untersuchungen ausgewählter Stämme aus anderen Habitaten.....	112
7.1	<i>Streptomyces</i> sp. GW24/1811	112
7.1.1	Hopen-B	112
7.1.2	Poly(β -hydroxybuttersäure)	113
7.1.3	Komodochinon A	114
7.1.4	Komodochinon B	115
7.2	<i>Streptomyces</i> sp. GW16/3128	116
7.2.1	Glykolipide.....	116
7.3	<i>Streptomyces</i> sp. GW12/1492	118
7.3.1	X-14952B.....	118
7.3.2	Cervinomycin A ₂	119
7.3.3	Sonstige Metaboliten.....	120
7.4	<i>Streptomyces</i> sp. GW51/456	121
7.4.1	Thiothymin	121
7.4.2	β -Indomycinon	122
7.4.3	Saptomycin A.....	123
7.5	<i>Streptomyces</i> sp. Mei 24.....	124
7.5.1	4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion	124
7.5.2	4-Methylamino-7,8-dimethyl-isoquinolin-3,6-dion	124

7.5.3	Sonstige Metaboliten.....	125
8	Zusammenfassung.....	126
9	Materialien und Methoden.....	134
10	Experimenteller Teil	142
10.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. T268	142
10.1.1	Primärscreening.....	142
10.1.2	Kultivierung und Aufarbeitung	142
10.1.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	143
10.2	<i>Salegentibacter holothuriorum</i> T436	148
10.2.1	Primärscreening.....	148
10.2.2	Kultivierung und Aufarbeitung	149
10.2.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	149
10.3	<i>Actinomyces</i> sp. T426.....	159
10.3.1	Primärscreening.....	159
10.3.2	Kultivierung und Aufarbeitung	159
10.3.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	160
10.4	<i>Actinomyces</i> sp. T421	160
10.4.1	Primärscreening.....	161
10.4.2	Kultivierung und Aufarbeitung	161
10.4.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	161
10.5	Stamm T846	162
10.5.1	Primärscreening.....	162
10.5.2	Kultivierung und Aufarbeitung	162
10.5.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	162
10.6	Stamm T406	163
10.6.1	Primärscreening.....	163
10.6.2	Kultivierung und Aufarbeitung	163
10.6.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	163
10.7	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ACT7651	166
10.7.1	Primärscreening.....	166
10.7.2	Kultivierung und Aufarbeitung	166
10.7.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	167

10.8	<i>Streptomyces</i> sp. GW24/1811	170
10.8.1	Primärscreening.....	170
10.8.2	Kultivierung und Aufarbeitung	171
10.8.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	171
10.9	<i>Streptomyces</i> sp. GW16/3128	173
10.9.1	Primärscreening.....	173
10.9.2	Kultivierung und Aufarbeitung	174
10.9.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	174
10.10	<i>Streptomyces</i> sp. GW12/1492	175
10.10.1	Primärscreening.....	175
10.10.2	Kultivierung und Aufarbeitung	176
10.10.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	176
10.11	<i>Streptomyces</i> sp. GW 51/456	178
10.11.1	Primärscreening.....	178
10.11.2	Kultivierung und Aufarbeitung	179
10.11.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	179
10.12	<i>Streptomyces</i> sp. Mei24.....	181
10.12.1	Primärscreening.....	181
10.12.2	Kultivierung und Aufarbeitung	181
10.12.3	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten.....	182
11	Literaturverzeichnis.....	183

1 Einleitung

Die Untersuchung von Naturstoffen findet an der Schnittstelle zwischen Biologie und Chemie statt. Durch die Methoden der modernen Forschung ist die Aufklärung der molekularen Strukturen, welche den biologisch relevanten Stoffen zugrunde liegen, in hohem Maße vereinfacht worden. Dies trug maßgeblich dazu bei, dass man heute ein recht detailliertes Verständnis der von der Natur zum Aufbau chemischer Verbindungen mit völlig unterschiedlichen Aufgabenbereichen genutzten Prinzipien hat. Der Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur einerseits und den resultierenden biologischen Eigenschaften andererseits ist jedoch sehr komplex und bis heute Gegenstand intensiver Forschung.

In vielen Fällen bringen insbesondere die im Sekundärmetabolismus von Pflanzen und Tieren gebildeten Naturstoffe dem produzierenden Organismus einen entscheidenden Vorteil beim täglichen Kampf ums Überleben, wenngleich der ursächliche Zusammenhang im Detail oft nicht geklärt ist. Bis heute ist dabei die überwiegende Zahl an Naturstoffen aus Pflanzenextrakten isoliert worden. Betrachtet man solche Sekundärmetaboliten im Hinblick auf ihre mögliche Eignung als Arzneimittel, fällt auf, dass Pflanzen nur bedingt als Produzenten hochwirksamer Antibiotika auftreten. Letzteres ist vielmehr eine Domäne der Mikroorganismen.

Darüber hinaus erweisen sich Bakterien und Pilze, die als einzige Spezies alle Lebensräume erobert haben, unabhängig von ihrer phylogenetischen Einordnung als Produzenten einer weiten Bandbreite interessanter Substanzen. In den letzten Jahren galt die besondere Aufmerksamkeit der Naturstoffchemie vor allem der Untersuchung terrestrischer Actinomyceten und Pilze. Die Suche nach neuen, biologisch aktiven Naturstoffen hat das Interesse in jüngster Zeit jedoch verstärkt auf solche Organismen gerichtet, welche sich als Bewohner bisher wenig untersuchter Habitats auszeichnen. Ihre besondere Anpassungsfähigkeit, mitunter auch an extremste Bedingungen, lässt vermuten, dass sie zur Produktion von Substanzen mit spezieller Wirksamkeit befähigt sind.

Naturstoffe verfügen über eine hohe strukturelle Diversität. Fast alle bekannten Strukturelemente sind vertreten, wobei die zugrunde liegenden Molekülgrößen über einen großen Bereich variieren. Um diese große Substanzklasse einer effizienten Untersuchung zugänglich zu machen und die biologische Aktivität neu gefundener Verbindungen rasch ermitteln zu können, bedient man sich heute der Methode des High-Throughput-Screening (HTS).

1.1 Naturstoffe aus marinen Organismen

Seit Beginn der siebziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden mehr als 10 000 strukturell unterschiedliche Naturstoffe aus marinen Organismen isoliert, welche durch eine Reihe biologischer Aktivitäten auffielen.¹ Die größte Gruppe unter allen marinen Lebewesen bilden die Mikroorganismen, wobei sich die Zahl der vorkommenden Arten nur schwer abschätzen lässt. Es wird zudem vermutet, dass viele Wirkstoffe aus höheren marinen Organismen zu einem Großteil von mit ihnen assoziiert auftretenden Mikroorganismen gebildet werden. Bei der Betrachtung der isolierten Substanzen fällt auf, dass diese bereits teilweise aus terrestrischen Quellen bekannt sind.

Bislang erweist sich die medizinische Anwendung mariner Naturstoffe aus verschiedenen Gründen als problematisch. So können in diesem Kontext vielversprechende Substanzen oft nur in sehr geringen Mengen isoliert werden. Um die begrenzten natürlichen Ressourcen zu schonen, ist man auf eine Kultivierung der betreffenden Organismen im Labor angewiesen, welche sich insbesondere bei Invertebraten und/oder deren Symbionten als schwierig erweist. Hauptsächlich dann, wenn es um die Fermentation von Mikroorganismen geht, erweist sich die Etablierung geeigneter Systeme, welche die komplexen, marinen Umweltbedingungen im Labormaßstab nachbilden, als limitierender Faktor. Trotz dieser Hindernisse sind einige marine Naturstoffe bereits Gegenstand klinischer bzw. präklinischer Studien.

Tabelle 1 Beispiele von marinen Naturstoffen, welche sich in der klinischen oder präklinischen Phase befinden.^{2,3}

Substanz	Organismen	Krankheit	Klinische Phase
Ziconotide (Prialt TM)	<i>Conus magnus</i> (Molusk)	Neuropathien	III
Ecteinascidin 743 (Yondelis TM)	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (Tunikate)	Krebs	II/III
Bryostatin 1	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoon)	Krebs	II
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia</i> (Molusk, später in Cyanobakterien gefunden)	Krebs	II
IPL-576092	<i>Petrosia contignata</i> (Schwamm)	Psoriasis	II
IPL-512602	<i>Petrosia contignata</i> (Schwamm)	Asthma/Entzündung	II
Thiocoraline	<i>Micromonospora marina</i> (Bakterium)	Krebs	präklinisch

Bei dem ersten marinen Naturstoff, der sich als Krebsmittel in klinischen Untersuchungen befand, handelt es sich um Didemnin B (**1**). Dieser Wirkstoff konnte bereits im Jahre 1981 aus Tunikaten isoliert werden.⁴

1

Das Antikrebsmittel Bryostatin 1 (**2**), welches zum ersten Mal in den siebziger Jahren als Metabolit des Bryozoon *Bugula neritina* gefunden wurde, konnte erst im Jahre 1982 per Röntgenkristallographie in seiner Struktur vollständig aufgeklärt werden.⁵ Neuere Befunde deuten auf einen mikrobiellen Ursprung als Quelle von **2** hin, was die Möglichkeit zur Kultivierung des produzierenden Symbionten eröffnen könnte.⁶

2

Ein anderes Beispiel für einen marinen Naturstoff mit interessanter biologischer Aktivität ist das aus dem Dinoflagellaten *Gambierdiscus toxicus* isolierte Maitotoxin (**3**).^{7,8} Diese zur Klasse der Polyether gehörende Verbindung zählt zu den potentesten bislang gefun-

denen Giften und stellt das nicht-peptidische Toxin mit dem größten bekannten Molekulargewicht dar. Zur Strukturaufklärung wurde das Molekül chemisch gespalten und die erhaltenen Bruchstücke wurden anschließend per HPLC getrennt und mittels NMR-Spektroskopie analysiert.

3

1.2 Arktische und antarktische Meereisbakterien

Ein außergewöhnliches marines Habitat bildet das arktische und antarktische Eis. Hier findet man neben extremophilen Mikroorganismen wie Bakterien und Algen auch höher entwickelte Lebewesen wie Krebse und Würmer. Offenbar bietet Meereis für das Wachstum von Mikroorganismen günstige Voraussetzungen, auf gleiche Volumina bezogen ist es sogar dichter besiedelt als Nordseewasser während der Algenblüte.⁹

Meereis wird aus zunächst entstehenden Süßwassereiskristallen gebildet, welche unter dem Einfluss von Wind und Wellen zu kompakterem Eis zusammengepresst werden. Bei diesem Prozess wird kontinuierlich Salzwasser eingeschlossen, aus dem wiederum Süßwasser auskristallisieren kann. Ein Teil der dabei gebildeten konzentrierten Sole sinkt aufgrund ihrer höheren Dichte während der Eisbildung ins Meerwasser, ein anderer verbleibt in abgeschlossenen Eiszwischenräumen im Eis. In den sogenannten Salzlaugenkanälen reichert sich also eine hochgesättigte Salzlösung an, deren Konzentration nach Temperatur und Eishöhe abhängt. In den sich hier bietenden ungewöhnlichen Lebensräumen finden besonders angepasste Kieselalgen, Dinoflagellaten, Mikroalgen, Pilzen und Bakterien eine ökologische Nische.

Kälteadaptierte Mikroorganismen, welche nur in einem Temperaturbereich von ca. -2 bis 20 °C existieren können, bezeichnet man als psychrophil. Das Wachstumsoptimum findet man hier zwischen 4 und 10 °C. Psychrotrophe Arten hingegen können auch Temperaturen bis 40 °C tolerieren. Mikroorganismen, die an normale (mesophile) Bedingungen angepasst sind und trotzdem kurzzeitige Kälteperioden ohne Schaden überdauern, werden als psychrotolerant bezeichnet.

Über die niedermolekularen Stoffwechselprodukte, die von kälteadaptierten Organismen produziert werden, ist derzeit noch recht wenig bekannt. Ein Beispiel an dieser Stelle ist die Verbindung *N*_B-Acetylkynuramin (**4**), die in unserer Arbeitsgruppe aus antarktischem Meereisbakterium ANT V/2 253 isoliert und identifiziert wurde.¹⁰

4

Andere Beispiele sind die Verbindungen Haliclamin C (**5**) und D (**6**) genannt, die zur Substanzklasse der 3-Alkyltetrahydropyridin-Alkaloide gehören und als Metabolite des arktischen Schwamms *Haliclona viscosa* isoliert wurden.¹¹

5 $n_1 = 7$; $n_2 = 5$

6 $n_1 = 8$; $n_2 = 5$

Weitere Vertreter von Stoffwechselprodukten kälteadaptierter Organismen sind die aus *Pseudomonas fluorescens* 51W isolierten Verbindungen Pyoverdin 51W (**7**), suc-Pyoverdin 51W und suca-Pyoverdin 51W.¹² Diese Substanzen bilden Chelatkomplexe mit Eisen(III)-Ionen, was die Aufnahme dieses essentiellen Elements durch die Zelle erleichtert. Die Produktion solcher als Siderophore bezeichneten Chelatbildner wird unter Eisenmangelbedingungen induziert; bei den Eisenkomplexen handelt es sich meist um rotbraun gefärbte Verbindungen. Die auffällige gelb-grüne Farbe der fluoreszierenden Pseudomonaden ist jedoch durch Pyoverdine bedingt.¹³

7

1.3 Symbiotische Mikroorganismen

Mikroorganismen treten oft im Verbund mit höher entwickelten Lebewesen auf. Der Begriff „Symbiose“ wird im klassischen Sinn verwendet, um Beziehungen zwischen zwei Organismen zu beschreiben, die unterschiedlichen Spezies angehören und physikalisch nahe assoziiert auftreten. Eine für beide Seiten nützliche Symbiose wird dabei als Mutualismus bezeichnet. Profitiert nur ein Organismus von der Lebensgemeinschaft und geht diese zu Lasten des anderen, so spricht man von parasitären Verhältnissen. Im Fall von pathogenen Keimen führen diese zusätzlich zu einer Erkrankung des befallenen Wirts. Die Forschung auf dem Gebiet der symbiotisch lebenden Bakterien und Pilze ist durch den Umstand, dass es sich hierbei vielfach um nur schwer oder nicht kultivierbare Mikroorganismen handelt, stark beeinträchtigt.

8

Ein Beispiel für einen Naturstoff, welcher von symbiotisch mit Dinoflagellaten assoziierten Mikroorganismen gebildet wird, stellt Saxitoxin (**8**) dar. Während der Dinoflagellaten-Blüte, die auch als „rote Schleife“ bekannt ist, kommt es zur Freisetzung verschiedener Gifte in die marine Nahrungskette, wobei **8** eine wesentliche Komponente

darstellt. Der Verzehr von Fischen und Schalentieren, in denen diese Toxine angereichert sind, kann zu einer Reihe von Vergiftungen beim Menschen wie beispielsweise dem PSP (*paralytic shellfish poisoning*) führen.¹⁴ KODAMA und Mitarbeiter konnten bereits 1988 ein intrazelluläres Bakterium aus dem Dinoflagellaten *Alexandrium tamarense* isolieren, welches Saxitoxin (**8**) produziert.¹⁵ Seitdem wurden zahlreiche weitere Toxin produzierende Bakterien aus Dinoflagellaten isoliert.¹⁶

9 **10**

Extern ausgebrütete Embryonen der Shrimpsart *Palaemon macrodactylus* sind resistent gegen Infektionen, die von dem Pilz *Lagenidium callinectes* hervorgerufen werden. FENICAL und Mitarbeiter fanden¹⁷, dass eine bestimmte Alteromonaden-Art, die auf der Oberfläche der gesunden Embryonen lokalisiert ist, Isatin (**9**) produziert. Diese Verbindung hemmt das Wachstum von *L. callinectes*. Ein ähnlicher Abwehrmechanismus, welcher auf von Gram-negativen Bakterien produziertem Tyrosol (**10**) beruht, wurde auch bei Hummer-Embryonen gefunden.¹⁸

11

Fugu-Fisch ist eine Delikatesse in der japanischen Küche. Da sowohl Eierstöcke als auch Leber dieser Fischart hoch toxisch sind, darf sie nur von speziell ausgebildeten Köchen zubereitet und serviert werden. Das enthaltene Neurotoxin, welches zur Blockierung der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle führt,¹⁹ wurde als Tetrodotoxin (**11**) identifiziert.²⁰ Diese Verbindung konnte ebenfalls als Metabolit von Bakterien gefunden werden, welche man aus dem Fisch isolierte.^{21,22}

Pathogene Keime bedienen sich vielfach der Hilfe von Siderophoren, um durch Chelatbildung die Aufnahme essentieller Eisenionen aus dem Wirt zu ermöglichen. Dieses im Wirt in vergleichsweise großer Menge vorhandene Element ist stark an intra- und extrazelluläre Komponenten gebunden.²³ Sinkt die Menge an freien Eisenionen unter einen bestimmten Wert, kann das pathogene Bakterium seinen Bedarf nicht mehr decken und stirbt ab.²⁴ Aus diesem Grund können höhere Organismen die Konzentration freier Eisenionen im Zuge einer Abwehrreaktion bei einer Infektion bis auf Werte reduzieren, die noch keinen Einfluss auf lebenswichtige Funktionen beim Wirt haben, eine Ausbreitung der Bakterien aber erschweren. Ein Vertreter eines solchen eisenabhängigen pathogenen Keims ist das Pyochelin (**12**) produzierende Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, welches eine Infektion der menschlichen Lunge verursachen kann.²⁵

12

Einige Pflanzen, insbesondere Apfelbäume, produzieren bei einer Infektion der Blätter (Apfelschorf) oder der Haarwurzeln die sog. Opine, weil die für deren Biosynthese verantwortlichen Gene über ein bakterielles Plasmid in das pflanzliche Genom eingeschleust wurden.²⁶ Die Opine wiederum werden von Parasiten wie *Agrobacterium tumefaciens* und *A. rhizogenes* als Wachstumsfaktoren benötigt. Eine derartige Pflanzen-Bakterien-Beziehung ist ein Beispiel für eine natürliche genetische Manipulation.

2 Aufgabenstellung

Ökologische oder symbiotische Wechselwirkungen sind also überwiegend chemischer Natur, wobei sicherlich auch die Habitate der jeweiligen Organismen eine gewichtige Rolle spielen. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen wird durch die Komplexität ökologischer Systeme allerdings erheblich erschwert, weshalb am Anfang Untersuchungen an Modellsystemen oder zumindest einfachen Lebensgemeinschaften sinnvoll sind. Die Aufklärung einer chemischen Kommunikation erfordert immer erst die Bilanzierung des chemischen Vokabulars, welches unter anderem aus mikrobiellen Sekundärmetaboliten aufgebaut ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung polarer Mikroorganismen, welche aufgrund ihres Habitates von besonderem Interesse sind. So handelt es sich bei Arktis und Antarktis um einzigartige, nahezu abgeschlossene Ökosysteme, deren Lebensgemeinschaften im Hinblick auf ökologische und symbiotische Zusammenhänge bisher nur wenig untersucht wurden. Zudem bestehen in unserer Arbeitsgruppe bereits erste Erfahrungen im Umgang mit polaren Mikroorganismen,¹⁰ welche eine gute Basis für weitere Arbeiten auf diesem Gebiet darstellen.

Die für die Untersuchungen benötigten Bakterienstämme sind über bestehende Zusammenarbeiten mit dem Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (Kaiserslautern) und dem Alfred-Wegener-Institut (Bremerhaven) zugänglich. Rohextrakte müssten nach einem biologischen und chemischen Screening chromatographisch aufgetrennt und die Strukturen der so erhaltenen Reinsubstanzen mit geeigneten Methoden aufgeklärt werden.

Voraussetzung für die geplanten Arbeiten ist eine leistungsfähige Analytik, für die sich aus verschiedenen Gründen besonders die ESI-Massenspektrometrie in Kombination mit *weiteren* analytischen Methoden, wie UV-Spektroskopie und HPLC, anbietet.

Mithilfe dieser Techniken ist zunächst eine HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank von mikrobiellen Sekundärmetaboliten aufzubauen, die in unserer Arbeitsgruppe isoliert wurden. Die erstellte Datenbank würde anschließend nicht nur zur Dereplikation bekannter Verbindungen im Screening von Meereisbakterien nutzbar sein, sondern sich allgemein auch zur Dereplikation von Metaboliten aus anderen Bakterienstämmen eignen.

Es liegt nahe, die erhaltenen Daten zu einer genaueren Untersuchung von ESI-Fragmentierungswegen unterschiedlicher Substanzklassen zu nutzen, um auch die Strukturzuordnung bislang nicht bekannter bzw. nicht in der Datenbank vorhandener Substanzen zu ermöglichen.

Einen weiteren Aspekt der vorliegenden Arbeit bildet die Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus terrestrischen sowie marinen Actinomyceten-Stämmen, deren Rohextrakte sich durch biologische Aktivität bzw. interessante Zonen im chemischen Screening auffällig zeigen. Die vom Institut für Bodenkunde (Lohra-Kirchvers), dem Alfred-Wegener-Institut (Bremerhaven) und der Fachhochschule Ostfriesland (Emden) bereitgestellten Stämme sollten in größerem Maßstab kultiviert und die gebildeten Sekundärmetaboliten mithilfe chromatographischer Methoden isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.

3 Screening der Bakterienstämme

Die von der Natur zur Synthese bakterieller Sekundärstoffe verwendeten Mechanismen ermöglichen eine nahezu unbegrenzte Strukturvielfalt, welche ein enormes Potenzial an unterschiedlichsten biologischen Aktivitäten birgt. Um das Metabolitenspektrum eines Stammes beurteilen und geeignete Produzenten auswählen zu können, führt man zunächst ein Screening durch. Dies kann wirkungsorientiert als biologisches Screening mit Hilfe lebender Organismen oder entsprechend angepasster Modelle erfolgen oder im Fall des chemischen Screening auf bestimmten chemischen bzw. physikalischen Stoffeigenschaften basieren. Zur experimentellen Durchführung bedient man sich der Rohextrakte der zu untersuchenden Stämme. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit durch Kultivierung in Schüttelkolben und anschließende standardisierte Aufarbeitung der Kulturbrühen erhalten.

3.1 Biologisches Screening

Die Prüfung der biologischen Aktivität eines Rohextraktes bzw. bereits vorgetrennter Fraktionen gegenüber bestimmten Testorganismen (z. B. Bakterien, Pilze, Algen und Zelllinien) kann in Form eines Plattendiffusionstests erfolgen. In Abhängigkeit von der Größe des sich ergebenden Hemmhofes kann hier eine Beurteilung hinsichtlich der Aktivität einer Substanz bzw. eines Extrakts vorgenommen werden. Zur Bewertung der Cytotoxizität gegenüber höheren Organismen dienen Tests z. B. mit Salinenkrebsen (*Artemia salina*) und Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), wobei die cytotoxische Aktivität hier anhand der Mortalitätsrate der Larven bestimmt wird. Als Nachteil dieses Screeningsansatzes erweist sich dessen Limitierung auf die verwendeten Testsysteme. Wird ein Extrakt als nicht aktiv eingestuft, erfolgt dessen Aussortierung. Dies birgt allerdings die Gefahr, dass Substanzen mit einem im Testsystem nicht erfassten Wirkspektrum wegen der vermeintlich fehlenden biologischen Aktivität nicht weiter bearbeitet werden. Als weiterhin problematisch erweisen sich falsch positive Ergebnisse, welche beispielsweise auf synergistischen Effekten im untersuchten Substanzgemisch beruhen, sowie (hoch)aktive Substanzen, welche aufgrund ihrer gering Konzentration nicht in ausreichenden Mengen isoliert werden können.

In neuerer Zeit finden verstärkt Target-orientierte Testsysteme Verwendung, welche allerdings ein detailliertes Verständnis von Krankheitsursachen und –symptomen auf molekularer Ebene voraussetzen. Man bedient sich hier Rezeptor- oder Enzym-basierter

Assays, welche im High-Throughput-Verfahren betrieben werden und ein zeit- und kosten-effizientes industrielles Screening großer Substanzbibliotheken ermöglichen. Durch sorgfältige Auswahl der verwendeten Target-Systeme kann hiermit gezielt nach solchen Stoffen gesucht werden, welche als Therapeutika mit ursächlichem Wirkprinzip zur effizienten Behandlung bestimmter Erkrankungen eingesetzt werden können.

3.2 Chemisches Screening

Im klassischen chemischen Screening werden Extrakte dünnschichtchromatographisch untersucht, wobei substanzspezifische Parameter wie Eigenfarbe, UV-Löschung, R_f -Wert sowie Anfärbeverhalten mit Sprühreagenzien als Auswahlkriterien zur Bewertung des Metabolitenspektrums eines Produzenten herangezogen werden. Hierbei werden meist Kombinationen unterschiedlicher Sprühreagenzien wie Anisaldehyd/Schwefelsäure (charakteristische Anfärbung von Glykosiden, Steroiden, Terpenen, Makroliden, Phenolen) und Ehrlich Reagenz (Amine, Indole, Furane, Pyrrole) verwendet. Dies dient dazu, eine möglichst große Zahl an Verbindungen sichtbar zu machen und erlaubt vielfach erste Rückschlüsse auf das Vorliegen bestimmter Substanzklassen. Eine exakte Identifizierung von bereits bekannten Metaboliten kann hier jedoch nicht erfolgen, was sich als einer der größten Nachteile dieser Form des chemischen Screenings erweist.

Die insbesondere in den letzten Jahrzehnten intensivierte Forschung auf dem Gebiet der Naturstoffisolierung hat mittlerweile nämlich dazu geführt, dass zunehmend häufig – bis zu über 90 % bei terrestrischen Streptomyceten – bereits bekannte Verbindungen isoliert werden. Um ein effizientes Auffinden neuer Substanzen sicherzustellen, ist es daher unumgänglich, in einem möglichst frühen Stadium bereits bekannte Verbindungen zu erkennen und auszumustern. Dieser als Dereplikation bezeichnete Vorgang ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die Kopplung von chromatographischen mit spektroskopischen Untersuchungsmethoden, wie z. B. LC-NMR, LC-CD, LC-UV/VIS, GC-EI-MS sowie LC-ESI-MS ermöglicht die Erstellung mehrdimensionaler Substanzdatenbanken und trägt damit erheblich zu einer Vereinfachung des Dereplikationsprozesses bei. Diese in den letzten Jahren entwickelten Methoden erlauben die Wiedererkennung von Komponenten komplexer Gemische ohne vorherige präparative Trennung, was drastische Zeit- und Kosteneinsparungen mit sich bringt.

Da die LC-NMR-Kopplung auf relativ hohe Substanzmengen angewiesen sowie relativ teuer ist, kann sie nicht für Routineuntersuchungen eingesetzt werden. Als zusätzlicher Nachteil erweist sich die nicht immer vollständige Substanztrennung mittels HPLC, welche zu komplexen, nicht auswertbaren NMR-Spektren von Stoffgemischen führt. Ein HPLC-CD-basiertes Screening andererseits setzt das Vorhandensein chiraler Kohlenstoffatome sowie geeigneter chromophorer Gruppen in einem Molekül voraus, wobei sich nur wenige Informationen über die vorliegenden Substanzen aus den erhaltenen CD-Spektren ableiten lassen. Die mangelnde Spezifität von UV-Spektren (mehrere Substanzen können ähnliche UV-Spektren besitzen), ihre Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und die Tatsache, dass viele Substanzen keine oder nur geringe UV-Absorption zeigen, macht auch ein HPLC-UV/VIS-basiertes Screening zu einem wenig zuverlässigen Ansatz. Der Einsatz der GC-MS-Kopplung birgt den Nachteil, dass nur thermisch stabile, flüchtige und zumeist unpolare Substanzen zugänglich sind. Die darin begründete Notwendigkeit einer nicht immer gelingenden Derivatisierung von ansonsten hier nicht detektierbaren Substanzen erschwert den Identifikationsprozess. Weiterhin wirkt sich bei dieser Methode die häufig beobachtete Bildung von Artefakten störend aus.²⁷ Der Einsatz von HPLC-MS im Screeningsprozess schließlich bringt als Nachteil mit sich, dass die Messparameter Retentionszeit und Molekulargewicht in vielen Fällen nicht ausreichen, um eine Substanz eindeutig zu charakterisieren. Dies kann zu einem versehentlichen Aussortieren von noch unbekannten Verbindungen führen.

Aus den angegebenen Gründen wurde eine Methode weiterentwickelt, welche die umfassende, treffsichere und zugleich sensitive Analyse unterschiedlicher Verbindungsklassen durch gleichzeitige Aufnahme verschiedener spektroskopischer Daten gestattet. Hier erwies sich die Kopplung von HPLC und UV/VIS-DAD als sinnvoll, welche die parallele Messung eines UV-Chromatogramms* und –Spektrums der einzelnen Verbindungen in einem Substanzgemisch ermöglicht. Durch Kopplung mit einem ESI-Massenspektrometer können zusätzlich deren Molekulargewichte sowie mittels MS/MS das für viele Verbindungen charakteristische Fragmentierungsmuster ermittelt werden. Somit können während eines einzelnen Messvorgangs mehrere substanzspezifische Daten erhalten werden, welche in den meisten Fällen zur eindeutigen Identifizierung einer Verbindung ausreichen. Voraussetzung für diesen Ansatz ist der Zugang zu einer großen Zahl an Reinsubstanzen, die möglichst den Strukturraum der zu untersuchenden

* Gemeint ist ein Chromatogramm mit Detektion durch Messung der Extinktion.

Naturstoffe abdecken sollten. Diese bilden ferner die Grundlage zur Erstellung einer umfassenden Substanzbibliothek.

Der Einsatz der HPLC-UV/VIS-MS/MS-Kopplung erfolgt dabei im Rahmen des chemischen Screenings und liefert ergänzende Informationen, welche über die Ergebnisse aus dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen und die Resultate aus biologischen Testungen hinausgehen. Produziert ein Stamm ausschließlich bereits bekannte Sekundärstoffe, können diese mittels Datenbankvergleich zugeordnet und das Metabolitenspektrum somit vollständig charakterisiert werden. Weiterhin ist ein Einsatz der HPLC-UV/VIS-ESI-MS/MS-Kopplung zur raschen Identifizierung von gesuchten neuen bzw. bereits bekannten Verbindungen während des Isolierungsprozesses mitunter gewinnbringend (Abbildung 1). Ebenso ist diese Screeningmethode für eine effiziente Identifizierung von zu untersuchenden Verbindungen im Rahmen von Fütterungs- und Medienvariationsansätzen geeignet.

Abbildung 1 Vorgang der Naturstoffisolierung aus Mikroorganismen.

4 HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank

4.1 Aufbau einer HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank

Abbildung 2 Schematischer Verlauf der Messung.

4.1.1 HPLC-Bedingungen

Für die chromatographische Trennung wurden zwei HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Säulenmaterialien und -größen von zwei verschiedenen Herstellern zu Vergleichszwecken herangezogen. Bei gleichem Durchmesser von zwei Millimetern besaß die RP-C18-Kieselgelsäule (Macherey & Nagel) eine Länge von 125 mm, während eine mit RP-C12-Material befüllte Säule (Phenomenex) 150 mm lang war. Aufgrund der geringeren Zahl freier Silanolgruppen und der sich daraus ergebenden besseren Trenneigenschaften, insbesondere für basische Verbindungen, wurde letztere für die Erstellung der Spektrenbibliothek ausgewählt. Als mobile Phase diente ein Methanol/Wasser-Gradient (Abbildung 3), welcher zur Erhöhung der Trennschärfe jeweils mit 0.05 % Ameisensäure versetzt wurde. Ohne Säurezusatz war die Tendenz zu einer Peakverbreiterung erkennbar, was die

automatisierte Fragmentierung der gewünschten Verbindung im dependent scan mode^{*} erschwerte (siehe Kapitel 4.1.4). Vergleichende Untersuchungen mit dem Laufmittelsystem Acetonitril/Wasser führten nicht zu generell besseren Ergebnissen, weswegen dies aufgrund schlechterer Lösungseigenschaften bei der Probenvorbereitung nicht zum Einsatz kam. Eine Flussrate von 300 µl/min sowie ein Injektionsvolumen von 5 µl erwiesen sich für die angestrebten Analysen als optimale Messparameter. Die HPLC-chromatographischen Trennungen fanden durchweg bei Raumtemperatur statt.

Abbildung 3 Verlauf des zur Erstellung der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank verwendeten Methanol/Wasser-Gradienten.

4.1.2 UV/VIS-Diode-Array-Detektor

Die per HPLC getrennten Substanzen wurden mittels eines UV/VIS-DAD im Bereich von 200 bis 800 nm bei einer Auflösung von 5 nm spektroskopisch analysiert. Anhand des so erhaltenen UV-Chromatogramms konnte die Anzahl der in der Probe vorhandenen Verbindungen abgeschätzt werden. Die dadurch ebenfalls zugänglichen UV-Spektren beinhalten zusätzlich oft wertvolle Informationen über die vorliegenden Substanzklassen. Verbindungen, welche in dem verwendeten UV/VIS-Messbereich keine oder nur geringe Absorptionseigenschaften besaßen, konnten hier jedoch nicht detektiert werden.

4.1.3 Electrospray-Massenspektrometrie

Bei dem zum Aufbau der Datenbank eingesetzten Messaufbau war das Massenspektrometer in Serie an den UV/VIS-Detektor gekoppelt. Dadurch ergab sich eine

^{*} Automatischer Messablauf, in dem durch die Voreinstellungen nur bestimmte Ionensignale fragmentiert werden.

Zeitverzögerung von etwa fünf Sekunden zwischen UV/VIS- und MS-Signal. Aufgrund des verwendeten flüssigchromatographischen Trennverfahrens war der Einsatz von ESI (Electrospray Ionisation) als Ionisierungsart vorgegeben. Diese schonende Methode erwies sich bei der Analyse der vorliegenden Naturstoffe als durchaus vorteilhaft, da sie in den meisten Fällen die Bildung eines Molekülions gewährleistete. Um trotz der vorgegebenen hohen Flussrate die Erzeugung eines optimalen Sprays mit möglichst geringen Durchmessern zu erreichen, wurde eine erhöhte Kapillartemperatur von 220 °C gewählt.

Abbildung 4 Mit unterschiedlichen Kollisionsenergien (ISCID) erhaltene MS-Spektren.

Die Massendetektion wurde im positiven und im negativen Modus durchgeführt, wobei es in den meisten Fällen zur Bildung von Monomer-Ionen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M-H]^-$) sowie Dimer-Ionen ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$ und $[2M-H]^-$) kam. Die häufig in den Massenspektren beobachteten Dimer-Ionen führten zu keinem interpretierbaren Fragmentierungsmuster und störten zudem aufgrund ihrer hohen Intensitäten eine automatisierte Selektion der zu fragmentierenden Ionen (siehe Kapitel 4.1.4). Somit war es zweckmäßig, die Dimerbildung zu unterdrücken und damit eine höhere Signalintensität der Monomerionen zu gewährleisten. Um dies zu ermöglichen, musste eine zusätzliche Kollisionsenergie in der Quelle (**In Source Collision-induced Dissociation**, ISCID) angelegt werden, so dass auftretende Dimere zurück in die Monomeren zerfielen, wobei letztere wiederum nicht zur Fragmentbildung angeregt werden durften. Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der Moleküle musste eine mittlere Energie dafür ausgewählt werden. Anhand von Experimenten mit verschiedenen Energien zeigte sich, dass ein Wert von 10 V für die durchgeführten Untersuchungen am besten geeignet ist (Abbildung 4).

Datenbanken, welche als Moleküleigenschaften die Retentionszeit, das UV-Spektrum sowie das Molekulargewicht beinhalten, sind bereits weit verbreitet und werden vielfach eingesetzt. Konstitutionsisomere ohne charakteristische UV-Spektren können anhand dieser Daten allerdings nicht unterschieden werden. Isomere Verbindungen, welche identische Chromophor-Grundgerüste, aber unterschiedliche Seitenkette besitzen, weisen gleiche UV- und Massenspektren sowie ähnliche Retentionszeiten auf und sind somit ebenfalls nur schwer zu identifizieren. Aus diesen Gründen liegt die Einbeziehung zusätzlicher Informationen in eine Datenbank nahe, welche die Unterscheidung solcher Verbindungen ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde diesbezüglich auf MS/MS-spektrometrische Daten zurückgegriffen.

4.1.4 Die ESI-MS/MS-Methode

Die bisher vorhandenen MS/MS-Techniken basieren auf einer durch Zusammenstöße mit Argon- bzw. Heliumatomen induzierten Fragmentierung (**Collision-induced Dissociation**, CID). Diese wird bei Triple-Quadrupol- und Ion-trap-Massenspektrometern in einem separaten Prozess vollzogen.²⁸ Bei Einsatz der beiden letztgenannten Instrumente findet somit eine Vorauswahl der zu fragmentierenden Massennionen statt, was zu geringeren Störsignalen und demgemäß zu einer deutlich höheren Qualität der CID-Spektren führt. Im

Zuge dieser Arbeit wurde auf die Verwendung eines Ion-Trap-Massenspektrometers zurückgegriffen.

Abbildung 5 Mit unterschiedlichen Kollisionsenergien erhaltene MS/MS-Spektren.

Die zur Induktion der Fragmentierung erforderliche Kollisionsenergie nimmt mit steigenden m/z -Werten zu.²⁹ Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, werden in der Regel normierte Kollisionsenergien angegeben, welche um den masseabhängigen sowie um einen gerätespezifischen Teil korrigiert sind. Wählt man für das Experiment zu

niedrige Kollisionsenergien, so kommt es zu keiner ausreichenden Fragmentierung, während zu hohe Energien niedrigere Fragmentintensitäten zur Folge haben (Abbildung 5). Um den für die Erstellung einer Naturstoff-Datenbank geeigneten Energiewert zu ermitteln, wurden im Vorfeld systematische Untersuchungen durchgeführt. Diese führten zu dem Ergebnis, dass eine mittlere Kollisionsenergie von 35 % zur Fragmentierung der vorliegenden, strukturell hoch variablen Verbindungsklassen am zweckmäßigsten erschien.

Fragmentierungen erfolgen im Regelfall an der Stelle des Moleküls, an der die positive bzw. negative Ladung lokalisiert ist. Seltener kommt es zur sogenannten „charge-remote“-Fragmentierung, welche unabhängig von der Position der Ladung ist. In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass protoniert vorliegende Molekülonen im Vergleich zu entsprechenden Natriumaddukten über deutlich unterschiedliche Fragmentierungsmuster verfügen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass H^+ - und Na^+ -Ionen an unterschiedlichen Stellen des zu fragmentierenden Moleküls binden und damit auch die Ladung an verschiedenen Positionen eingeführt wird. Zusätzlich findet eine Wanderung der H^+ -Ionen innerhalb eines Moleküls während des Fragmentierungsprozesses statt.

Die Selektion der Massenionen, welche fragmentiert werden sollten, erfolgte im dependent scan Modus. Bei der vorliegenden Arbeit wurden die zugrunde liegenden Parameter so gewählt, dass es zur sukzessiven Fragmentierung der beiden intensivsten Ionen im Full-scan-Spektrum* kam.

Die Fragmentierung des zweit-intensivsten Ions im dependent scan Modus wurde aus folgenden Gründen durchgeführt:

1. $[M+H]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Ionen einer Substanz weisen unterschiedliche Fragmentierungsmuster und Intensitäten auf. Im Fall des cyclischen Peptides F-36 (**13**) konnten die Peaks der beiden Addukt-Ionen mit deutlich unterschiedlichen Intensitäten detektiert werden (Abbildung 6). Das $[M+Na]^+$ -Ion wies hier eine höhere Intensität im MS-Spektrum auf als das $[M+H]^+$ -Ion. Die regelmäßige cyclische Anordnung der Carbonylsauerstoffatome begünstigt die Bildung des Natriumadduktes. Die anschließende Fragmentierung dieses Ions wiederum lieferte ein MS/MS-Spektrum mit geringeren Fragmenten (Abbildung 7).

* Das direkt nach ES-Ionisierung aufgenommene Massenspektrum.

13

Abbildung 6 ESI-Massenspektrum von F-36 (13) (mit unterschiedlichen Intensitäten des $[M+H]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Ions).

Abbildung 7 ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+$ - (A) und des $[M+Na]^+$ -Ions (B) von 13.

2. In manchen Fällen ist die Intensität des Dimer-Peaks höher als die des Monomer-Ions. Da ersterer meist kein interpretierbares Fragmentierungsmuster liefert, ist man zur Erstellung eines aussagekräftigen MS/MS-Spektrums hier auf das zweitintensivste Ion angewiesen. In Abbildung 8 ist das Massenspektrum von Carquinostatin A (**14**) als Beispiel angeführt. Im Falle dieser Verbindung weist das $[2M+Na]^+$ -Ion etwa doppelte Intensität im Vergleich mit dem $[M+H]^+$ -Ion auf.

Abbildung 8 ESI-Massenspektrum von Carquinostatin A (**14**) mit unterschiedlichen Intensitäten der $[M+H]^+$ -, $[M+Na]^+$ - und $[2M+Na]^+$ -Ionen.

3. Die Intensität der Peaks von Hintergrund- und überlappenden Ionen ist in einigen Fällen größer als die der untersuchten Ionen. Dies ist teilweise auf Verunreinigungen aus dem System zurückzuführen. Die Trennung konnte durch Zusatz von Ameisensäure in den Lösungsmitteln verbessert werden.* In Abbildung 9 ist das Massenspektrum eines Gemisches von Phthalsäureester und einer zu unter-

* Keine Verwendung von TFA, da diese Säure sehr gut ionisierbar ist und im negativen Modus zu einer hohen Zahl an Untergrundsignalen führt.

suchenden Substanz wiedergegeben. Phthalsäureester sind als Weichmacher in Schläuchen weit verbreitet und wurden aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit bei jeder Messung detektiert. $[M+H]^+$ - und $[2M+Na]^+$ -Ionen zeigen hohe Peak-Intensitäten bei einer Retentionszeit zwischen 23 und 24 Minuten. Besitzt die interessierende Substanz eine vergleichbare Retentionszeit, musste in zahlreichen Fällen von einer Überlagerung der Massenspektren ausgegangen werden. In Abbildung 9 ist zur Verdeutlichung ein MS-Spektrum dargestellt, in welchem das Ion der untersuchten Verbindung (m/z 815, $[M_2+Na]^+$) eine geringere Intensität als das Dimer-Ion von Phthalsäureester (m/z 803, $[2M_1+Na]^+$) aufweist.

Abbildung 9 ESI-Massenspektrum eines Gemisches von Phthalester (M_1) und einer zu untersuchenden Substanz (M_2).

Als problematisch erwies sich jedoch nach wie vor die Trennung homologer Verbindungen. Eine Überlappung der Quasimolekülionen mit unterschiedlichen Intensitäten war auch bei den schwer zu trennenden Actinomycinen häufig anzutreffen. Abbildung 10 zeigt das Massenspektrum eines Gemisches von zwei Actinomycinen, welche über eine Massendifferenz von zwei Einheiten verfügen. Actinomycin C_2 weist ein $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 1270 und ein $[M+Na]^+$ -Ion bei m/z 1292 auf, während Actinomycin X_{0B} ein $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 1272 sowie ein $[M+Na]^+$ -Ion bei m/z 1294 zeigt. Da die $[M+Na]^+$ -Ionen der Actinomycine ein spezifischeres und intensiveres Fragmentierungsmuster ergaben, wurde deren Fragmentierung bei der Erstellung der Datenbank bevorzugt. Eine Fragmentierung *beider* Substanzen im dependent scan Modus setzte die automatische Selektion

tion des zweitintensivsten Ions voraus. Diese war ebenso unumgänglich, wenn lediglich die Fragmentierung der Substanz mit der geringeren Quasimolekülionenintensität das Ziel war.

Abbildung 10 ESI-Massenspektrum eines Gemisches von Actinomycin C₂ (M₁) und Actinomycin X₀₈ (M₂).

4.1.5 UV/VIS-MS/MS-Bibliotheken

Zur Erstellung der Datenbank wurde ein Programm benötigt, welches die Eintragung der UV- und MS/MS-Spektren sowie weiterer Informationen über die untersuchten Verbindungen, wie Retentionszeit, Substanzname, Struktur und Summenformel, erlaubt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei für diesen Zweck geeignete Softwarelösungen verglichen.

NIST Algorithmus

In der Software Xcalibur werden MS/MS-Massenspektren automatisch in das von der Datenbank NIST benutzte Dateiformat umgewandelt. Letztere wurde ursprünglich für EI-MS-Spektren entwickelt, woraus sich einige Beschränkungen bei der Verwendung von ESI-MS/MS-Spektren ergeben. So ist es beispielsweise nicht möglich, zusätzliche Informationen wie Retentionszeiten oder die verwendete Messmethode einzubeziehen.

Sind andere spektroskopische Daten wie z. B. UV/VIS-Spektren zugänglich, können diese ebenfalls nicht ergänzend in die zu erstellende Datenbank auf der Basis von NIST einge-

tragen werden. An dieser Stelle wird ein zusätzliches Programm für die Erstellung der UV/VIS-Datenbank benötigt. Bisher ist ein derartiges Modul, welches die Kopplung mit der NIST-Datenbank ermöglicht, aber nicht kommerziell verfügbar. Das führt dazu, dass Totalionenstrom- und UV/VIS-Chromatogramm unabhängig voneinander in unterschiedlichen Datenbanken bzw. Programmen bearbeitet werden müssen. Dies erschwert die Durchführung einer Datenbanksuche und kann unter Umständen zu einer falschen Interpretation der Peaks führen, weswegen auf die Verwendung dieser Software verzichtet wurde.

Abbildung 11 Eine auf dem NIST-Algorithmus basierende Datenbank.

MS-Manager von ACD-Labs

Dieses Programm eröffnet verschiedene Bearbeitungsmöglichkeiten. So kann es nicht nur zur Erstellung einer Datenbank dienen, es ermöglicht ebenfalls eine Bearbeitung der erhaltenen Massenspektren. Der größte Vorteil dieses Programms liegt darin, dass mehrere spektroskopische Daten, wie MS/MS-, UV-, IR- sowie NMR-Daten, hier miteinander gekoppelt werden können. Ebenso besteht die Möglichkeit, die im positiven wie die im negativen Modus erhaltenen MS/MS-Spektren zu kombinieren. Ergänzend können zusätzliche Informationen wie Name und Struktur einer Verbindung, deren Summenfor-

mel, Retentionszeit sowie die verwendete Messmethode einbezogen werden. Die Eintragung der beiden letztgenannten Parameter erfolgt dabei automatisch. Eine Datenbanksuche mit diesem Programm erlaubt durch die vielseitige Verknüpfung verschiedener Optionen die gezielte Ermittlung der gewünschten Informationen. Bezieht man unterschiedliche spektroskopische Informationen in die Datenbank ein, können diese kombiniert und so ein effizienteres Auffinden der gesuchten Struktur ermöglicht werden. Das Importieren der MS-Spektren aus Xcalibur in den MS-Manager ist jedoch recht zeitaufwendig.

Abbildung 12 Eine im MS-Manager geöffnetes HPLC-UV-MS/MS-Datenbankfenster.

4.2 Methodenanalyse

Die erstellte HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank basiert auf in unserer Arbeitsgruppe isolierten bakteriellen Naturstoffen und beinhaltet bisher etwa 250 Verbindungen. Durch die Kopplung von HPLC, UV/VIS-DAD und Massenspektrometer sowie die induzierte Fragmentierung konnten die zu untersuchenden Substanzen getrennt und gleichzeitig deren Retentionszeiten, UV-Spektren, Massenzahlen sowie Fragmentierungsmuster ermittelt werden. Die in Abhängigkeit von den jeweiligen Moleküleigenschaften entstandenen $[M+H]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Ionen führten ebenso zu unterschiedlichen, spezifischen Fragment-

ierungsmustern. Sofern es die Peakintensitäten erlaubten, wurden beide MS/MS-Spektren in die Datenbank eingetragen.

Die Erstellung der Datenbank war mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, da zunächst mehrere Experimente durchgeführt werden mussten, um optimale Messparameter und -bedingungen für die zu untersuchenden Substanzen zu ermitteln. Anschließend wurden die einzelnen Verbindungen untersucht und die erhaltenen UV- und Fragmentierungsspektren sowie weitere erforderliche Daten in die Datenbank eingetragen. Der vergleichsweise hohe Aufwand ist jedoch insofern gerechtfertigt, als es sich hier um eine Datenbank mit sehr hohem Informationsgehalt handelt, welche die effiziente und zweifelsfreie Identifikation von Verbindungen gewährleistet.

Abbildung 13 Ein Vergleich des Base-Peak- (oben) und UV/VIS-Chromatogramms (unten) eines Rohextraktes.

Sowohl Rohextrakte als auch durch chromatographische Trennung erhaltene Fraktionen wurden unter Verwendung identischer Bedingungen gemessen. Die Kombination der erhaltenen Daten führte in den meisten Fällen zu einer raschen Identifizierung der einzelnen Substanzen mit Hilfe der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank. Darin gespeicherte Verbindungen wurden mit einer 100proz. Trefferausbeute wiedererkannt. Soll die Anzahl der in einer Probe enthaltenen Verbindungen abgeschätzt werden, muss darauf geachtet werden, dass nicht oder nur schwer ionisierbare Moleküle nicht unmittelbar im Base-Peak-Chromatogramm detektierbar sind. In derartigen Fällen ist jedoch die zusätzliche Verfügbarkeit des UV-Chromatogramms als ergänzende Informationsquelle häufig hilfreich.

(Abbildung 13). Umgekehrt können UV-inaktive Verbindungen vielfach im Ionenstromchromatogramm nachgewiesen werden. Liegt eine Substanz vor, welche nicht in der Datenbank enthalten ist, wurden Molekulargewicht und UV/VIS-Daten als Ausgangspunkt für eine weitere Suche in AntiBase³⁰ bzw. Chapman & Hall³¹ mit dem Ziel der Strukturzuordnung durchgeführt.

Kann eine Substanz nicht identifiziert werden, bestehen folgende Möglichkeiten:

- Es handelt sich um eine bislang unbekannte Verbindung.
- Die Substanz ist zwar bekannt, aber nicht in der Datenbank enthalten.
- Die Substanz kann mittels ESI nicht oder nur schwer ionisiert werden, so dass kein Massenspektrum zugänglich ist.
- Die Peak-Intensität des Dimers bzw. deren Isotope sind trotz der verwendeten Kollisionsenergie (ISCID) wesentlich höher als die des Monomers.
- Es erfolgt keine vollständige Trennung per HPLC, so dass mehrere überlappende Ionen mit unterschiedlichen Intensitäten im Massenspektrum zu erkennen sind.
- Die in der Probe enthaltene Substanzmenge ist zu gering, so dass die Intensität des Quasimoleküls im Vergleich mit dem Hintergrund nur sehr niedrig ist.

Abbildung 14 zeigt das Beispiel einer Strukturidentifizierung im Rohextrakt des Stammes *Alteromonas* sp. T268. Die von den einzelnen Substanzen ermittelten MS/MS-Spektren wurden zur Suche in der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank herangezogen, was zu den häufig von Bakterien produzierten Diketopiperazinen führte. Ein zusätzlicher Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren bestätigte die Zuordnung. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die vorhandenen Diastereomeren anhand des Fragmentierungsmusters nicht unterschieden werden können. Dies gelingt in vielen Fällen jedoch über einen Vergleich der Retentionszeiten.

Abbildung 14 Identifizierung der im Rohextrakt von Stamm T268 enthaltenen Substanzen mit Hilfe der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank.

5 Fragmentierungen ausgewählter Substanzen

Die moderne Massenspektrometrie hat sich im Bereich der Naturstoffchemie zu einem mächtigen Werkzeug entwickelt. Außer dem reinen Molekulargewicht liefert sie eine Vielzahl weiterer, wertvoller Informationen über eine Verbindung. Durch deren Kombination können bekannte Substanzen unter Nutzung von Datenbanken rasch identifiziert werden. Liegt eine noch unbekannte Verbindung vor, kann die Massenspektrometrie die Molekulargewichtsbestimmung sowie den Nachweis funktioneller Gruppen erbringen und in einigen Fällen eine komplette Strukturzuordnung ermöglichen. Letztere ist insbesondere dann möglich, wenn die Fragmentierungswege strukturanaloger Substanzen bereits im Vorfeld aufgeklärt werden konnten.

Die Sequenzanalyse von Proteinen stellt heute bereits eines der wichtigsten Anwendungsgebiete der modernen, schonenden MS-Ionisierungsverfahren in Kombination mit geeigneten MS/MS-Techniken dar. Bei der Aufklärung der Primärstruktur dieser Biopolymere handelt es sich um einen Kernbereich des als Proteomics bezeichneten Forschungsfeldes, welches die Analyse der gesamten in genomischer DNA codierten **Proteine** zum Ziel hat.³² Das große Interesse am Einsatz der MS-Analyse für die Peptidsequenzierung gründet sich auf der Hoffnung, durch deren Anwendung einige Nachteile des klassisch eingesetzten Edman-Abbaus³³ wie den großen Arbeits- und Zeitaufwand sowie den hohen Substanzbedarf überwinden zu können.

Abbildung 15 Schematische Darstellung der Fragmentierungswege eines linearen Peptides nach ROEPSTORFF.³⁴

Bei der MS/MS-Analyse von Peptiden kommt es zur Bildung unterschiedlicher Fragment-Ionen (Abbildung 15), welche zum großen Teil aus der Spaltung der amidischen Bindungen resultieren. Befindet sich die Ladung am N-terminalen Fragment, spricht man von Ionen der a-, b- bzw. c-Reihe, ist sie am C-terminalen Fragment lokalisiert, bezeichnet man dieses als x-, y- bzw. z-Ion.

Als besonders schwierig erwies sich die Aufklärung der Fragmentierungsmechanismen von Cyclopeptiden. Die hier beobachteten Fragmentierungsmuster sind durch konkurrierende Primärspaltungen verschiedener Peptidbindungen sehr komplex. Bei dieser Verbindungsklasse musste darüber hinaus auch das Problem Sequenz/Retrosequenz gelöst werden.

Das Fragmentierungsmuster eines Moleküls hängt von der verwendeten Ionisierungsmethode, der Art der Kollisionsaktivierung sowie vom eingesetzten Massenanalysator ab.³⁵ Im Vergleich zur EI-Massenspektrometrie sind die bei der ESI-MS/MS-Massenspektrometrie erhaltenen Fragmentierungswege bisher nur in wenigen Fällen untersucht worden.³⁶ Um deren Verständnis zu fördern, wurden einige der im Rahmen der Erstellung der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank gemessenen MS/MS-Spektren von ausgewählten Verbindungsklassen analysiert.

Die Anlagerung von Na^+ - bzw. H^+ -Ionen, welche zur Ionisierung der untersuchten Moleküle führt, erfolgt an freien Elektronenpaaren von Heteroatomen. Die geladenen Moleküle spalten nach Stoßaktivierung mit Edelgasatomen neutrale Fragmente ab. Es wird vermutet, dass die Fragmentierung in der Nähe des protonierten bzw. mit einem Na^+ -Ion assoziierten Atoms erfolgt. Die MS^n -Fragmentierung einer Verbindung mit einem Ion-Trap-Massenspektrometer kann dabei zu anderen Ionen führen als die MS/MS-Fragmentierung mit einem Triple-Quadrupol-Instrument. Bei ESI-Ion-Trap-Experimenten, welche auch zur Erstellung der Datenbank herangezogen wurden, kommt es ferner in manchen Fällen aufgrund von Protonwanderung zur Bildung protonierter Fragmente in der Ionenfalle.

Das zu beobachtende Fragmentierungsmuster ist auch von der Art des gebildeten Molekül-Addukts abhängig. Einige Beispiele hiervon sind in der Literatur beschrieben, wie verschiedene Digitoxin-Fragmente von $[\text{M}+\text{H}]^+$ - und $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ionen³⁷ sowie Unterschiede in den MS/MS-Spektren von $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - und $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Ionen bei Oligosacchariden.³⁸

5.1. Actinomycine

Bei den Actinomycinen handelt es sich um orangefarbene Sekundärmetaboliten von Streptomyceten. Ein Gemisch dieser Substanzklasse wurde 1940 von WAKSMAN als erstes aus Actinomyceten bekanntes Antibiotikum beschrieben.³⁹ Den ersten Strukturbeweis eines Actinomycins erbrachten schließlich BROCKMANN und LACKNER 1960 mittels einer Total-

synthese von Actinomycin C₃.⁴⁰ Bis heute sind über 40 Actinomycine aus natürlichen Quellen isoliert worden.

Actinomycine interkalieren reversibel in doppelsträngige DNA, worauf ihre effiziente antitumorale Wirkung beruht.⁴¹ Dieser nicht selektive Mechanismus geht jedoch mit einer ausgeprägten Toxizität einher und führt so zu einer stark limitierten klinischen Anwendbarkeit dieser Substanzklasse. Um diesem Problem entgegenzutreten wurden zahlreiche Ansätze verfolgt, welche die Herstellung von Analoga mit verbessertem Wirkprofil zum Ziel hatten.

Chemisch bestehen Actinomycine aus einer Chromophoreinheit (3-Amino-1,8-dimethyl-2-phenoxazone-4,5-dicarbonsäure), welche zwei Pentapeptidreste trägt, die ihrerseits amidisch an die beiden Carboxylgruppen gebunden sind. Jeder dieser Reste bildet einen Cyclodepsipeptidring. Bei den Aminosäuren A und V, die die Lactonringe mit dem Phenoxazinon-chromophor verbinden, handelt es sich fast ausschließlich um L-Threoninreste, deren β -Hydroxylgruppe mit der Carboxylgruppe der fünften Aminosäure in derselben Pentapeptidkette lactonisiert ist.

Bei der Strukturaufklärung von Actinomycinen spielte die Massenspektrometrie bisher eine eher untergeordnete Rolle. So wurde von einigen auf electron impact (EI),⁴² field desorption (FID),⁴³ plasma desorption,⁴⁴ chemical ionization (CI)⁴⁵ und fast atom bombardment (FAB)^{46,47} beruhenden MS-Analysen berichtet. THOMAS und Mitarbeiter publizierten erstmals die Aufklärung der durch ES-Ionisierung (ESI) in Verbindung mit einem Tripel-Quadrupol-Detektor erhaltenen Actinomycin-Fragmente.⁴⁸ Diese Experimente beruhten vor allem auf der Auswertung der von den $[M+H]^+$ -Ionen gebildeten Fragmente. Die Fragmentierungswege einiger anderer Cyclodepsipeptide wurden hingegen bereits eingehend untersucht.^{49,50} Hier zeigte sich, dass primär Esterspaltungen bei dieser Verbindungsklasse bevorzugt ablaufen.^{51,52}

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, bereits aufgeklärte Fragmentierungswege bekannter Actinomycine zur Strukturaufklärung von neuen Vertretern dieser Substanzklasse heranzuziehen. Für die Untersuchung wurden verschiedene Actinomycine ausgewählt, die über identische wie auch unterschiedliche Pentapeptidreste verfügten. Als strukturell interessante Variationen erwiesen sich Actinomycine mit chlor- bzw. hydroxysubstituiertem Threonin sowie solche, welche über eine Esterbindung des Threoninrestes mit dem Chromophor verknüpft sind. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die untersuchten Actinomy-

cine, deren Fragmentierungswege ausgehend vom $[M+Na]^+$ -Ion in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt wurden.

Tabelle 2 Systematische Darstellung der untersuchten Actinomycine.

Actino- mycin	α-Kette					β-Kette				
	A	B	C	D	E	V	W	X	Y	Z
Actinomycine mit identischen cyclischen Peptidketten										
C₃	Thr	D-alle	Pro	Sar	MeVal	Thr	D-alle	Pro	Sar	MeVal
D	Thr	D-Val	Pro	Sar	MeVal	Thr	D-Val	Pro	Sar	MeVal
F₃	Thr	D-alle	Sar	Sar	MeVal	Thr	D-alle	Sar	Sar	MeVal
Actinomycine mit unterschiedlichen cyclischen Peptidketten										
C₂	Thr	D-Val	Pro	Sar	MeVal	Thr	D-alle	Pro	Sar	MeVal
X₂	Thr	D-Val	Pro	Sar	MeVal	Thr	D-Val	OPro	Sar	MeVal
X_{0β}	Thr	D-Val	Pro	Sar	MeVal	Thr	D-Val	Hyp	Sar	MeVal
Actinomycine mit unterschiedlichen cyclischen Peptidketten und substituiertem Threonylrest										
Z₁	Thr	D-Val	HMPPro	Sar	MeVal	HThr	D-Val	MOPro	Sar	MeAla
Z₇	Thr	D-Val	HMPPro	Sar	MeVal	ClThr	D-Val	Hyp	Sar	MeAla
G₂	Thr	D-Val	HMPPro	Sar	MeVal	ClThr	D-Val	Pro	Sar	MeAla
G₃	Thr	D-Val	HMPPro	Sar	MeVal	HThr	D-Val	Pro	Sar	MeAla
Actinomycine mit unterschiedlichen cyclischen Peptidketten und außergewöhnlicher Verknüpfung des Threonylrestes										
G_x	Thr	D-Val	HMPPro	Sar	MeVal	HThr[*]	D-Val	Pro	Sar	MeAla

Unterschiede zu Actinomycin D sind **fett** gedruckt (MeVal = *N*-Methylvalin, *alle* = *allo*-Isoleucin, MeAla = *N*-Methylalanin, HMPro = *trans*-3-Hydroxy-*cis*-5-methylprolin, OPro = 3-Oxoprolin, MOPro = *cis*-5-Methyl-3-oxoprolin, Hyp = *trans*-4-Hydroxyprolin, HThr = 4-Hydroxy-threonin, ClThr = 4-Chlorthreonin, *Verknüpfung von Threonin zwischen dem Chromophor und Peptidkette ist umgekehrt).

Abbildung 16 zeigt das MS/MS-Spektrum des $[M+Na]^+$ -Ions von Actinomycin D (m/z 1277). Eine schematische Darstellung der zugrundeliegenden Fragmentierungswege ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

Abbildung 16 MS/MS-Spektrum des $[M+Na]^+$ -Ions von Actinomycin D.

Gemäß bereits bekannten Mechanismen findet hier zunächst vermutlich eine Öffnung der beiden Peptidringe per Esterspaltung statt. Im nächsten Schritt werden nacheinander die in Position 5 befindlichen Aminosäuren abgespalten. Es folgt die schrittweise Freisetzung der Aminosäuren einer Kette, wobei gelegentlich Kohlenmonoxid- sowie Wassermoleküle eliminiert werden. Da α - und β -Kette dieser Substanz identisch sind, sind auch die gebildeten Fragmente gleich, was einerseits das MS/MS-Spektrum vereinfacht, eine Unterscheidung der beiden Cyclopeptidylreste jedoch verhindert.

Abbildung 17 Schematische Darstellung der Fragmentierungswege von Actinomycin D.

Tabelle 3 Beobachtete Fragmentbildung für $[M+Na]^+$ -Ionen von Actinomycinen mit identischen cyclischen Peptidketten.

Fragmention	Fragmentmassen von Actinomycin [m/z]		
	C ₃	D	F ₃
$[M+Na]^+$	1305	1277	1253
$[M+Na-CO]^+$	1277	1249	1225
$[M+Na-E]^+$	1192	1164	1140
$[M+Na-E-H_2O]^+$	1174	1146	1122
$[M+Na-E-CO]^+$	-	1136	-
$[M+Na-E-Z]^+$	1079	1051	1027
$[M+Na-E-Z-H_2O]^+$	1061	1033	1009
$[M+Na-E-D-H_2O]^+$	-	-	1051
$[M+Na-E-D-C-H_2O]^+$	1006	978	980
$[M+Na-E-D-C-H_2O-CO]^+$	978	950	-
$[M+Na-E-D-C-B-H_2O]^+$	893	879	867
$[M+Na-E-D-C-B-A-H_2O]^+$	-	-	784
$[M+Na-E-Z-D-C-H_2O]^+$	893	865	867
$[M+Na-E-Z-D-C-H_2O-CO]^+$	865	837	-
$[M+Na-E-Z-D-C-B-H_2O]^+$	780	766	754

Eine Variation der dritten Aminosäure in einer der Peptidketten, wie im Fall von Actinomycin X₀₈, führt nach einer bestimmten Anzahl von Fragmentierungsschritten zur Bildung unterschiedlicher Bruchstücke für beide Cyclen. Dies setzt jedoch eine Fragmentierung mindestens bis zur dritten Position voraus. Abbildung 18 zeigt eine schematische Darstellung der Fragmentierungswege des $[M+Na]^+$ -Ions (m/z 1293) von Actinomycin X₀₈. Eine Übersicht über die Fragmentionen einiger unsymmetrischer Actinomycine gibt Tabelle 4.

Abbildung 18 Schematische Darstellung der Fragmentierungswege von Actinomycin X₀₈.

Tabelle 4 Beobachtete Fragmentbildung der $[M+Na]^+$ -Ionen von Actinomycinen mit unterschiedlichen cyclischen Peptidketten.

Fragmentation	Fragmentmassen von Actinomycin [m/z]		
	C ₂	X ₂	X _{0B}
$[M+Na]^+$	1291	1291	1293
$[M+Na-CO]^+$	1263	1263	1265
$[M+Na-E]^+$	1178	1178	1180
$[M+Na-E-H_2O]^+$	1160	1160	1162
$[M+Na-E-D]^+$	-	1107	1109
$[M+Na-E-D-H_2O]^+$	1089	-	1091
$[M+Na-E-Z]^+$	1065	1065	1067
$[M+Na-E-Z-H_2O]^+$	1047	-	1049
$[M+Na-E-D-C-H_2O]^+$	992	992	994
$[M+Na-Z-Y-X-H_2O]^+$	992	978	978
$[M+Na-E-D-C-H_2O-CO]^+$	964	964	966
$[M+Na-E-D-C-B-H_2O]^+$	893	893	895
$[M+Na-Z-Y-X-W-H_2O]^+$	879	879	879
$[M+Na-Z-Y-X-W-H_2O-CO]^+$	851	851	-

Bei den Actinomycinen der Z- und G-Reihe, welche unterschiedliche Aminosäurereste in Position 2 aufweisen, sind bereits bei den ersten Fragmentierungsschritten unterschiedliche Fragmentmassen für beide Peptidketten erkennbar. Trotz der Möglichkeit einer Sequenzzuordnung der einzelnen Aminosäure-Ketten können diese mittels der eingesetzten Methode nicht eindeutig einer Position des Chromophorgerüsts zugeteilt werden.

Liegt ein Threoninrest chloresubstituiert vor, ergibt sich das Fragment höchster Intensität aus einer Abspaltung von Chlorwasserstoff. Ob dieses Fragment vor oder nach Öffnung der Peptidringe gebildet wird, ist nicht bekannt. Befindet sich hingegen ein hydroxysubstituierter Threoninrest im Molekül, resultieren die Fragmentionen höchster Intensität aus einer Abspaltung der Aminosäuren in Position 5. Nach sukzessiver Spaltung aller Amidbindungen der Peptidketten kommt es zur Bildung eines Acetaldehyd-Fragments der Masse 44. Dieses entsteht vermutlich über eine α -Spaltung des ursprünglichen Threoninrests.

Abbildung 19 Schematische Darstellung der Fragmentierungswege von Actinomycin Z₇.

Tabelle 5 Beobachtete Fragmentierung von $[M+Na]^+$ -Ionen unsymmetrischer Actinomycine mit unterschiedlichen Aminosäuren in der 5. Position sowie Hydroxy- bzw. Chloridsubstitution (Q) an einem der Threoninreste.

Fragmention	Fragmentmassen von Actinomycin [m/z]			
	Z_1	Z_7	G_2	G_3
$[M+Na]^+$	1323	1329	1313	1295
$[M+Na-Q]^+$	1305	1293	1277	1277
$[M+Na-CO]^+$	1295	-	-	1267
$[M+Na-Q-CO]^+$	-	1265	1249	-
$[M+Na-E]^+$	1238	1216	1200	1182
$[M+Na-Z]^+$	1210	1244	1228	1210
$[M+Na-E-Q]^+$	1192	1180	1164	1164
$[M+Na-Z-Q]^+$	1220	1208	1192	1192
$[M+Na-E-Z]^+$	1125	-	-	1097
$[M+Na-E-Z-Q]^+$	1107	1095	1079	1079
$[M+Na-E-D]^+$	-	-	-	1111
$[M+Na-E-Z-D]^+$	1054	-	-	-
$[M+Na-E-D-C-Q]^+$	994	-	-	966
$[M+Na-Z-Y-X-Q]^+$	1024	-	-	-
$[M+Na-E-D-C-Q-CO]^+$	966	-	-	938
$[M+Na-E-D-C-B-Q]^+$	895	-	-	-
$[M+Na-Z-Y-X-W-Q]^+$	925	-	-	-
$[M+Na-Z-Y-X-W-Q-CH_3CHO]^+$	881	881	881	881
$[M+Na-E-Z-Y-X-W-Q-CH_3CHO]^+$	768	768	768	768
$[M+Na-E-D-Z-Y-X-W-Q-CH_3CHO]^+$	697	697	697	697

Tabelle 5 zeigt eine Liste der detektierten Fragmentionen einiger Actinomycine der Reihen Z und G. Hierbei ist auffällig, dass Actinomycine, welche einen chloresubstituierten Threoninrest beinhalten (Actinomycin Z_7 und G_2), eine geringere Zahl an Fragmenten bildet als solche, welche über eine hydroxysubstituierte Threonin-Gruppierung verfügen (Actinomycin Z_1 und G_3). Je mehr Fragmente eine Substanz nach Beschuss mit einer bestimmten Kollisionsenergie liefert, desto mehr Informationen können aus den entsprechenden Spektren erhalten werden. In Fällen von Actinomycinen mit hydroxylierten Threoninresten konnte die schrittweise Zuordnung der einzelnen Aminosäuren erfolgen, während es bei

Anwesenheit chlorierter Threoningruppen zu einer unspezifischen Abspaltung mehrerer Aminosäuren gleichzeitig kam.

Kürzlich konnten die neuartigen Actinomycine Z₇, G₂ und G₃ aus *Streptomyces* sp. CS210 isoliert werden.* Zusätzlich wurde aus diesem Stamm ein Actinomycin mit ungewöhnlicher Verknüpfung am Threoninrest gefunden. Bei der Strukturaufklärung ergab sich, dass hier eine cyclische Peptidkette über eine Esterbindung mit dem Chromophorgerüst verknüpft ist. Dies hat deutliche Konsequenzen für die mit ESI-MS/MS erhaltenen Fragmente. Es zeigte sich, dass die Aminosäurereste der betreffenden Peptidkette nicht nacheinander abgespalten werden, sondern es vielmehr zur Freisetzung der gesamten Kette kommt. Die Fragmentierung der zweiten Peptidkette verläuft nach dem üblichen Muster, was deren Sequenzzuordnung erlaubt. Abbildung 20 zeigt eine schematische Darstellung der Fragmentierungswege von Actinomycin G₆.

Die Interpretation der Fragmentierung des Natriumadduktes bereits bekannter Actinomycine lieferte wertvolle Informationen, die in den meisten Fällen zu einer eindeutigen Identifizierung der vorliegenden Verbindung ausreichten. Handelt es sich um noch unbekannte Actinomycine, ermöglicht die beschriebene, zeitsparende Methode vielfach die Zuordnung der kompletten Aminosäuresequenz. Als schwierig erwiesen sich jedoch die Bestimmung des Substitutionsortes der Peptidketten am Chromophorgerüst sowie die Unterscheidung von Aminosäureisomeren. Hier musste auf die Hilfe von NMR-spektroskopischen Daten zurückgegriffen werden.

* J. Bitzer und Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die Bereitstellung der Actinomycine.

Abbildung 20 Schematische Darstellung der Fragmentierungswege von Actinomycin G₆.

5.2. Diketopiperazine

Eine aus Bakterienkulturen häufig isolierte Verbindungsklasse ist die der cyclischen Dipeptide, welche unter dem Name Diketopiperazine bekannt sind. Diese Substanzen beinhalten häufig nichtribosomal synthetisierte Aminosäuren, was die Bildung isomerer Strukturen ermöglicht. Die meisten in den Rohextrakten gefundenen Diketopiperazine weisen eine Prolylgruppe auf, wobei am häufigsten die Verbindungen Cyclo(prolylvalyl) (**15**), Cyclo(leucylprolyl) (**16**), Cyclo(phenylalanylprolyl) (**17**) und Cyclo(prolyltyrosyl) (**18**) gefunden werden.

15 **16** **17** **18**

Aufgrund der guten Ionisierbarkeit von Peptiden und der vergleichsweise hohen gebildeten Substanzmengen waren die entsprechenden Peaks im Totalionenstrom-Chromatogramm der Rohextrakte sehr auffällig. Anhand des Fragmentierungsmusters und der Retentionszeiten konnten die gefundenen Diketopiperazine durch eine Suche in der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank schnell identifiziert werden. Die Methode stößt jedoch an ihre Grenze, wenn es um die Unterscheidung von Isomeren geht, welche verschiedene Konfiguration (cis- und trans-Form) bzw. unterschiedliche Konstitution (z. B. Leucin und Isoleucin) aufweisen. Aufgrund der identischen Fragmentierungsmuster sowie der sehr ähnlichen Retentionszeiten können solche Verbindungen per HPLC-MS/MS nicht eindeutig identifiziert werden.

Um die Fragmentierungswege von mittels ESI ionisierten Peptiden besser verstehen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die in den MS/MS-Spektren auftretenden Diketopiperazin-Fragmente aufzuklären.

Abbildung 21 Vorschlag eines Fragmentierungsschemas für Cyclo(propylvalyl) (15).

In Abbildung 21 ist das Fragmentierungsschema eines Diketopiperazins dargestellt. Die Zusammensetzung aller gefundenen Fragmente wurde per Hochauflösung verifiziert. Ammoniak- und Kohlenstoffmonoxidabspaltung konnten hier häufig beobachtet werden. Zusätzlich konnte die Bildung von Immoniumionen der beiden Aminosäuren nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer Protonierung des Moleküls an den beiden Aminosäureresten gleich ist. Der genaue Fragmentierungsmechanismus dieser Substanzklasse ist bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Tabelle 6 zeigt eine Liste der Fragmentationen, die von den vier am häufigsten vorkommenden Diketopiperazinen gebildet werden.

Tabelle 6 Fragmente von häufig isolierten Diketopiperazinen. (X: Aminosäure außer Prolin)

Fragmention	Cyclo(Pro-Val) (15)	Cyclo(Leu-Pro) (16)	Cyclo(Phenyl-ala-Pro) (17)	Cyclo(Pro-Tyr) (18)
$[M+H]^+$	197	211	245	261
$[M+H-NH_3]^+$	180	194	228	244
$[M+H-CO]^+$	169	183	217	233
$[M+H-2CO]^+$	141	155	189	205
$[M+H-CO-NH_3]^+$	152	166	200	216
$[M+H-2CO-NH_3]^+$	124	138	172	188
$[M+H-CO-X]^+$	70	70	70	-
$[M+H-CO-Pro]^+$	72	86	120	136
$[M+H-NH_3-Pro]^+$	-	-	131	147

6 Untersuchung ausgewählter Stämme aus arktischen und antarktischen Habitaten

6.1 *Pseudoalteromonas* sp. T268

Der Stamm T268 wurde aus dem Darminhalt der antarktischen Krillart *Euphausia superba* isoliert. Im Dünnschichtchromatogramm des nach Kultivierung erhaltenen Rohextraktes fielen zwei Zonen auf, die weder UV-löschend noch fluoreszierend waren. Nach Besprühen mit Anisaldehyd und Erwärmung zeigte eine der Zonen eine blaue Anfärbung, welche auf das Vorliegen von Fettsäuren hindeutete. Die andere Zone färbte sich weder mit Anisaldehyd noch mit Ehrlichs Reagenz an. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt des Stammes keine auffälligen Aktivitäten.

6.1.1 Bestimmung der Taxonomie

T268 wächst in Form beiger, glänzender Kolonien. Die 16S rRNA-Sequenz zeigte 99 % Homologie zu *Pseudoalteromonas* sp. Der Stamm ist Gram-negativ und psychrotolerant, d.h. er wächst sowohl bei Temperaturen um 1 °C als auch oberhalb von 30 °C, wobei das Wachstum stark vom Gehalt an Seewassersalzen im Nährmedium abhängt. T268 ist Oxidase- und Katalase-positiv, vermag Nitrat nicht zu reduzieren und zeigt keine Bildung von Schwefelwasserstoff. Gelatine, Chitin und Casein können abgebaut werden, Cellulose und Stärke hingegen nicht. Der Stamm zeigt weder β -Galactosidase- noch Arginin-, Lysin- sowie Ornithin-Decarboxylaseaktivität. Im SFN-Biolog Verwertungstest werden die fettähnlichen Substanzen Tween 40 und Tween 80 metabolisiert.

6.1.2 Isatin

Die orange-farbene Verbindung **19** fiel im Dünnschichtchromatogramm (R_f = 0.35, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) durch die intensive Eigenfarbe sowie UV-Löschung bei 254 nm auf. Die Substanz ging beim Besprühen mit Anisaldehyd in der Wärme einen Farbumschlag von Orange nach Hellgelb ein.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte nur Resonanzen im Aromatenbereich. Die Signale höherer Ordnung bei δ = 7.6, 7.57, 7.14 und 6.90 konnten einem 1,2-disubstituierten Benzolring zugeordnet werden. Weiterhin war ein breites Signal bei δ = 7.81 sichtbar, das auf das

Vorliegen einer OH- oder NH-Gruppe hindeutete. Eine auf dem EI-Fragmentierungsmuster basierende Datenbanksuche mit NIST zeigte an, dass Isatin (**19**) isoliert wurde. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit denen von authentischem Isatin (**19**) ergab vollständige Übereinstimmung und bestätigte somit die Zuordnung.

19

Isatin (**19**) zeigt antifungische Aktivität gegen den Pilz *Lagenidium callinectes*, der Infektionen bei extern ausgebrüteten Embryonen der Shrimpsart *Palaemon macrodactylus* hervorruft. In einer von FENICAL und Mitarbeitern aufgestellten Symbiose-Theorie⁵³ geht man davon aus, dass eine Isatin (**19**) produzierende Alteromonaden-Art, die sich auf der Oberfläche von gesunden Embryonen befindet, essentiell für deren Überleben ist.

6.1.3 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol

Der farblose Feststoff **20** war im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.23$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) durch UV-Löschung bei 254 nm auffällig und färbte sich beim Besprühen mit Anisaldehyd violett und mit Ehrlichs Reagenz grün an.

Abbildung 22 ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, [D₆]DMSO) von **20**.

Verbindung **20** zeigte im EI-Massenspektrum das Ion höchster Masse bei $m/z = 205$. Dem ^1H -NMR-Spektrum waren im Aromatenbereich vier Signale bei $\delta = 7.23, 7.16, 6.90, 6.77$ zu entnehmen, die einem *ortho*-disubstituierten Benzolring zuzuordnen waren. Weiterhin waren zwei breite Signale bei $\delta = 10.19$ und 5.96 erkennbar, die auf OH- bzw. NH-Gruppen im Molekül hindeuteten, sowie eine Methylgruppe bei $\delta = 2.00$. Zusätzlich waren Resonanzen bei $\delta = 3.25$ und 2.98 sichtbar, welche über eine geminale Kopplung wechselwirkten und das Vorliegen einer diastereotopen Methylengruppe anzeigten.

Abbildung 23 ^{13}C -NMR-Spektrum (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (**20**).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte ein Signal bei $\delta = 205.0$, das für eine Ketogruppe sprach, ein Signal für eine Carbonylgruppe von Estern bzw. Amiden bei $\delta = 178.0$ und sechs Signale im Aromaten- bzw. Olefinbereich bei $\delta = 142.4 - 109.3$. Eine Datenbanksuche mit diesen Informationen in AntiBase³⁰ führte zu 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (**20**). Die Verbindung wurde zur Strukturabsicherung ausgehend von Isatin und Aceton synthetisiert.* Das erhaltene Produkt stimmte in allen NMR-spektroskopischen Daten mit dem isolierten Naturstoff **20** überein. Auffällig war der vergleichsweise niedrige Drehwert der isolierten Verbindung, welcher bei $+1.9^\circ$ ($c = 1 \text{ mg/ml}$, MeOH) lag. Nach Trennung mittels einer chiralen HPLC-Säule stellte sich heraus, dass es sich um ein 1:1-Gemisch aus beiden enantiomeren Formen handelte. Neben einer enzymkatalysierten Biosynthese kann aufgrund des Vorliegens als Racemat die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass **20** ein

* Für die Synthese von 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol danke ich Marc Corbella.

Artefakt ist, welches während der Aufarbeitung über eine Aldol-Reaktion aus Isatin und Aceton entsteht.

20

3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (**20**) ist bereits seit längerem als Syntheseprodukt bekannt. Von der Arbeitsgruppe FENICAL wurde es erstmals als Naturstoff isoliert.

6.1.4 3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol

Der im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.25$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) bei 254 nm UV-löschende weiße Feststoff **21** färbte sich nach Besprühen mit Anisaldehyd grün und mit Ehrlichs Reagenz rot an.

Im EI-Massenspektrum wies **21** das Ion höchster Masse bei $m/z = 219$ auf. Im Vergleich mit dem ^1H -NMR-Spektrum von **20** zeigte **21** dieselben Signale im Aromatenbereich sowie für die diastereotope Methylengruppe. Es fehlte jedoch die Resonanz der Methylgruppe bei $\delta = 2.21$. Stattdessen traten zwei zusätzliche Signale für eine Methylengruppe bei $\delta = 2.44$ und eine Methylgruppe bei $\delta = 1.00$ auf, die eine Ethyleinheit bilden. Verbindung **21** konnte somit als 3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol (**21**) identifiziert werden. Diese Substanz ist bis jetzt weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt. Der Drehwert von **21** lag bei $+10.3^\circ$, die Trennung mittels einer chiralen HPLC-Säule lieferte die beiden Enantiomere im Verhältnis 17:20. Da ein Isomeres hier im Überschuss vorliegt, kann der Schluss gezogen werden, dass es sich bei beiden Enantiomeren um Naturstoffe handelt.

21

22

Der zu Verbindung **20** bzw. **21** ähnliche Naturstoff **22** wurde im Arbeitskreis ZEECK aus *Halomonas* sp. RK377 isoliert.⁵⁴ Dieser 3-(3-Hydroxy-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-yl)-2-oxopropionsäure (**22**) produzierende Stamm wurde aus einer in Norddeich-Mole gesammelten Wasserprobe isoliert. Bei den Convolutamydinen A (**23**),⁵⁵ B (**24**), C (**25**) und D (**26**) handelt es sich um eine Reihe bromierter Hydroxyoxindole,⁵⁶ welche von H. P. ZHANG *et al.* aus dem marinen Bryozoen *Amathia convoluta* isoliert wurden. Sie zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber der Differenzierung von menschlichen Promyelozytenleukämie-Zellen der HL-60-Linie.⁵⁷

23: R = CH₂COCH₃

24: R = CH₂CH₂Cl

25: R = CH₃

26: R = CHCH₂

6.1.5 Ubichinon Q8

Die sich mit Anisaldehyd in der Wärme violett anfärbende Substanz **27** fiel als gelbes Öl an, das im Dünnschichtchromatogramm eine bei 254 nm UV-Licht löschende Zone ($R_f = 0.93$, CH₂Cl₂/MeOH 95:5) zeigte.

Abbildung 24 ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl₃) von Ubichinon Q8 (**27**).

Im ^1H -NMR-Spektrum waren acht Methingruppen ($\delta = 5.09 - 4.91$), zwei Methoxygruppen ($\delta = 3.97, 3.96$), fünfzehn Methylengruppen ($\delta = 3.16, 2.05 - 1.94$) sowie zehn Methylgruppen ($\delta = 1.99$ (3H), 1.72 (3H), 1.66 (3H), 1.56 (21H)) zu erkennen. Im Aromatenbereich hingegen wurde kein Signal beobachtet. Das ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 749$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit diesen Informationen lieferte Ubichinon Q8 (**27**) als mögliche Struktur, deren Vorliegen durch NMR-Datenvergleich mit in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Spektren bestätigt wurde.

6.1.6 Ubichinon KQ5

Die ölige Substanz **28** zeigte im Dünnschichtchromatogramm eine gelbe Zone, die UV-Licht der Wellenlänge 254 nm löschte und sich mit Anisaldehyd in der Wärme blau anfärbte. Die Polarität von **28** ($R_f = 0.65$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) war deutlich höher als diejenige von Verbindung **27**.

Abbildung 25 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **28**. Im Vergleich mit **27** zusätzlich vorhandene Signale sind mit einem Pfeil markiert.

Abbildung 26 ^{13}C -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von **28**.

Im ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 547$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, aus dem per Hochauflösung die Summenformel $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_5$ abgeleitet werden konnte. Im Vergleich mit dem ^1H -NMR-Spektrum von **27** wies Verbindung **28** zusätzliche Signale für zwei Methylen-gruppen bei $\delta = 2.35$ und 1.64 sowie eine Methylgruppe bei $\delta = 2.10$ auf. Es fehlte jedoch das Singulett für die Methylgruppe bei $\delta = 1.66$. Im ^{13}C -NMR-Spektrum war das Signal einer zusätzlichen Ketogruppe bei $\delta = 209.2$ auffällig. Das H,H-COSY -Spektrum zeigte die Kopplung der Methylenprotonen untereinander sowie mit einem Signal für eine weitere Methylen-Gruppe bei $\delta \sim 1.9$ an, welches mit den Resonanzen der Isopren-Methylen-gruppen überlagerte. Somit konnte das in Abbildung 39 gezeigte Strukturelement abgeleitet werden. Die im HMBC-Experiment beobachteten Korrelationen erlaubten die Verknüpfung der gefundenen Fragmente.

Abbildung 27 H,H-COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **28**.

Abbildung 28 Für die Strukturzuordnung entscheidende H,H-COSY- und HMBC-Korrelationen von **28**.

Abbildung 29 HMBC-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **28**.

Die weitere Auswertung der NMR-Daten führte zu dem Ergebnis, dass es sich um das Ubichinonderivat **28** handeln musste, in dem formal eine der terminalen Methylgruppen gegen eine Sauerstofffunktion ersetzt worden war. Damit wurde **28** als Ubichinon KQ5 identifiziert, wobei es sich um einen neuen Typ von Prenylchinonen handelt, der bislang weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt beschrieben worden ist. Gewisse Ähnlichkeiten zeigen lediglich die Trisporine und Trisporsäuren aus dem Pilz *Blakeslea trispora*, wie etwa Trisporin B (**29**).⁵⁸

29

Ob **28** tatsächlich durch Demethylierung und Oxidation eines Pentaprenyl-Restes nach einem normalen Ubichinon-Biosyntheseverlauf⁵⁹ entsteht oder vielmehr durch Addition von Geranyl-geranylaceton an ein 2,3-Dimethoxy-5,6-dimethylchinon gebildet wird (siehe Abbildung 30), muss anhand von Fütterungsexperimenten mit markierten Vorläufermolekülen geprüft werden. Diese konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.

Abbildung 30 Biosynthesevorschläge von Verbindung **28**.

6.1.7 Ubichinon KQ2

Die Substanz **30** fiel auf dem Dünnschichtchromatogramm durch ihre gelbe Farbe und UV-Löschung sowie eine grüne Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure auf. Im Vergleich mit **27** und **29** zeigte sie eine höhere Polarität ($R_f = 0.56$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

Abbildung 31 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) von **30**.

Im ESI-Massenspektrum zeigte **30** ein Ion bei $m/z = 343$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Aus dem ^1H -NMR-Spektrum sind Resonanzen für eine Methingruppe bei $\delta = 4.91$, zwei Methoxygruppen bei $\delta = 3.98$, 3.96 , vier Methylengruppen bei $\delta = 3.16$, 2.33 , 1.93 , 1.64 sowie drei Methylgruppen bei $\delta = 2.09$, 1.99 , 1.70 zu erkennen. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte die Existenz von 28 Kohlenstoffatomen an, wobei anhand der typischen chemischen Verschiebungen eine Ketogruppe bei $\delta = 208.9$ sowie zwei einem Chinonsystem zuzuordnende Carbonylsignale bei $\delta = 184.7$, 183.9 zu sehen waren. Im Vergleich mit den NMR-Daten von **29** fehlten die Signale für die Polyisopren-Seitenkette. Mit Hilfe von ^1H - ^1H -COSY- und HMBC-Experimenten konnten die Strukturelemente abgeleitet und die gefundenen Fragmente verknüpft werden. Diese Verbindung war bereits von der Arbeitsgruppe FENICAL aus dem Cyanobakterium *Microcoleus lyngbyaceus* isoliert und identifiziert worden.⁶⁰

Von *p*-Chinon abgeleitete Strukturen mit Isopren-Seitenkette, deren Länge stark von der produzierenden Spezies abhängt, spielen aufgrund ihrer Redoxaktivität eine wichtige Rolle im pflanzlichen und tierischen Metabolismus. Sie eignen sich folglich zur taxonomischen Charakterisierung unterschiedlicher Organismen.⁶¹ Im Stoffwechsel von Menschen und Tabakpflanzen findet man Chinone mit zehn Isopren-Einheiten, während die von Nagetieren, *E. coli* und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) produzierten aus sechs, acht oder neun Einheiten aufgebaut sind. Die Prenylchinone teilt man in zwei Gruppen ein, Ubichinone (Coenzym Q) und Menachinone (Vitamin K₂) ein. Bei den meisten Gram-positiven sowie bei anaerob lebenden Gram-negativen Bakterien findet man ausschließlich Menachinone, während die meisten aeroben Gram-negativen Bakterien nur Ubichinone aufbauen. Hin und wieder findet man bei beiden Vertretern partiell gesättigte Polyisoprenyl-Seitenketten sowie andere Chinon-Derivate wie Chlorobiumchinone, α -Tocopherolchinone, Rhodochinone, Epoxyubichinone und schwefelhaltige Caldariellachinone.⁶¹

Ubichinon (CoQ) wurde 1961 gleichzeitig von MORTON⁶² und CRANE⁶³ gefunden. Eine wichtige Eigenschaft von Ubichinonen ist ihre Hydrophobizität, welche Mobilität innerhalb der Zellmembran gewährleistet und für eine freie Wanderung zwischen den zu reduzierenden bzw. oxidierenden Spezies ermöglicht. Ubichinon spielt eine wichtige Rolle als Wasserstoffüberträger zwischen NADH und dem Enzym Succinat-Dehydrogenase sowie dem Cytochrom-System. Die Reduktion von CoQ beinhaltet eine Übertragung von zwei Elektronen sowie die Addition von zwei Protonen und führt zur Bildung von Ubichinol. Im umgekehrten Oxidations-Prozess erfolgt die Bildung von Ubichinon unter Freisetzung von zwei Elektronen bzw. Protonen.⁶⁴

6.1.8 β -Carbolin-Derivate

Norharman

Der weiße Feststoff **31a** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.37$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch starke hellblaue Fluoreszenz bei 366 nm auf. Die Verbindung war weder mit Anisaldehyd/Schwefelsäure noch mit Ehrlichs Reagenz anfärbbar.

Im ¹H-NMR-Spektrum waren ausschließlich Resonanzen im Aromatenbereich detektierbar. Die Signale bei $\delta = 8.05$, 7.62, 7.53 und 7.25 konnten anhand ihres charakteristischen Kopplungsmusters einem 1,2-disubstituierten Benzolring zugeordnet werden. Das bei

$\delta = 10.78$ erscheinende breite Singulett deutete auf das Vorliegen einer OH- bzw. NH-Gruppe im Molekül hin. Ein weiteres Singulett bei $\delta = 8.90$ sowie zwei Dubletts bei $\delta = 8.35$ und 8.22 konnten jeweils einer aromatischen Methingruppe zugeschrieben werden. Im EI-Massenspektrum war das Ion höchster Masse bei $m/z = 168$ sichtbar, dessen Fragmentierungsmuster mit dem von β -Carbolin **31a** übereinstimmte. Dass es sich bei der isolierten Substanz tatsächlich um die auch unter dem Trivialnamen Norharman **31a** bekannte Verbindung handelte, konnte durch $^1\text{H-NMR}$ -Datenvergleich mit einem in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Referenzspektrum von **31a** bestätigt werden.

31a: R = H

31b: R = CH₃

Harman

Die Verbindung **31b** war auf dem Dünnschichtchromatogramm hinsichtlich UV-Löschung und Anfärbeverhalten mit Anisaldehyd/Schwefelsäure identisch mit **31a**, zeichnete sich aber durch eine höhere Polarität aus ($R_f = 0.35$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

Der Vergleich mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **31a** deutete auf das Vorhandensein desselben β -Carbolin-Grundgerüsts hin. Es fehlte jedoch das Signal für ein aromatisches Proton bei $\delta = 8.90$, dafür trat eine zusätzliche Methylgruppe bei $\delta = 2.77$ auf. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 128$. Eine Datenbanksuche in AntiBase³⁰ und anschließender Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums mit der in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Spektrensammlung führte zur Identifizierung von **31b** als Harman.

Harman, ein typischer Pflanzenmetabolit,⁶⁵ wurde bereits mehrfach als Stoffwechselprodukt bei Actinomyceten⁶⁶ und Dinoflagellaten⁶⁷ gefunden.

6.1.9 Glutarsäure-Derivate

Glutarsäure

Bei dem Hauptmetaboliten des Stammes T268 handelte es sich um eine farblose Substanz, die weder UV-löschend noch fluoreszierend war und keine Farbreaktion beim Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure sowie Ehrlichs Reagenz einging. Sie konnte lediglich als ausgedehnte farblose Zone im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.25$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) nach Anfärbung detektiert werden und wurde in einer Ausbeute von 6 mg/l isoliert.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte zwei Signale für drei Methylengruppen bei $\delta = 2.37$ und 1.85, die im Integralverhältnis 2:1 zueinander standen. Dies deutete auf das Vorliegen einer symmetrischen Struktur hin. Anhand der NMR-Daten und mittels des Fragmentierungsmusters im EI-Massenspektrum konnte die Substanz als Glutarsäure (**32a**) identifiziert werden.

Glutarsäuremonomethylester

Die ebenfalls als farblose Flüssigkeit anfallende Verbindung **32b** war auf dem Dünnschichtchromatogramm hinsichtlich UV- und Anfärbeverhalten mit Anisaldehyd/Schwefelsäure sowie Ehrlichs Reagenz identisch mit **32a** zeichnete sich aber durch geringere Polarität ($R_f = 0.42$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) aus.

Im ^1H -NMR-Spektrum waren drei Methylengruppen bei $\delta = 2.44$, 2.42 und 1.96 zu erkennen. Zusätzlich konnte ein breites Singulett bei $\delta \sim 10$, das einer OH- bzw. NH-Gruppe zugeschrieben wurde, sowie eine Methoxygruppe bei $\delta = 3.69$ detektiert werden. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 128$. Anhand des Fragmentierungsmusters und der ^1H -NMR-Daten konnte die Verbindung als Glutarsäuremonomethylester (**32b**) identifiziert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass **32b** im Zuge der chromatographischen Aufarbeitung durch Veresterung von Glutarsäure (**32a**) mit im Laufmittelgemisch vorhandenem Methanol gebildet wird.

6.1.10 Indolderivate

3-Indolylcarbonsäure

Das farblose Öl **33** zeigte im Dünnschichtchromatogramm UV-Löschung bei 254 nm und färbte sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure orange und mit Ehrlichs Reagenz violett an ($R_f = 0.44$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1), was auf ein Indol hinwies.

Im ^1H -NMR-Spektrum waren lediglich aromatische Protonen sichtbar. Die Signale bei $\delta = 8.09$, 7.40, 7.16 und 7.13 waren aufgrund des typischen Kopplungsmusters einem 1,2-disubstituierten Phenylring zuzuordnen. Weiterhin trat ein Singulett für eine aromatische Methingruppe bei $\delta = 7.88$ auf. Eine mit den aus Massen- und ^1H -NMR-Spektrum gewonnenen Informationen durchgeführte Suche in AntiBase³⁰ lieferte 3-Indolylcarbonsäure (**33**) als mögliche Struktur. Ein Vergleich der ^1H -NMR-Daten von **33** mit der Spektrensammlung ergab vollständige Übereinstimmung und bestätigte die Zuordnung.

Verbindung **33** ist auch unter den Namen Heteroauxin sowie Rhizopin bekannt und spielt als Wachstumsstoff im Metabolismus von Pflanzen eine Rolle.⁶⁸ Ebenso ist es als Metabolit mariner Mikroorganismen sowie halophiler Bakterien⁶⁹ bekannt.

3-Hydroxyacetylindol

Der weiße Feststoff **34** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch hellrote Färbung beim Besprühen mit Ehrlichs Reagenz auf ($R_f = 0.28$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

Der Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums mit dem von **33** zeigte, dass bei **34** wiederum ein Indolgerüst vorlag, jedoch trat eine zusätzliche Methylengruppe bei $\delta = 4.72$ auf. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 175$, welches ein für 3-Hydroxyacetylindol (**34**) typisches Fragmentierungsmuster aufwies. Ein Vergleich der Masse- und ^1H -NMR-Daten mit den im Arbeitskreis vorhandenen Spektren von **34** bestätigte die Zuordnung.

6.1.11 Sonstige Metaboliten

Uracil

Die polare Substanz **35** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.25$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm auf. Sie zeigte kein Anfärbeverhalten beim Besprühen mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte lediglich zwei Dubletts bei $\delta = 7.38$ und 5.44. Diese Information führte in Kombination mit den aus dem EI-Massenspektrum erhaltenen Daten nach einer AntiBase-Suche³⁰ rasch zu der im Arbeitskreis oft isolierten Verbindung Uracil (**35**). Ein Vergleich der Spektren mit den in unserer Sammlung vorhandenen zeigte eine vollständige Übereinstimmung.

p-Hydroxybenzoesäure

Die Verbindung **36** war im Dünnschichtchromatogramm als UV-löschende Zone ($R_f = 0.49$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) aufgefallen und wurde in einer Ausbeute von 2 mg/l als weißer Feststoff isoliert.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **36** war ähnlich dem von **35**, jedoch wiesen die vorhandenen beiden Dubletts hier eine andere chemische Verschiebung auf. Mittels zusätzlicher Informationen aus dem EI-Massenspektrum konnte die Substanz als *p*-Hydroxybenzoesäure (**36**) identifiziert werden. Ein Vergleich der Masse- und ^1H -NMR-Daten mit denen der Spektrensammlung bestätigte die Struktur.

Tyrosol

Substanz **37** fiel als sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure lila anfärbende Zone ($R_f = 0.44$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) im Dünnschichtchromatogramm auf und konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte im Aromatenbereich zwei Dubletts, die für je zwei Protonen integrierten. Dies wies auf das Vorliegen eines 1,4-disubstituierten Aromaten hin.

Zusätzlich waren zwei Triplets für benachbarte Methylengruppen bei $\delta = 7.10$ und 6.78 detektierbar. Die abgeleiteten Strukturfragmente führten zusammen mit den Informationen aus dem EI-Massenspektrum zu *p*-Hydroxyphenylethanol (**37**).

Vanillinsäure

Bei Verbindung **38** handelte es sich um einen weißen Feststoff, der auf dem Dünnschichtchromatogramm UV-Löschung zeigte und mit Anisaldehyd eine hellblaue Farbreaktion einging.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren drei Signale im Aromatenbereich zu sehen, die anhand ihres charakteristischen Kopplungsmusters zu einem 1,3,4-trisubstituierten Aromat gehören mussten. Zusätzlich konnte ein Signal für eine Methoxygruppe bei $\delta = 3.89$ beobachtet werden. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 168$. Eine mit diesen Informationen durchgeführte Datenbanksuche in AntiBase³⁰ ergab Vanillinsäure (**38**) als Strukturvorschlag. Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit denjenigen aus der Spektrensammlung bestätigte die Zuordnung.

4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-propionsäure

Der schwach UV-löschende weiße Feststoff **39** zeigte im Dünnschichtchromatogramm nach Besprühen mit Anisaldehyd eine hellrote Färbung.

Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **39** ergab, dass ebenfalls ein 1,3,4-trisubstituierter, methoxylierter Aromat vorlag. Im Vergleich mit Verbindung **38** waren jedoch zwei zusätzliche Signale für benachbarte Methylengruppen detektierbar. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 196$, was einem Unterschied von zwei Methylengruppen bezogen auf **38** entsprach. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit nachfolgendem Spektrenvergleich ergab, dass 4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-propionsäure (**39**) isoliert wurde.

6.2 *Salegentibacter holothuriorum* T436

Der Stamm T436 wurde aus mehrjährigem arktischem Eis isoliert. Der Rohextrakt fiel im Dünnschichtchromatogramm ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch eine Reihe gelber Zonen auf, die sich sowohl in polaren als auch in unpolaren Bereichen befanden. Beim Besprühen mit Anisaldehyd- und Ehrlichs Reagenz sowie nach Zugabe von 2 N NaOH wurde keine Farbänderung beobachtet. Letzteres deutete darauf hin, dass es sich wahrscheinlich nicht um Chinon-Derivate mit chelierten Hydroxygruppen handelte.

6.2.1 Bestimmung der Taxonomie

Der Stamm T436 wurde phänotypisch sowie genotypisch charakterisiert. Es zeigte sich, dass die 16S rRNA-Sequenz zu 98 % jener von *Salegentibacter holothuriorum* homolog ist.

Der Stamm bildete auf Agar-Platten beige gefärbte Kolonien aus. Optimales Wachstum wurde bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C erreicht, wobei 30 °C nicht überschritten werden durften. Es handelt sich somit um einen psychrotoleranten Stamm, der Gram-negativ, Oxidase- sowie Katalase-positiv ist und Nitrat zu reduzieren vermag. Gelatine und Äsculin können abgebaut werden, Schwefelwasserstoff wird im Stoffwechsel nicht gebildet. T436 zeigt weder β -Galaktosidase- noch Arginin-, Lysin- sowie Ornithin-Decarboxylaseaktivität. Im SFN-Biolog Verwertungstest können im Gegensatz zu Zuckerverbindungen fettähnliche Substanzen wie Tween 40 und Tween 80 metabolisiert werden.

6.2.2 4-Nitrophenol

Der hellgelbe Feststoff **40** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.60$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm auf.

Die Verbindung zeigte im APCI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 138$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Im ^1H -NMR-Spektrum waren lediglich charakteristische Signale für zwei benachbarte aromatische Protonen bei $\delta = 8.12$ und 6.88 detektierbar. Unter Einbeziehung der aus der Molmasse abgeleiteten Summenformel musste es sich daher um ein symmetrisches Molekül handeln. Im IR-Spektrum waren typische Banden für eine Nitrogruppe bei 1594 und 1339 cm^{-1} vorhanden. Dies legte die Vermutung nahe, dass ein hydroxy- sowie nitrosubs-

tituierter Aromat vorlag, was durch die für 4-Nitrophenol (**40**) charakteristische Absorption bei 309 nm im UV-Spektrum bestätigt wurde.

40

Verbindung **40** ist bereits als Stoffwechselprodukt von *Stephanaspora caroticolor* isoliert worden.⁷⁰ Dieser auch unter dem Namen Karottentrüffel bekannte seltene Gasteromycet ist in Laub- und Mischwäldern beheimatet und bevorzugt lehmige, kalkhaltige Böden. Die etwa 1 bis 3 cm großen knollenförmigen Fruchtkörper wachsen hypogäisch und sind an ihrer orangegelben Farbe zu erkennen.

6.2.3 4-Hydroxy-3-nitro-phenyl-Derivate

41: R = COOH

42: R = CH₂COOH

43: R = CH₂CH₂COOH

44: R = CH₂COOCH₃

45: R = CH₂CH₂OH

46: R = CH₂CH₂NHAc

47: R = CHCHNO₂

4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure

Verbindung **41** wurde in einer Ausbeute von 0.09 mg/l als gelber Feststoff isoliert. Die Substanz zeichnete sich durch relativ hohe Polarität aus, was sich im *R_f*-Wert von 0.25 bei Verwendung des Laufmittelgemischs CH₂Cl₂/MeOH 9:1 widerspiegelte.

Im EI-Massenspektrum zeigte **41** das Ion höchster Masse bei *m/z* = 183. Im ¹H-NMR-Spektrum fanden sich für einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten charakteristische Signale bei δ = 8.66, 8.15 und 7.13. Das ¹³C-NMR-Spektrum wies eine auffällige Resonanz bei δ = 169.8 auf, die einem Carboxyl-Kohlenstoffatom zugeschrieben wurde. Im UV-Spek-

trum war ein Absorptionsmaximum bei 340 nm vorhanden. Aus dem IR-Spektrum konnten Banden für das aromatische Grundgerüst bei 1626 und 1574 cm^{-1} , für eine Nitrogruppe bei 1337 sowie 1542 cm^{-1} und für eine Arylcarbonsäure-Einheit bei 1685 cm^{-1} entnommen werden. In Kombination mit den aus einem HMBC-Spektrum erhaltenen Informationen konnte **41** als 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (**41**) identifiziert werden.

4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (**41**) war bisher nur als Syntheseprodukt bekannt.

Abbildung 32 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Struktur von 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (**41**).

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure

Verbindung **42**, die in einer Ausbeute von 0.15 mg/l als gelber Feststoff isoliert wurde, war im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.39$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch ihre Eigenfarbe und UV-Löschung bei 254 nm aufgefallen.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigte **42** hinsichtlich des Kopplungsmusters im Aromatenbereich deutliche Ähnlichkeit zu **41**. Außer einem geringen Unterschied in der chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen war im ^1H -NMR-Spektrum von **42** im Gegensatz zu **41** ein zusätzliches Singulett bei $\delta = 3.63$ vorhanden, das einer Methylengruppe zugeordnet wurde. Mittels EI-Massenspektrometrie wurde die Masse $m/z = 197$ bestimmt, was einer Differenz von vierzehn im Vergleich zu Verbindung **41** entsprach. Im UV-Spektrum war ein Absorptionsmaximum bei 354 nm vorhanden. Das IR-Spektrum von **42** zeigte im Vergleich mit dem von **41** identische Banden für funktionelle Gruppen, jedoch lag die Absorption der Carboxylgruppe bei 1698 cm^{-1} , was auf deren Verknüpfung mit einer gesättigten Alkylkette hindeutete. Diese Informationen führten in einer Datenbanksuche mit AntiBase³⁰ zu 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure (**42**). Ein Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.⁷⁵

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-propionsäure

Die Verbindung **43** war auf dem Dünnschichtchromatogramm hinsichtlich UV-Löschung und Anfärbeverhalten identisch mit **42**, zeichnete sich aber durch eine niedrigere Polarität aus ($R_f = 0.82$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Die Substanz konnte in einer Ausbeute von 0.08 mg/l als gelber Feststoff isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **43** stimmte im Aromatenbereich mit dem von **42** überein. Auffälligster Unterschied war das Fehlen der Methylengruppe bei $\delta = 3.63$, an deren Stelle bei **43** die Signale für eine Ethylengruppe bei $\delta = 2.93$ und 2.67 traten. Im EI-Massenspektrum zeigte **43** das Ion höchster Masse bei $m/z = 211$. Dies entsprach einem im Vergleich zu **42** um vierzehn Einheiten höheren Molekulargewicht. Die UV- und IR-Spektren ergaben dieselben Absorptionsbanden wie bei Verbindung **42**. Es musste sich folglich bei **43** um 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-propionsäure (**43**) handeln. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.⁷¹

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure (**42**) und 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-propionsäure (**43**) wurden erstmals aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und zeigen antibiotische Aktivität gegen *Clostridium difficile*.⁷¹ 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure (**42**) ist darüber hinaus phytotoxisch⁷², verursacht eine 600proz. Erhöhung der Ammoniakfreisetzung bei Kiefern-samen⁷³ und hemmt die Synthese von Chlorophyll bei Klee und Wasserlinse.⁷⁴

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäuremethylester

Substanz **44** wurde als bei 254 nm UV-löschender gelber Feststoff in einer Ausbeute von 0.09 mg/l erhalten, dessen Polarität zwischen der von **42** und **43** lag ($R_f = 0.76$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigte sich im Gegensatz zu demjenigen von Verbindung **42** eine zusätzliche Methoxygruppe bei $\delta = 3.69$. Im EI-Massenspektrum war ein Ion höchster Masse bei $m/z = 211$ zu erkennen, was einer Differenz von vierzehn Einheiten im Vergleich mit **42** entsprach. Im IR-Spektrum waren Banden für Phenyl- und Nitrogruppen sowie für eine Esterfunktion bei 1737 cm^{-1} sichtbar. Das UV-Spektrum war identisch mit dem von **42** und **43**. Aus der Kombination dieser Informationen wurde Verbindung **44** als 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäuremethylester (**44**) identifiziert. Ein Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.⁷⁵

2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol

Die Substanz **45** wurde in einer Ausbeute von 0.13 mg/l aus einem 20 l-Fermentationsansatz von Stamm T436 isoliert. Die Verbindung fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.59$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) als gelbe Zone auf, die UV-Licht bei 254 nm löschte.

UV- und ^1H -NMR-Spektren von **45** zeigten wiederum fast vollständige Übereinstimmung mit denjenigen von **43**. Beide ^1H -NMR-Spektren besaßen identische Signalaufspaltungen, jedoch war die chemische Verschiebung der Triplets bei $\delta = 2.93$ und 2.67 auf 3.86 und 2.84 verschoben. Im IR-Spektrum war eine zusätzliche Bande für eine Hydroxygruppe vorhanden, während die der Carboxyl-Funktion fehlte. Im EI-Massenspektrum zeigte **45** das Ion höchster Masse bei $m/z = 183$. Die Substanz wurde als 2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol (**45**) identifiziert. Ein Vergleich der NMR-Daten mit publizierten Werten bestätigte die Zuordnung.⁷⁵

N-(4-Hydroxy-3-nitrophenylethyl)acetamid

Substanz **46** zeichnete sich durch UV-Löschung bei 254 nm und fehlende Farbreaktion beim Besprühen mit Anisaldehyd aus. Die Verbindung konnte als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 0.4 mg/l aus dem Kulturfiltrat des Stammes T436 isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **46** zeigte im Gegensatz zu denjenigen von **43** und **45** ein zusätzliches Singulett bei $\delta = 1.93$, welches einer Acetylgruppe zugeschrieben wurde. Im EI-Massenspektrum lag das Ion höchster Masse bei $m/z = 224$. Das IR-Spektrum wies außer Hydroxy-, Phenyl-, und Nitro-Banden auch solche von sekundären Amin- sowie Amidgruppen bei 3300 cm^{-1} bzw. 1634 und 1532 cm^{-1} auf. Eine Suche in AntiBase³⁰ und ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten⁷⁵ führten zu N-(4-Hydroxy-3-nitrophenylethyl)acetamid (**46**).

2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol (**45**) und N-(4-Hydroxy-3-nitrophenylethyl)acetamid (**46**) wurden erstmals von SVIRIDOV *et al.* aus *Pyricularia oryzae* Cav. isoliert.⁷⁵ Dieser Deuteromycet ist der Erreger von Pyriculariosis, einer bei Reispflanzen verbreiteten Erkrankung. 2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol (**45**) zeigte beim Test eine wachstumshemmende Aktivität bei Pflanzen.

2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol

Auf dem Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.83$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) fiel **47** durch gelbe UV-Löschung bei 254 nm auf, jedoch wies keine Anfärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf. Die Verbindung wurde als orangefarbener Feststoff in einer Ausbeute von 0.03 mg/l isoliert.

Abbildung 33 Das HMBC-Spektrum (CD_3OD , 600 MHz) von 2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)-phenol (**47**).

Im ^1H -NMR-Spektrum waren drei Signale für aromatische Methingruppen bei $\delta = 8.36$, 7.87 und 7.10 sichtbar, die anhand ihres Kopplungsmusters einem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten zugeordnet werden konnte. Zusätzlich waren zwei Dubletts bei $\delta = 8.05$ und 7.87 detektierbar, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und der zugehörigen Kopplungskonstante ($^3J = 13.5$ Hz) zu einer *trans*-ständigen Doppelbindung gehören mussten. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 210$, aus dem durch Hochauflösung die Summenformel $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5$ ermittelt wurde. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren sieben Signale sichtbar. Erst im HMBC-Experiment konnte die fehlende achte Resonanz detektiert und die Strukturfragmente verknüpft werden. Dem UV-Spektrum

waren Absorptionen bei 318, 333 und 435 nm zu entnehmen. Im IR-Spektrum waren eine Alkenbande bei 3110 cm^{-1} , eine Arylalkenbande bei 1624 cm^{-1} sowie eine Nitrobande bei 1537 und 1342 cm^{-1} sichtbar. Die Verknüpfung der erhaltenen spektroskopischen Daten führte zu dem Ergebnis, dass 2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (**47**) vorlag.

Abbildung 34 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Struktur von **47**

2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (**47**) wurde erstmals im Jahr 1992 aus Blättern der indischen Mangrove *Sonneratia acida* isoliert.⁷⁶

Abbildung 35 Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen der Lösungsmittel und den von 2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)-phenol (**47**).

Bei **47** handelt es sich um ein annähernd planares Molekül, in dem ein Sauerstoffatom der *ortho*-ständigen Nitrogruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit der benachbarten Hydroxygruppe eingeht. Die Möglichkeit zur Ausformung zweier polymorpher Zustände liegt darin begründet, dass es beim Kristallisationsprozess zu einem Konkurrenzeffekt zwischen der Ausbildung von intra- und intermolekularen Wasserstoff-

brückenbindungen kommt. So binden die aziden Protonen von Methanol an die Sauerstoffatome der Phenol- sowie der Nitrogruppe. Infolgedessen wird beim Entfernen des Lösungsmittels die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt, was zur gelben polymorphen Form führt. Das als schwächerer Protonendonator fungierende Chloroform hingegen bedingt die Ausformung intramolekularer Wasserstoffbrücken, was zu einem eingeschränkten gegenseitigen Kontakt der Moleküle führt und so die bevorzugte Bildung orangefarbener Kristalle hervorruft. Die letztgenannte polymorphe Form ist weniger stabil.⁷⁷

Abbildung 36 Dreidimensionale Darstellung der gelben polymorphen Form von 2-Nitro-4-(2'-nitroethyl)phenol (**47**).

Abbildung 37 Dreidimensionale Darstellung der orangefarbenen polymorphen Form von 2-Nitro-4-(2'-nitroethyl)phenol (**47**).

6.2.4 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-Derivate

48: R = CH₂COOCH₃

49: R = CH₂CH₂COOH

50: R = CH₂CH₂Cl

51: R = CH₂CHClCOOCH₃

52: R = CH₂CH₂NHCOCH₃

53: R = CHCHNO₂

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-essigsäuremethylester

Der orangefarbene Feststoff **48** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.36$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1) durch die intensive Eigenfarbe sowie gelbe Fluoreszenz bei 254 nm auf. Verbindung **48** konnte in einer Ausbeute von 0.02 mg/l isoliert werden.

Im ¹H-NMR-Spektrum waren drei Singulett-Signale bei $\delta = 7.96$, 3.70 und 3.60 sichtbar. Ersteres konnte zwei symmetrischen aromatischen Protonen zugeordnet werden, während die beiden letztgenannten zu jeweils einer Methyl- bzw. einer Methylengruppe gehörten. Verbindung **48** wies im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 255$ [M-H]⁺ auf, aus dem per Hochauflösung die Summenformel C₉H₈N₂O₇ bestimmt werden konnte. Diese ergab in einer Datenbanksuche mit AntiBase³⁰ in Kombination mit den aus den ¹H-NMR-Daten erhaltenen Strukturfragmenten keinen Treffer. Die geringe Substanzmenge sowie die ohnehin problematische Nachweisbarkeit von ¹³C-Resonanzen quartärer Kohlenstoffatome, welche mit Nitrogruppen funktionalisiert sind, führte dazu, dass die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen von **48** nur in einem HMBC-Experiment detektiert werden konnte. Hier waren sieben Resonanzen erkennbar, von denen eine einer Ester- bzw. Amidgruppe, vier aromatischen Kohlenstoffatomen sowie zwei einer aliphatischen Kette zugeordnet wurden. Die vier aromatischen Signale konnten aus Symmetriegründen einem 1,2,4,6-tetrasubstituierten Phenylring zugeschrieben werden. Im UV-Spektrum war die für substituierte Dinitrophenolsysteme charakteristische Absorption bei 432 nm zu erkennen. Dem IR-Spektrum konnten Banden für Phenyl- bzw. Nitrogruppen sowie für eine Esterfunktion entnommen werden. Diese Informationen führten dazu, dass **48** als 3,5-Dinitro-4-hydroxyphenyl-essigsäuremethylester (**48**) identifiziert wurde. In der Literatur ist **48** bislang nicht als Naturstoff bekannt.

Abbildung 38 HMBC-Spektrum (600 MHz, CD_3OD) von 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-essigsäuremethylester (**48**).

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-propionsäure

Im Dünnschichtchromatogramm war **49** hinsichtlich UV-Löschung und Anfärbeverhalten identisch mit **48**, zeichnete sich aber durch eine höhere Polarität aus ($R_f = 0.16$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Die Substanz **49** konnte in einer Ausbeute von 0.05 mg/l isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum des orangefarbenen Feststoffs stimmte im Aromatenbereich mit dem von **48** überein. Es fehlten jedoch die Singuletts der aliphatischen Protonen, an deren Stelle Signale für eine Ethylengruppe bei $\delta = 2.89$ und 2.62 traten. Das ESI-Massenspektrum und die per Hochauflösung bestimmte Summenformel zeigten, dass es sich bei **48** und **49** um Isomere handelte. Die UV-Spektren beider Verbindungen waren identisch, ebenso konnten im IR-Spektrum Banden für Aromaten- und Nitrogruppen detektiert werden. Hier fehlte jedoch die Absorption der Estergruppe, stattdessen trat eine zusätzliche Bande für eine Säuregruppe bei 1712 cm^{-1} auf. Ausgehend von diesen Informationen wurde vermutet, dass es sich bei **49** um 3,5-Dinitro-4-hydroxyphenyl-propionsäure (**49**) handelte. Die im HMBC-Spektrum beobachteten Korrelationen bestätigten diese Vermutung. Verbindung **49** wurde bislang in der Literatur nicht als Naturstoff beschrieben.

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-ethylchlorid

Verbindung **50** zeichnete sich auf dem Dünnschichtchromatogramm durch dieselbe Eigenfarbe sowie identische UV-Eigenschaften, jedoch unterschiedliche Polarität ($R_f = 0.44$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) im Vergleich zu **48** und **49** aus. Der orangefarbene Feststoff **50** konnte in einer Ausbeute von 0.03 mg/l isoliert werden.

Das sich im ^1H -NMR-Spektrum zeigende Signalmuster von **50** stimmte mit dem von **49** sehr gut überein. Jedoch erschienen die auftretenden Triplets bei einer anderen chemischen Verschiebung. Im ESI-Massenspektrum fiel das Molekölion durch ein für Chlor typisches Isotopenverhältnis (3:1) auf. Auch die Hochauflösung bestätigte die Existenz dieses Elementes im Molekül. Das IR-Spektrum zeigte weder die Bande für eine Säure- noch für eine Estergruppierung. Es musste sich bei der Substanz folglich um 3,5-Dinitro-4-hydroxyphenyl-ethylchlorid (**50**) handeln. Mit Hilfe des HMBC-Spektrums wurde die Struktur abgesichert. Verbindung **50** ist bisher in der Literatur weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

Abbildung 39 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-ethylchlorid (**50**).

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-2-chlor-propionsäuremethylester

Die orangefarbene Substanz **51** wurde in einer sehr geringen Ausbeute von 0.04 mg/l isoliert und wies im Dünnschichtchromatogramm identisches UV- und Anfärbeverhalten wie die vorangehenden 3,5-Dinitro-4-hydroxyphenyl-Derivate auf.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **51** zeigte im aromatischen Bereich ebenfalls ein Singulett, das für zwei Protonen integrierte. Im aliphatischen Bereich befanden sich Signale für eine Methingruppe bei $\delta = 4.56$, eine Methoxygruppe bei $\delta = 3.73$ sowie für eine diastereotope Methylengruppe bei $\delta = 3.18$ bzw. 3.06. Die chemische Verschiebung der Methingruppe legte die Vermutung nahe, dass diese mit einem Heteroatom sowie einer Carbonylfunktion

verknüpft war. Im APCI-Massenspektrum trat ein Ion bei $m/z = 303$ $[M-H]^-$ auf, das aufgrund seines Isotopenmusters auf das Vorhandensein eines Chloratoms im Molekül hindeutete. Ebenso zeigte das IR-Spektrum eine starke Absorptionsbande bei 701 cm^{-1} , welche charakteristisch für chloresubstituierte Kohlenstoffatome ist. Ein Hochauflösung-ESI-Spektrum bestätigte die Summenformel von $C_{10}H_9ClN_2O_7$. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-2-chlor-propionsäuremethylester (**51**) isoliert wurde. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnten keine 2D-NMR-Experimente zur weiteren Absicherung der Struktur durchgeführt werden. Verbindung **51** war bisher weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

***N*-(3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenylethyl)acetamid**

Die ebenfalls als oranger Feststoff anfallende Substanz **52** war auf dem Dünnschichtchromatogramm hinsichtlich UV-Verhalten identisch mit den vorherigen Dinitrophenol-Verbindungen und konnte in einer Ausbeute von 0.14 mg /l isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **52** zeigte im Aromatenbereich große Ähnlichkeit zu dem von **50**, während die aliphatischen Signale gut mit denen von Verbindung **46** übereinstimmten. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren acht Signale erkennbar, die aufgrund der Symmetrieeigenschaften des aromatischen Strukturelements zehn Kohlenstoffatomen zugeordnet wurden. Das ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 268$ $[M-H]^-$, zusätzlich zeichnete sich das IR-Spektrum von **52** durch große Ähnlichkeit zu dem von **46** aus. Die Kombination der beschriebenen Informationen ließen nur den Schluss zu, dass es sich bei **52** um *N*-(3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenylethyl)acetamid handelte. Die Struktur wurde durch die im HMBC-Spektrum auftretenden Korrelationen weiter abgesichert. Das Dinitrophenol-Derivat **52** war bislang ebenso weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

Abbildung 40 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von *N*-(3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenylethyl)acetamid (**52**).

2,6-Dinitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol

Das ESI-Massenspektrum von **53** zeigte ein Ion bei $m/z = 254$ $[M-H]^-$, was auf das Vorhandensein einer ungeraden Zahl an Stickstoffatomen im Molekül hinwies. Mittels Hochauflösung wurde die Summenformel $C_8H_5N_3O_7$ bestimmt. Im 1H -NMR-Spektrum waren ein Singulett bei $\delta = 8.24$, das aufgrund der Integralhöhe zwei aromatischen Protonen zugeschrieben wurde, sowie zwei Dubletts bei $\delta = 7.99$ und 7.76 zu erkennen. Letztere konnten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und der zugehörigen Kopplungskonstante ($^3J = 13.5$ Hz) einer *trans*-ständigen Doppelbindung zugeordnet werden. Die spektroskopischen Befunde führten im Vergleich mit den von Verbindung **47** erhaltenen zu dem Ergebnis, dass es sich bei **53** um 2,6-Dinitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (**53**) handeln musste. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnten keine zusätzlichen 2D-NMR-Experimente durchgeführt werden. Ebenfalls stellt **53** eine bislang nicht bekannte Verbindung dar.

6.2.5 Pyriculamid

Der gelbe Feststoff **55** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch seine Eigenfarbe, UV-Löschung bei 254 nm. Die Substanz **55** wurde in einer Ausbeute von 0.3 mg/l aus dem Stamm T436 isoliert.

Das 1H -NMR-Spektrum von **55** zeigte im Aromatenbereich identische Signale wie die bereits beschriebenen 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-Derivate. Im aliphatischen Bereich traten zahlreiche zusätzliche Resonanzen auf, die denen des Diketopiperazins Cyclo(tyrosylprolyl) (**54**) sehr ähnelten. Das ESI-Massenspektrum zeigte eine Molmasse von 305 an. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren 14 C-Atome zu erkennen, von denen zwei ($\delta = 168.2$ und 164.5) Ester- bzw. Amidgruppen zugeordnet werden konnten. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit den so erhaltenen Informationen führte zu Pyriculamid (**55**). Ein Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung. Das nitrierte Cyclo(tyrosylprolyl) **55** wurde erstmals aus *Pyricularia oryzae* isoliert.⁷⁵

6.2.6 7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3'-Nitro-daidzein)

Abbildung 41 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von 7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (**56**).

Die UV-löschende Verbindung **56** konnte in einer Ausbeute von 0.06 mg/l in Form eines gelben Feststoffs isoliert werden. Sie zeigte im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 298$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Im ^1H -NMR-Spektrum waren sieben aromatische Protonen bei $\delta = 8.45$, 8.15, 7.97, 7.71, 7.12, 6.94 und 6.88 zu erkennen, von denen die letzten sechs anhand des Aufspaltungsmuster sowie der Kopplungskonstante zwei 1,2,4-trisubstituierten aromatischen Systemen zugeordnet werden konnten. Dem ^{13}C -NMR-Spektrum konnte das Vorliegen von fünfzehn Kohlenstoffatomen entnommen werden, unter denen sich eine Carbonylgruppe ($\delta = 174.3$) befand. Durch hochauflösende Massenspektrometrie konnte die Summenformel zu $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{NO}_6$ bestimmt werden. Anhand von 2D-NMR-Experimenten konnte ein Strukturvorschlag für **56** abgeleitet werden, demzufolge es sich um 7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (**56**) handeln musste. Durch Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten mit Literaturwerten konnte die Zuordnung bestätigt werden.

Verbindung **56** wurde bereits 1997 aus dem gentechnisch veränderten Stamm *Streptomyces* sp. K₃ isoliert.⁷⁸

Abbildung 42 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von 7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (**56**) .

56

6.2.7 5,7-Dihydroxy-3-(3,5-dinitro-4-hydroxy-phenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3',5'-Dinitro-genistein)

Der orangefarbene, bei 254 nm gelb fluoreszierende Feststoff **57** war in allen gängigen Lösungsmitteln mit Ausnahme von Dimethylsulfoxid schwer löslich.

Verbindung **57** wies im APCI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 359$ $[M-H]^-$ auf, aus dem mittels Hochauflösung die Summenformel $C_{15}H_8N_2O_9$ erhalten wurde. Im 1H -NMR-Spektrum waren Signale für eine OH- bzw. NH-Gruppe bei $\delta = 12.78$ sowie fünf Methingruppen bei $\delta = 8.27$, 8.03 (2H), 6.12 und 6.00 erkennbar. Die beiden letztgenannten wurden aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und der zugehörigen Kopplungskonstante *meta*-ständigen aromatischen Protonen zugeordnet. Das Singulett bei $\delta = 8.03$ integrierte für zwei Protonen, was dafür sprach, dass ein symmetrisch substituierter Phenylring vorlag. Dementsprechend wurden im ^{13}C -NMR-Spektrum, das aus insgesamt dreizehn Resonanzen bestand, zwei Signale mit doppelter Intensität beobachtet. Mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren konnten die abgeleiteten Strukturfragmente verknüpft und die Substanz als 5,7-Dihydroxy-3-(3,5-dinitro-4-hydroxy-phenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (**57**) identifiziert werden.

Verbindung **57** wurde erstmals 1999 aus dem genetisch veränderten Amikacin-Produzenten *Streptomyces* sp. K3 isoliert.⁷⁹

Abbildung 43 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **57**.

Abbildung 44 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von **57**.

57

6.2.8 Nitro-*N*_β-acetyltryptamine

2-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin

Die Substanz **58** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch ihre gelbe Eigenfarbe und UV-Löschung bei 254 nm auf, zeigte jedoch keine Farbreaktion beim Besprühen mit Anisaldehyd.

Im ESI-Massenspektrum war ein Ion bei $m/z = 270$ $[M+Na]^+$ zu erkennen, welches auf eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen in der Verbindung hinwies. Eine HRESI-MS-Messung führte zur Summenformel $C_{12}H_{13}N_3O_3$. Anhand des IR-Spektrums konnte weiterhin auf die Anwesenheit einer Nitrogruppe geschlossen werden. Das 1H -NMR-Spektrum zeigte im aromatischen Bereich Signale höherer Ordnung bei $\delta = 7.74$, 7.41 (2H) und 7.18. Ferner konnte neben vier aliphatischen Protonen bei $\delta = 3.51$ und 3.37, welche Methylengruppen zugeschrieben wurden, das Signal einer Acetylgruppierung bei $\delta = 1.78$ detektiert werden. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren zwölf Resonanzen erkennbar, unter denen sich die eines Carbonylkohlenstoffatoms bei $\delta = 173.4$ befand. Somit war die Anwesenheit einer Ester- oder Amidgruppe im Molekül gesichert. Das komplexe Aufspaltungsmuster der aromatischen Protonen im 1H -NMR-Spektrum erschwerte die Zuordnung der Position der Nitrogruppe. Die Strukturaufklärung gelang schließlich mit Hilfe eines HMBC-Korrelationsspektrums und führte zu 2-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**58**). Das Indolderivat **58** war bisher weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

Abbildung 45 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von 2-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**58**).

6-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin

Der gelbe Feststoff **59** zeigte im Dünnschichtchromatogramm UV-Löschung bei 254 nm. Im ESI-Massenspektrum war ein Ion bei $m/z = 270$ $[M+Na]^+$ zu erkennen, was auf das Vorliegen einer zu **58** isomeren Verbindung hinwies. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte im aromatischen Bereich Signale bei $\delta = 8.31$, 7.92, 7.68 und 7.46, welche einem disubstituierten Indolgerüst zugeordnet werden konnten. Weiterhin waren Signale für zwei Methylengruppen bei $\delta = 3.46$ und 2.97 sowie für eine Acetylgruppe bei $\delta = 1.90$ erkennbar. Aus diesen Gründen wurde vermutet, dass es sich bei Verbindung **59** um ein *N*_β-Acetyltryptamin-Derivat handelte. Aufspaltungsmuster und chemische Verschiebungen im aromatischen Bereich deuteten auf eine Substitution in Position sechs des Indolgerüsts hin. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit denjenigen von **58** führte zu 6-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**59**). Diese Verbindung war bisher weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt bekannt.

7-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin

Der gelbe Feststoff **60** wies identisches Verhalten im Dünnschichtchromatogramm auf und zeigte im ESI-Massenspektrum dasselbe Quasimolekülion wie die Verbindungen **58** und **59**. Im ¹H-NMR-Spektrum waren neben aromatischen Signalen bei $\delta = 7.78$, 7.71, 7.38 und 7.20 zusätzliche Resonanzen für zwei Methylengruppen bei $\delta = 3.34$ und 3.04 sowie für eine Acetylgruppe bei $\delta = 1.89$ erkennbar. Aufspaltungsmuster und chemische Verschiebungen der aromatischen Signale legten das Vorliegen eines an Position sieben substituierten Indolgerüsts nahe. Es musste sich bei **60** somit um in der Literatur bisher nicht beschriebenes 7-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**60**) handeln.

6.2.9 Salegentipyrrol A

Die sich mit Anisaldehyd in der Wärme orange anfärbende Verbindung **61** löscht UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, war im Gegensatz zu den bisher aus diesem Stamm isolierten Verbindungen jedoch farblos. Die Substanz **61** konnte lediglich in einer geringen Ausbeute von 0.02 mg/l isoliert werden.

Abbildung 46 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) von Salegentipyrrol A (**61**) in CDCl_3 .

Mit Hilfe des ^{13}C -NMR-Spektrums und einer HRESI-MS-Messung wurde **61** die Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ($M = 247$ g/mol) zugewiesen. Dem ^1H -NMR-Spektrum waren Signale für eine Acetylgruppe ($\delta = 2.06$), zwei diastereotopie Methylengruppen ($\delta = 3.84$, 3.40 , 3.01 und 2.81), eine Methingruppe ($\delta = 6.23$), vier benachbarte aromatische Protonen ($\delta = 7.42$, 7.24 , 6.84 und 6.66) sowie ein durch D_2O austauschbares Proton ($\delta = 5.34$) zu entnehmen. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte die Existenz einer Amid- oder Estergruppe ($\delta = 170.1$) an. Mit Hilfe eines ^1H , ^1H -COSY-Experimentes konnten die in Abbildung 47 gezeigten Strukturelemente abgeleitet werden. Mittels eines HMBC-Experiments gelang die Verknüpfung der erhaltenen Fragmente.

Abbildung 47 $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Fragmente von Salegentipyrrol A (**61**).

Abbildung 48 Aus HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von Salegentipyrrol A (**61**).

Verbindung **61** wurde als 1-Acetyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]-3a-nitro-indol (**61**) identifiziert und Salegentipyrrol A genannt. Die dieser bislang nicht beschriebenen Substanz strukturell nah verwandte Verbindung **62** wurde bereits aus einem Stamm der Spezies *Streptomyces staurosporeus* isoliert, der als Produzent des Proteinkinase-C-Hemmstoffes Staurosporin (**63**) bekannt ist.⁸⁰ Die Produktion von **62** wurde durch Zufütterung von Tryptamin-hydrochlorid angeregt,⁸¹ woraus sich ein plausibler Biosyntheseweg für die Bildung von **61** ausgehend von N_β -Acetyltryptamin ableiten lässt (siehe Abbildung 49).

Abbildung 49 Hypothetische Biosynthese von **61**.

6.2.10 Salegentipyrrol B

Im Dünnschichtchromatogramm zeigte der gelbe Feststoff **64** identisches UV- und Anfärbeverhalten wie **61**.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte große Ähnlichkeit zu demjenigen von Verbindung **61**, es fehlte jedoch das Signal eines Protons im Aromatenbereich. Anhand des Kopplungsmusters konnte auf das Vorliegen eines 1,2,3-trisubstituierten Phenylrings geschlossen werden. Hochauflösende ESI-Massenspektrometrie führte zur Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, welche im Vergleich mit **61** auf den Austausch eines Protons durch eine Nitrogruppe hindeutete. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnten keine weiterführenden 2D-NMR-Experimente durchgeführt werden. Aus den vorhandenen spektroskopischen Daten konnte jedoch ein Strukturvorschlag für Verbindung **64** abgeleitet werden, demzufolge es sich um 1-Acetyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]-3a,7-dinitro-indol (**64**) handelte. Substanz **64** war weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt in der Literatur zu finden.

64

6.2.11 4,5-Dinitro-3-methoxy-phenol

Die bei 254 nm UV-löschende, orangefarbene Verbindung **65** zeigte im APCI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 213$ $[M-H]^-$, aus dem per Hochauflösung die Zusammensetzung $C_7H_6N_2O_6$ ermittelt wurde. Dem 1H -NMR-Spektrum waren zwei Signale bei $\delta = 8.59$ und 7.55 zu entnehmen, die anhand ihrer charakteristischen Kopplungskonstante einem 1,2,3,5-tetrasubstituierten Benzolring zuzuordnen waren. Weiterhin war ein Signal bei $\delta = 3.87$ sichtbar, das einer Methoxygruppe zugeschrieben werden konnte. Im IR-Spektrum waren Absorptionsbanden für Phenyl- und Nitrogruppen sichtbar. Mittels 2D-NMR-Spektroskopie konnte die Position der Substituenten am Aromatenring festgelegt werden. Bei Verbindung **65** handelte es sich demzufolge um 4,5-Dinitro-3-methoxy-phenol (**65**), eine Substanz, die bisher nicht als Naturstoff oder Syntheseprodukt bekannt war.

65

6.2.12 4,6-Dinitro-2-methoxy-phenol

Das 1H -NMR-Spektrum der orangen, UV-Licht bei 254 nm löschenden Substanz zeigte die gleiche Signalaufspaltung, jedoch unterschiedliche chemische Verschiebungen wie Verbindung **65**. Dementsprechend konnte im ^{13}C -NMR-Spektrum dieselbe Zahl an Kohlenstoffatomen detektiert werden. Das EI-Massenspektrum bestätigte ebenfalls die Vermutung, dass es sich um Isomere handelte. Nachdem die Positionen der Substituenten mit Hilfe von 2D-NMR-Spektroskopie bestimmt worden waren, konnte **66** als 4,6-Dinitro-2-methoxy-

phenol (**66**) identifiziert werden. Die Struktur konnte zusätzlich durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit synthetisch hergestelltem **66** abgesichert werden. Verbindung **66** ist auch unter dem Namen 4,6-Dinitroguaiacol (**66**) bekannt.

66

4,6-Dinitroguaiacol (**66**)⁸² und 3,5-Dinitroguaiacol⁸³ sind als Stoffwechselprodukte der roten Alge *Marginisporum aberrans* bekannt und zeigen antimikrobielle Aktivität gegen *B. subtilis*. Außerdem konnte 4,6-Dinitroguaiacol (**66**) bereits aus getrockneten Chilibohnen *Capsicum annuum* isoliert werden.⁸⁴

6.2.13 Sonstige Metaboliten

2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon

67

Das EI-Massenspektrum des orangefarbenen, bei 254 nm UV-löschenden Feststoffs **67** zeigte das Ion höchster Masse bei $m/z = 168$. Im ^1H -NMR-Spektrum waren lediglich zwei Singulets bei $\delta = 5.84$ und 3.80 detektierbar. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte fünf Signale, von denen zwei ($\delta = 186.6$ und 176.7) Carbonylgruppen zugeordnet werden konnten, während die übrigen durch ungewöhnlich hohe Signalintensitäten auffielen. Diese Informationen legten die Vermutung nahe, dass es sich um ein symmetrisches, aus acht Kohlenstoffatomen bestehendes Chinongerüst handelte. Demgemäß konnten die Signale des ^1H -NMR-Spektrums zwei aromatischen Methingruppen sowie zwei Methoxygruppen zugeordnet werden. Eine Suche in AntiBase³⁰ lieferte 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon (**67**) als einzigen Strukturvorschlag. Verbindung **67** ist als Pflanzenmetabolit bekannt und zeigt antitumorale Aktivität.⁸⁵

3-Indolyl-ethyl-methylether **68**

Die farblose, UV-Licht bei 254 nm löschende und sich mit Anisaldehyd in der Wärme violett anfärbende Verbindung **68** zeigte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die für Indolderivate typischen Resonanzen im Aromatenbereich. Zusätzlich waren Signale einer Methoxygruppe bei $\delta = 3.37$ sowie zweier Methylengruppen bei $\delta = 3.66$ und 2.99 erkennbar. Letztere konnten einer Ethandiylgruppe zugeordnet werden, die sich aufgrund der chemischen Verschiebungen zwischen dem Indolgerüst und einem Heteroatom befinden musste. Im IR-Spektrum zeigte **68** eine Absorptionsbande bei 1107 cm^{-1} , welche charakteristisch für das Vorliegen einer Ethergruppierung ist. In Kombination mit der per ESI-Hochauflösung bestimmten Summenformel von $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}$ konnte die Verbindung als 3-Indolyl-ethyl-methylether (**68**) identifiziert werden, das bislang nur als Syntheseprodukt bekannt ist.⁸⁶

Thymin

Verbindung **69** zeigte im EI-Massenspektrum das für Thymin (**69**) charakteristische Fragmentierungsmuster. Die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sichtbaren Signale bestätigten diese Zuordnung.

69

Zusätzlich konnten Uracil (**35**) bzw. *p*-Hydroxybenzoesäure (**36**) aus Stamm T436 isoliert werden.

6.2.14 Isolierte Nitrophenole

Tabelle 7 Eine Übersicht von isolierten Nitroverbindungen aus dem Stamm T436.

Isolierte Nitroverbindungen		R_f -Wert (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1)	R_t [min]
40	0.60	12.1
41: R = COOH	0.25	11.9
	42: R = CH ₂ COOH	0.39	11.3
	43: R = CH ₂ CH ₂ COOH	0.82	11.4
	44: R = CH ₂ COOCH ₃	0.76	13.6
	45: R = CH ₂ CH ₂ OH	0.59	13.2
	46: R = CH ₂ CH ₂ NHAc	0.51	11.1
	47: R = CHCHNO ₂	0.83	13.7
48: R = CH ₂ COOCH ₃	0.36	12.8
	49: R = CH ₂ CH ₂ COOH	0.16	11.9
	50: R = CH ₂ CH ₂ Cl	0.44	15.6
	51: R = CH ₂ CHClCOOCH ₃	0.41	17.0
	52: R = CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃	0.19	10.3
	53: R = CHCHNO ₂	0.53
55	0.45	9.5
56: R ₁ ; R ₂ = H	0.59	16.0
	57: R ₁ = OH; R ₂ = NO ₂	0.21
58 R ₁ = NO ₂ ; R ₂ = H; R ₃ = H 59 R ₁ = H; R ₂ = NO ₂ ; R ₃ = H 60 R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = NO ₂	0.55	12.8
61: R = H 64: R = NO ₂	0.60 0.49	12.8

Isolierte Nitroverbindungen		R_f -Wert (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1)	R_t [min]
65: R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H R ₃ = H; R ₄ = NO ₂	0.51	14.1
	66: R ₁ = H; R ₂ = OCH ₃ R ₃ = NO ₂ ; R ₄ = H	0.50	14.1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nitroverbindungen charakteristische chromatographische und spektroskopische Eigenschaften aufweisen. Die gelben bzw. orangefarbenen Mono- bzw. Dinitrobenzol-Derivate zeigten im Dünnschichtchromatogramm weder beim Besprühen mit Anisaldehyd noch mit Ehrlichs Reagenz eine Farbreaktion. Erst ein spezielles Reagenz für Nitroverbindungen färbt die entsprechenden Zonen an: Mittels Zinn(II)-chlorid-Lösung wurde zunächst die Nitro- zur Aminogruppe reduziert. Diese reagierte anschließend mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd unter Ausbildung einer Schiff-schen Base, welche sich durch intensive Gelb- bzw. Orangefärbung zu erkennen gibt. Im IR-Spektrum zeigen Nitrogruppen typische Absorptionsbanden bei Wellenlängen von 1510 – 1570 und 1320 – 1350 cm⁻¹. Das unterschiedliche UV-Verhalten von Mono- und Dinitrophenolen kann direkt im Dünnschichtchromatogramm oder mittels eines UV-Spektrometers nachgewiesen werden. Erstere löschen im Chromatogramm UV-Licht bei 254 nm und zeigen ein Absorptionsmaximum bei ~ 350 nm (siehe Abbildung 50). Im Gegensatz hierzu weisen Dinitrophenole im Chromatogramm bei 254 nm gelbe Fluoreszenz sowie im UV-Spektrum eine langwellige Absorption bei ~ 430 nm auf. Eine weitere Besonderheit, die bei der spektroskopischen Betrachtungen von Nitroverbindungen beachtet werden muss, ist, dass quartäre aromatische Kohlenstoffatome, die mit Nitrogruppen verknüpft sind, nur bei langen Messzeiten in ¹³C-NMR-Experimenten detektiert werden können.

Abbildung 50 UV-Spektrum (MeOH) eines Mononitrobenzol-Derivats (**42**) im Vergleich mit dem eines zweifach nitrierten Phenols (**48**).

Bei den bisher durchgeführten Biosyntheseuntersuchungen wurde festgestellt, dass die meisten Nitrogruppen durch Oxidation von Aminogruppen entstehen. So konnte mittels Fütterungsexperimenten nachgewiesen werden, dass *p*-Aminophenylalanin (**70**) sowohl der Vorläufer des *p*-Nitrophenylserinol-Teils von Chloramphenicol (**71**)⁸⁷ als auch der Nitrophenyl-Einheit von Aureothin (**72**) ist.⁸⁸

Bei Biosynthese-Studien an Pyrrolnitrin (**73**), welches ausgehend von Tryptophan gebildet wird, konnte gezeigt werden, dass das ursprüngliche Indolstickstoffatom N-1 in die entsprechende Aminogruppe umgewandelt wird, welche dann direkt zur Nitrofunktion oxidiert wird.⁸⁹ Van Pee *et al.* stellten zu einem späteren Zeitpunkt fest, dass das Enzym Chlorperoxidase den letzten Schritt katalysiert.⁹⁰

Ein anderer, weitaus seltener beschrittener Biosyntheseweg zur Bildung einer Nitrogruppe ist die direkte Nitrierung. Das einzige bislang beschriebene Beispiel hierfür ist die Verbindung Dioxapyrrolomycin (**74**), welche in der Arbeitsgruppe von CARTER untersucht wurde.⁹¹ Durch ^{15}N -NMR-Experimente und Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass die Nitrogruppe von Dioxapyrrolomycin (**74**) das gleiche Verhältnis von ^{15}N : ^{14}N sowie ^{18}O : ^{16}O wie zugeführtes $\text{K}^{15}\text{N}^{18}\text{O}_3$ aufwies.

Nicht gänzlich auszuschließend ist ferner die Möglichkeit, dass sich Nitrogruppen durch Oxidation von Nitrosfunktionen während des Aufarbeitungsprozesses bilden. Es konnten bereits mehrfach Nitrosoverbindungen aus natürlichen Quellen isoliert werden. Ein Beispiel hierfür ist 4-Hydroxy-3-nitrosobenzoessäure (**75**), welche von LI *et al.* aus *Streptomyces murayamaensis* isoliert wurde.⁹²

41

41

41

41

Die Differenz von 30 Masseneinheiten kann durch die Reduktion der aromatischen Nitro- zur Aminofunktion erklärt werden. Dieses Phänomen wurde bereits Anfang der achtziger Jahre bei auf chemischer Ionisation (CI) beruhenden MS-Experimenten untersucht.^{93,94,95} Zusätzlich wurde bei APCI-basierten Studien in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel das um 30 Da leichtere Fragment im positiven Modus detektiert.⁹⁶ Eine andere Begründung, die das Auftreten dieses Spaltprodukts erklärt, geht von einer NO-Eliminierung aus, welche bereits aus EI-Experimenten bekannt ist.⁹⁷ Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass in den Full-scan-Spektren keine $[M-H-30]^-$ -Ionen detektiert werden konnten, diese vielmehr erst nach dem Fragmentierungsprozess auftraten.

In mehreren Fällen konnte ein Massenverlust von 47 Einheiten detektiert werden, was auf die Abspaltung eines Moleküls HNO_2 hindeutete.

Im Falle der bisher untersuchten phenolischen Dinitroverbindungen kam es zu ähnlichen Fragmentierungsmustern wie bei einfach nitrierten Substanzen.

Verfügt das vorliegende Nitrophenolderivat über eine leicht abspaltbare Gruppe wie z. B. Chlor, wurde diese zuerst (hier in Form von Chlorwasserstoff) abgespalten. Anschließend erfolgte die Eliminierung von NO.

Liegt hingegen unsubstituiertes Nitrophenol vor, kommt es lediglich zur Abspaltung von Stickstoffmonoxid.

Im positiven Modus konnten nur solche Nitroverbindungen detektiert werden, welche über eine leicht ionisierbare funktionelle Gruppe verfügen. In diesen Fällen konnte stets die Eliminierung eines 46 D schweren Fragments beobachtet werden, wobei es sich vermutlich um Stickstoffdioxid handelt.

6.3 *Actinomyces* sp. T426

Der Stamm T426 wurde aus litoralem Sediment in Feuerland isoliert. Beim biologischen Screening des Rohextraktes gegen verschiedene Organismen konnte eine cytotoxische Aktivität gegen verschiedene Zelllinien gefunden werden.

6.3.1 Tryptophol und *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester

Im EI-Massenspektrum zeigte die farblose Flüssigkeit **76** das Ion höchster Masse bei $m/z = 161$. Anhand der typischen chemischen Verschiebungen sowie Signalaufspaltungen im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 7.62, 7.37, 7.20, 7.12$ und 7.08 konnte auf Indol als Grundstruktur geschlossen werden. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte **76** eine violette Farb-reaktion beim Besprühen mit Ehrlichs Reagenz in der Wärme, was das Vorliegen eines Indolderivats zusätzlich bestätigte. Weiterhin waren Signale im aliphatischen Bereich bei $\delta = 3.90$ und 3.03 zu erkennen, die einer an ein Heteroatom gebundenen Ethylengruppe zugeordnet werden konnten. Eine Suche in Antibase³⁰ mit der ermittelten Molmasse sowie den aus der NMR-Spektroskopie erhaltenen Strukturfragmenten ergab, dass es sich bei **76** um Tryptophol (**76**) handeln musste.

76

77

Das EI-MS-Spektrum des weißen Feststoffs **77** zeigte das für *p*-Hydroxy-benzoesäuremethylester (**77**) charakteristische Fragmentierungsmuster. Ein Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von **77** mit demjenigen von *p*-Hydroxybenzoesäure (**36**) zeigte eine Übereinstimmung der Signale im aromatischen Bereich, wobei Verbindung **77** die zusätzliche Resonanz einer Methoxygruppe bei $\delta = 3.83$ aufwies. Somit wurde der sich aus der EI-Datenbank NIST ergebende Strukturvorschlag bestätigt.

6.4 *Actinomyces* sp. T421

Der Stamm T421 wurde ebenfalls aus litoralem Sediment in Feuerland isoliert. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt cytotoxische Aktivität gegen einige Zelllinien.

6.4.1 *trans*-3-Methylthioacrylsäure

Der UV-löschende, farblose Feststoff **78** zeigte im EI-Massenspektrum ein Ion höchster Masse bei $m/z = 118$. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren neben einer Methylgruppe bei $\delta = 2.37$ zwei weitere Signale bei $\delta = 7.88$ und 5.66 sichtbar, die im Bereich von Doppelbindungsprotonen lagen und von denen eines aufgrund seiner chemischen Verschiebung an ein Heteroatom gebunden sein musste. Nach einer Suche in AntiBase³⁰ sowie einem Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten konnte **78** als *trans*-3-Methylthioacrylsäure (**78**) identifiziert werden.

78

Bei systematischen Untersuchungen von SURETTE und VINING⁹⁸ konnte 1976 erstmals ein Zusammenhang zwischen der Bildung von **78** und der Konzentration an L-Methionin im Kulturmedium von *Streptomyces lincolnensis* festgestellt werden. Für die Biosynthese von **78** wird der in Abbildung 51 dargestellte Mechanismus vermutet.

Abbildung 51 Bildung von **78** aus Methionin nach SURETTE und VINING.⁹⁸

6.4.2 Benzoessäure und Phenylessigsäure

Die Verbindung **79** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch UV-Löschung bei 254 nm auf, wies jedoch keine Anfärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf. Durch Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums sowie des charakteristischen EI-MS-Fragmentierungsmusters konnte die Substanz rasch als Benzoessäure (**79**) identifiziert werden.

Der ebenfalls farblose Feststoff **80** zeigte das gleiche UV- und Anfärbeverhalten wie Verbindung **79**. Im EI-Massenspektrum war ein Ion höchster Masse bei $m/z = 136$ erkennbar. Die Massendifferenz von $\Delta m/z = 14$ zwischen den Substanzen **80** und **79** legte die Vermutung nahe, dass **80** über eine zusätzliche Methyl- oder Methylengruppe verfügte. Dieser Befund konnte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt werden. Es handelte sich bei der vorliegenden Verbindung folglich um in unserem Arbeitskreis bereits häufig isolierte Phenylessigsäure (**80**).

6.5 Stamm T846

Der Stamm T846 wurde aus einer Wasserprobe des Humboldt-Stroms vor der chilenischen Küste isoliert. Im Dünnschichtchromatogramm fiel eine ausgeprägte, stark UV-löschende Zone auf, die sich weder mit Anisaldehyd noch mit Ehrlich-Reagenz anfärbte.

6.5.1 3-Indolylcarbonsäure und 3-Indolylcarbaldehyd

Das farblose, sich mit Anisaldehyd rot sowie mit Ehrlichs Reagenz violett anfärbende Öl wies UV-Löschung bei 254 nm auf. EI-Massen- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten identische Signale wie diejenigen von **33**, weswegen die vorliegende Substanz rasch als 3-Indolylcarbonsäure (**33**) identifiziert werden konnte.

33: R = COOH**81:** R = CHO

Die ebenfalls in Form eines farblosen Feststoffs isolierte Verbindung **81** wies gleiches UV- und Anfärbeverhalten auf wie **33**. Das ^1H -NMR-Spektrum deutete ebenso auf das Vorliegen eines Indolgerüsts hin, während im EI-Massenspektrum eine um 16 Einheiten geringere Masse als bei **33** detektiert wurde. Eine Datenbanksuche in NIST wies auf 3-Indolylcarbaldehyd (**81**) hin. Ein Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit dem in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Spektrum von **81** bestätigte diesen Befund.

6.5.2 3-(Methylthio)propansäure

Der farblose Feststoff **82** zeigte im Dünnschichtchromatogramm UV-Löschung und keine Anfärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd. Das ^1H -NMR-Spektrum wies ein mit D_2O austauschbares Signal bei $\delta = 10.76$ auf. Weiterhin fanden sich Resonanzen für zwei benachbarte Methylengruppen bei $\delta = 2.74$ und 2.66 sowie eine für Methylgruppe bei $\delta = 2.11$. Mit diesen NMR-Daten wurde eine Datenbanksuche in AntiBase³⁰ durchgeführt, welche 3-(Methylthio)propansäure (**82**) als Strukturvorschlag lieferte. Die vollständige Übereinstimmung der spektroskopischen Daten mit in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Referenzwerten bestätigte diesen Hinweis. Das Auftreten von Verbindung **82**, welche ein biosynthetisches Zwischenprodukt bei der Bildung von 3-(Methylthio)acrylsäure (**78**) darstellt, kann als Indiz für die Korrektheit des in Abbildung 51 angeführten Mechanismus angeführt werden.⁹⁸ Die *S*-methylierte Form von **82** (DMSP) ist vor allem als Stoffwechselprodukt von Phytoplankton bekannt.⁹⁹ Im Zuge bakteriellen Abbaus wird sie in Dimethylsulfid (DMS) umgewandelt. DMSP sowie DMS spielen eine wichtige Rolle im globalen Schwefelkreislauf.¹⁰⁰

82

6.5.3 1,3,5-Triazin

Im Dünnschichtchromatogramm war **83** durch UV-Löschung bei 254 nm detektierbar, färbte sich jedoch mit keinem der gängigen Sprühreagenzien an. Die Substanz wies eine sehr hohe Polarität auf, welche sich im R_f -Wert von 0.21 im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 widerspiegelte.

Weder EI-, ESI- noch DCI-Massenspektrum zeigten das Auftreten eines Moleküliions an. Im ^1H -NMR-Spektrum war lediglich ein Singulett bei $\delta = 8.53$ erkennbar. Ebenso fand sich im ^{13}C -NMR-Spektrum nur eine Resonanz bei $\delta = 170.5$. Davon ausgehend wurde vermutet, dass es sich bei der isolierten Verbindung um 1,3,5-Triazin (**83**) handelte. Ein Vergleich der NMR-Daten mit denjenigen von kommerziell erhältlichem 1,3,5-Triazin (**83**) bestätigte die Vermutung. Die niedermolekulare, heterocyclische Verbindung **83** war bis jetzt lediglich als Syntheseprodukt bekannt.

6.6 Stamm T406

Der aus Pinguinexkrementen isolierte, psychrophile Stamm T406 zeigte bei einer Temperatur von 4 °C optimales Wachstum. Im Dünnschichtchromatogramm des Rohextrakts waren mehrere gelbe bzw. UV-löschende Zonen auffällig, von denen eine nach Besprühen mit Anisaldehyd eine dunkelviolette Farbreaktion einging. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt cytotoxische Aktivität gegen Nematoden sowie einige Zelllinien.

6.6.1 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol

Verbindung **84** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch UV-Löschung bei 254 nm und Violettfärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf. In Lösung war **84** farblos, während die Substanz im trockenen Zustand eigentümlicherweise eine violette Farbe aufwies.

Abbildung 52 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CD_3OD) von 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (**84**).

Im DCI-Massenspektrum von **84** war ein Ion bei $m/z = 291$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ sichtbar, aus dem sich durch Hochauflösung die Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ ableiten ließ. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte neun aromatische Signale bei $\delta = 7.46, 7.43, 7.31, 7.20, 7.05, 6.97, 6.96, 6.94$ und 6.92 sowie Resonanzen für drei Methylengruppe bei $\delta = 4.22, 3.69$ und 3.04 . Dem H,H-COSY -Spektrum konnten die in Abbildung 53 dargestellten Korrelationen von acht aromatischen Protonen sowie zweier Methylengruppen untereinander entnommen werden. Hieraus ergab sich, dass zwei 1,2-disubstituierte Phenylsysteme sowie eine Ethylengruppe im Molekül vorlagen. Aufgrund der chemischen Verschiebung musste letztere an mindestens ein Heteroatom gebunden sein.

Abbildung 53 Mittels H,H-COSY -Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (**84**).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von **84** zeigte entsprechend der Summenformel neunzehn Signale. Über ein HMBC-Experiment (siehe Abbildung 54) konnten die erhaltenen Fragmente miteinander verknüpft und die Struktur somit aufgeklärt werden. Es handelte sich um in der Literatur bisher als Naturstoff nicht bekanntes 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (**84**).

Abbildung 54 Mittels HMBC-Korrelationen abgeleitete Strukturfragmente von 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (**84**).

84: $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

85: $\text{R} = \text{CH}_2\text{CHOHCOOH}$

86: $\text{R} = \text{CH}_2\text{COOH}$

Die strukturell ähnlich aufgebaute Substanz **85** ist bereits als Metabolit von *Malassezia furfur* beschrieben worden, einer Hefe, die die menschliche Haut besiedelt und für seborrhoische Ekzeme verantwortlich gemacht wird.¹⁰¹ Der Phenoloxidase-Inhibitor **85** wird zur Behandlung von Hyperpigmentationen sowie bei malignen und semimaligen Melanozyten angewendet. Bei Verbindung **86**, welche 1987 aus dem thermophilen Archaeobakterium *Sulfolobus acidocaldarius* isoliert werden konnte, handelt es sich um die oxidierte Form von **84**.¹⁰²

6.6.2 Ubichinon Q7

Die als gelbes Öl anfallende Substanz **87** war im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.95$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) durch eine bei 254 nm UV-löschend, sich mit Anisaldehyd in der Wärme violett anfärbende Zone sichtbar.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **87** waren sieben Methingruppen bei $\delta = 5.10 - 4.91$, zwei Methoxygruppen bei $\delta = 3.97$ und 3.96 , dreizehn Methylengruppen bei $\delta = 3.16$, $2.05 - 1.94$ sowie neun Methylgruppen bei $\delta = 1.99$, 1.71 , 1.65 , 1.56 und 1.55 zu erkennen. Aromatische Protonen konnten hingegen nicht detektiert werden. Das Spektrum wies eine große Ähnlichkeit zu dem von Ubichinon Q8 (**27**, siehe Kapitel 6.1.5) auf. Anhand der Anzahl der im ^1H -NMR-Spektrum sichtbaren Protonen wurde darauf geschlossen, dass es sich um Ubichinon Q7 (**87**) handelte.

6.6.3 SS-43405e

Verbindung **88** war im Dünnschichtchromatogramm durch die intensive orange Farbe und UV-Löschung bei 254 nm detektierbar, färbte sich jedoch mit keinem der gängigen Sprühreagenzien an. Die Substanz konnte lediglich in einer sehr geringen Ausbeute von 0.02 mg/l als gelber Feststoff isoliert werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **88** wies ein mit D_2O austauschbares Signal bei $\delta = 12.92$ sowie Resonanzen von fünf aromatischen ($\delta = 8.03$, 7.80 , 7.65 , 7.34 und 6.24) und einer aliphatischen ($\delta = 2.70$) Methingruppe auf. Weiterhin waren Signale für eine diastereotope Methylengruppe bei $\delta = 1.95$ und 1.76 sowie zwei Methylgruppen bei $\delta = 1.41$ und 0.96 detektierbar. Im ESI-Massenspektrum zeigte **88** ein Ion bei $m/z = 363 [\text{M}+\text{H}]^+$. Eine Suche in AntiBase³⁰ und anschließender Vergleich der NMR-Daten mit Spektren bekannter Verbindungen führte zur Identifizierung von **88** als SS-43405e (**88**). Es handelt sich hierbei um einen Vertreter aus der Klasse der Pluramycine, welcher antimikrobielle und antitumorale Aktivität besitzt. Letztere ist auf die selektive Ausbildung von DNA-Bindungen zurückzuführen.¹⁰³

88

6.6.4 Indolderivate

Tryptophol

Mittels EI-Massen- und ^1H -NMR-Spektroskopie konnte das farblose, UV-Licht bei 254 nm löschende und sich mit Anisaldehyd rot anfärbende Öl rasch als Tryptophol (**76**, siehe Kapitel 6.3.1) identifiziert werden.

76 **89**

2-(3-Indolyl)ethylacetat

Der farblose Feststoff **89** löschte im Dünnschichtchromatogramm UV-Licht bei 254 nm. Die Verbindung färbte sich mit Anisaldehyd rot sowie mit Ehrlichs Reagenz charakteristisch violett an, was auf das Vorliegen eines Indolderivates hindeutete.

Diese Vermutung wurde durch das ^1H -NMR-Spektrum von **89** bestätigt, welches ein für Indolgerüste typisches Signalmuster aufwies. Zusätzlich waren Signale für zwei Methylen-gruppen bei $\delta = 4.35$ und 3.10 sowie eine Acetylgruppe bei $\delta = 2.05$ zu erkennen. Erstere wurden aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen und anhand des Aufspaltungsmusters einer Ethylengruppe zugeordnet, welche an das Indolgerüst gebunden und zusätzlich mit einem Heteroatom substituiert vorliegen musste. Das EI-Massenspektrum von **89** zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 203$. Mittels dieser Informationen wurde die Verbindung als 2-(3-Indolyl)ethylacetat (**89**) identifiziert.

Substanz **89** wurde erstmal von GLOMBITZA *et al.* als Metabolit der Hefearten *Hansenula anomala* und *Torulopsis utilis* beschrieben.¹⁰⁴ Zu einem späteren Zeitpunkt konnte die Verbindung aus dem Pilz *Ceratocystis fagacearum* isoliert werden. Als biosynthetischer Ursprung wurde Tryptophan bzw. Tryptophol nachgewiesen.¹⁰⁵

6.6.5 Cyclo(Dehydroalanyl-Isoleucyl)

Verbindung **90** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.51$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch Orangefärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd sowie Ehrlichs Reagenz auf. Die Substanz konnte in Form eines farblosen Feststoffs isoliert werden.

Abbildung 55 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von Cyclo(Dehydroalanyl-Isoleucyl) (**90**).

Das ^1H -NMR-Spektrum wies zwei verbreiterte, mit D_2O austauschbare Signale bei $\delta = 10.47$ (1H) und 8.40 (1H) auf, welche auf das Vorliegen von NH- und/oder OH-Gruppen hindeuteten. Zwei im olefinischen Bereich bei $\delta = 5.18$ und 4.79 auftretende, für jeweils ein Proton integrierende Singulets konnten anhand der zugehörigen HSQC-Korrelationen einer Methylengruppe zugeschrieben werden. Darüber hinaus konnte die Resonanz einer Methingruppe bei $\delta = 3.96$ detektiert werden, welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebung mit einem Heteroatom substituiert sein musste. Zusätzlich konnten Signale für eine Methingruppe bei $\delta = 1.80$, zwei homotope Methylgruppen bei $\delta = 0.86$

sowie eine Methylengruppe bei $\delta = 1.58$ detektiert werden. Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren insgesamt acht Kohlenstoffatome zu erkennen, wobei Resonanzen bei $\delta = 166.4$ und 158.2 auf die Anwesenheit von Carbonylgruppen im Molekül hindeuteten. Die bei $\delta = 134.7$ und 98.9 auftretenden Signale konnten Kohlenstoffatomen einer Doppelbindung zugeordnet werden, welche sich in Konjugation mit einer Carbonylfunktion befinden musste. Da die massenspektroskopische Untersuchung von **90** keine auswertbaren Daten lieferte, wurde zur weiteren Strukturzuordnung auf 2D-NMR-Experimente zurückgegriffen. Deren Auswertung legte nahe, dass ein Diketopiperazin isoliert wurde, welches über eine exocyclische Doppelbindung verfügte. Ein Vergleich der NMR-Daten führte zur Verbindung Cyclo(Dehydroala-Isoleu) (**90**), welche bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe isoliert werden konnte.¹⁰⁶

90

Das Isomer von **90**, Cyclo(Dehydroala-Leu) wurde zum ersten Mal aus Kulturen von *Penicillium* sp. F70614 isoliert und zeigt einen inhibitorischen Effekt gegenüber α -Glucosidasen.¹⁰⁷ Diese Enzyme katalysieren die Spaltung der α -glycosidischen Bindung im letzten Schritt des Kohlenhydratabbaus und sind als potenzielle Therapeutika zur Behandlung von Diabetes mellitus im Gespräch.¹⁰⁸

6.6.6 2-Phenylethanol

Die farblose Flüssigkeit **91** zeigte weder beim Ansprühen mit Anisaldehyd noch mit Ehrlichs Reagenz eine Farbreaktion. Die Substanz fiel im Dünnschichtchromatogramm durch UV-Löschung bei 254 nm auf und konnte in einer Ausbeute von 0.9 mg/l isoliert werden.

Das EI-Massenspektrum von **91** zeigte das Ion höchster Masse bei $m/z = 122$. Im ^1H -NMR-Spektrum waren charakteristische Signale für einen monosubstituierten Benzolring sowie für zwei Methylengruppen bei $\delta = 3.83$ und 2.86 vorhanden. Letztere konnten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und anhand des Aufspaltungsmusters einer Ethylengruppe zugeordnet werden, welche an das aromatische System gebunden und mit einem

Heteroatom substituiert vorliegen musste. Anhand der spektroskopischen Daten wurde darauf geschlossen, dass 2-Phenylethanol (**91**) isoliert wurde.

91

Die farblose, rosenartig riechende Flüssigkeit **91** ist als Bestandteil von Rosen-, Orangeblüten-, Neroli-, Geranien- und Nelkenölen bekannt.

6.7 *Streptomyces flavogriseus* ACT7651

Der Stamm ACT7651 wurde aus litoralem Sediment, welches in der Nähe von Punta Arenas (Feuerland) gesammelt wurde, isoliert. Gemäß der 16S rRNA-Sequenzanalyse besteht eine 98 %ige Homologie zu *Streptomyces flavogriseus*, was einer vergleichsweise großen Distanz zum nächsten bekannten Verwandten entspricht. Dies könnte auf das Vorliegen einer neuen Spezies hindeuten.

6.7.1 2'-Desoxyuridin

Der weiße Feststoff **92** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.05$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch Blaufärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf.

Verbindung **92** zeigte im EI-Massenspektrum das Ion höchster Masse bei $m/z = 228$. Dem ^1H -NMR-Spektrum waren Signale bei $\delta = 7.97$ und 5.69 zu entnehmen, welche benachbarten Protonen an sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen zugeschrieben werden konnten. Zusätzlich konnten drei Methingruppen bei $\delta = 6.26$, 4.37 und 3.92 sowie zwei Methylengruppen bei $\delta = 3.74$ und 2.22 detektiert werden, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen und anhand des charakteristischen Kopplungsmusters einer Deoxyriboseeinheit zugeordnet wurden. Durch eine Suche in AntiBase³⁰ und anschließenden Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit Literaturwerten konnte **92** als 2'-Desoxyuridin (**92**) identifiziert werden.

6.7.2 2'-Desoxythymidin

Verbindung **93** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.07$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch Blaufärbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf und konnte in Form eines weißen Feststoffs isoliert werden.

Im Vergleich mit **92** fehlten im ^1H -NMR-Spektrum von **93** die Signale für Methingruppen bei $\delta = 7.97$ und 5.69 , stattdessen traten Resonanzen einer zusätzlichen Methineinheit bei $\delta = 7.80$ sowie einer Methylgruppe bei $\delta = 1.86$ auf. Das ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 265$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anhand dieser Befunde konnte **93** als 2'-Desoxythymidin (**93**) identifiziert werden. Ein Vergleich der NMR-Daten aus der Spektrensammlung bestätigte die Zuordnung.

6.7.3 2'-O-Methyluridin

Die sich im Dünnschichtchromatogramm mit Anisaldehyd nach Erhitzen grün anfärbende, UV-Licht bei 254 nm löschende Verbindung **94** zeigte im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 259$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ein Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums mit demjenigen von Verbindung **92** ließ auf das Vorliegen desselben Uracil-Grundgerüsts schließen, jedoch fehlte das Signal einer Methylengruppe bei $\delta = 2.22$. An deren Stelle traten zwei zusätzliche Resonanzen, die einer Methingruppe ($\delta = 3.87$) und einer Methoxygruppe ($\delta = 3.51$) zugeteilt wurden. Somit konnte **66** als 2'-O-Methyluridin (**94**) identifiziert werden, was durch eine Suche mit AntiBase³⁰ und Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten¹⁰⁹ bestätigt wurde. 2'-O-methylierte Ribonucleoside werden bei der ribosomalen RNA-Synthese eingebaut. Vermutlich dienen sie dazu, benachbarte Phosphodiesterbindungen vor einem Abbau durch intrazelluläre RNasen zu schützen.

6.7.4 Enterocin

Im Dünnschichtchromatogramm war **95** als bei 254 nm UV-löschende, sich mit Anisaldehyd in der Wärme blau anfärbende Zone erkennbar. Im ^1H -NMR-Spektrum konnten charakteristische Signale für einen monosubstituierten Phenylring bei $\delta = 7.84$ (d, 2H), 7.51 (t, 1H) und 7.39 (t, 2H) sowie für Protonen eines konjugierten Doppelbindungssystems bei $\delta = 6.30$ (d, $^4J = 2.2$ Hz), 5.42 (d, $^4J = 2.2$ Hz) detektiert werden. Zusätzliche waren Resonanzen für eine Methoxygruppe bei $\delta = 3.75$, vier Methingruppen bei $\delta = 4.77$, 4.64, 4.61 und 4.42 sowie eine diastereotopie Methylengruppe bei 2.53 und 1.84 vorhanden. Das ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 445$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Die Molmasse führte in Kombination mit den abgeleiteten Strukturfragmente in einer AntiBase-Suche³⁰ zur Verbindung Enterocin (**95**). Diese Substanz war bereits mehrfach in unserer Arbeitsgruppe isoliert worden. Ein Vergleich der NMR-Spektren bestätigte die Zuordnung.

6.7.5 5-Desoxyenterocin

Die bei 254 nm UV-löschende Verbindung **96** färbte sich mit Anisaldehyd nicht an. Der farblose Feststoff zeigte im ^1H -NMR-Spektrum identische Signale im Aromaten- und Doppelbindungsbereich wie Substanz **95**. Im Unterschied hierzu fehlte jedoch die Resonanz einer Methingruppe, an deren Stelle Signale einer zusätzlichen diastereotopen Methylengruppe bei $\delta = 2.83$ und 2.71 traten. Die übrigen Protonen zeichneten sich im Vergleich zu Verbindung **95** durch geringe Unterschiede in ihren chemischen Verschiebungen aus. Das ESI-Massenspektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 429$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, was einer Molmassendifferenz von 16 bezogen auf **95** entsprach. Dies legte die Vermutung einer fehlenden

Hydroxygruppe nahe. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit diesen Informationen führte zu 5-Desoxyenterocin (**96**).

Enterocin (**95**), das auch unter dem Namen Vulgamycin bekannt ist, konnte inklusive mehrerer Derivate bereits aus dem marinen Actinomyceten *Streptomyces marinus*,^{110,111} aus terrestrischen Streptomyceten sowie aus einer marinen Tunikate isoliert werden.¹¹² Alle Verbindungen zeigen antibakterielle, antifungische sowie herbizide Aktivität.¹¹³

Die Biosynthese von **95** und **96** verläuft über einen PKS II-katalysierten Mechanismus ausgehend von Benzoyl-SCoA (**97**). Diese ungewöhnliche Startereinheit wird durch oxidativen Abbau aus Phenylalanin gebildet (siehe Abbildung 56).¹¹⁴ Die dabei als Zwischenstufe vorkommende Zimtsäure konnte im Rahmen dieser Arbeit in Form des Säureamids **99** ebenfalls isoliert werden. Verbindung **97** wird über sieben Kettenverlängerungsschritte mit Malonyl-SCoA in das lineare Octaketid **98** überführt, aus welchem mittels dreier enzymkatalysierter Reaktionen unter Beteiligung einer Favorskii-Umlagerung Enterocin (**95**) hervorgeht.¹¹⁵ Das als Vorstufe auftretende 5-Desoxyenterocin (**96**) konnte folglich auch als Sekundärmetabolit des Stammes ACT2298 gefunden werden. Bei dem für die Produktion von **95** verantwortlichen Biosynthesegencluster handelt es sich um das erste bei marinen Organismen nachgewiesene Beispiel einer Polyketidsynthase vom Typ II.^{116,117}

Abbildung 56 Biosyntheseweg für die Bildung von Enterocin und davon abgeleiteten Derivaten.¹¹⁸ EncP: Desaminase Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, EncH: Zimtsäure-CoA-Ligase, EncI: Zimtsäure-CoA-Hydratase, EncJ: 3-Keto-3-phenylpropionyl-CoA-Thiolase, EncABCD: minimale PKS, EncL: aromatische Akyltransferase, EncM: Oxygenase, EncK: Methyltransferase, EncQ: Ferredoxin, EncR: Cytochrom-P-450-Hydroxylase.

6.7.6 *trans*-Zimtsäureamid

Im Rohextrakt fiel **99** durch UV-Löschung bei 254 nm und hellrote Farbreaktion beim Besprühen mit Anisaldehyd sowie Gelbfärbung mit Ehrlichs Reagenz auf.

Im ^1H -NMR-Spektrum waren zwei Dubletts bei $\delta = 7.57$ und 6.74 detektierbar, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und der zugehörigen Kopplungskonstante ($^3J = 15.7$ Hz) zu einer *trans*-ständigen Doppelbindung gehören mussten. Weiterhin waren Signale für einen monosubstituierten Phenylring zu erkennen. Das EI-Massenspektrum zeigte ein Ion höchster Masse bei $m/z = 146$ und das Fragmentierungsmuster für Zimtsäureamid (**99**). Ein Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten bestätigte diesen Befund.

99

6.7.7 Venturicidin A

Die nicht von XAD-16 adsorbierte wässrige Phase lieferte nach Extraktion mit Essigester und chromatographischer Trennung farblosen Feststoff. Verbindung **100** fiel im Dünnschichtchromatogramm durch schwache UV-Löschung bei 254 nm und intensive dunkelblaue Färbung beim Besprühen mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz auf.

Die Substanz zeigte im ^1H -NMR-Spektrum ein komplexes Signalmuster im Bereich $\delta = 5.58 - 0.82$, während dem ^{13}C -NMR-Spektrum die Existenz von 41 Kohlenstoffatomen im Molekül entnommen werden konnte. Im ESI-Massenspektrum war ein Ion bei $m/z = 772$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ erkennbar. Diese Informationen deuteten auf das Vorliegen eines Makrolid-Grundgerüsts hin. Eine Datenbanksuche in AntiBase³⁰ ergab, dass das aus einem 20-gliedrigen Lactonring aufgebaute, mit einem Zucker und einer C_{11} -Alkyl-Seitenkette substituierte Antibiotikum Venturicidin A (**100**) isoliert wurde. Ein Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.¹¹⁹

100

Substanz **100** wurde zum ersten Mal aus Kulturen des Stammes *Streptomyces aureofaciens* isoliert.¹²⁰ Bei diesem antifungischen Makrolid handelt es sich ebenso wie bei der strukturell nahe verwandten Verbindung X-14952B (**106**) um ein Glykosid der 3-*O*-Carbamoyl-2-desoxy-D-rhamnose.

7 Untersuchungen ausgewählter Stämme aus anderen Habitaten

7.1 *Streptomyces* sp. GW24/1811

Der nach dreitägiger Kultivierung erhaltene Rohextrakt des aus Malta stammenden terrestrischen Stammes *Streptomyces* sp. GW24/1811 wies im Dünnschichtchromatogramm eine Reihe farbloser Zonen auf. Die Isolierung der entsprechenden Reinsubstanzen gelang aufgrund zu geringer Substanzmengen jedoch nicht. In einem zweiten, sechstägigen Kultivierungsversuch zeigte der erhaltene Rohextrakt im Dünnschichtchromatogramm schließlich mehrere orange und violette Zonen, welche sich bei Behandlung mit 2 N NaOH blau bzw. braun verfärbten. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt hohe Aktivitäten gegen *Chlorella vulgaris*, Nematoden sowie Salinenkrebse.

7.1.1 Hopen-B

Die farblose kristalline Verbindung **101** gab sich im Dünnschichtchromatogramm nach Anfärbung mit Anisaldehyd als blaue Zone zu erkennen. Sie zeigte weder bei 254 nm noch 366 nm UV-Aktivität und zeichnete sich durch geringe Polarität aus, welche sich in einem R_f -Wert von 0.98 bei Verwendung von $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 als Laufmittel widerspiegelt.

Das ^1H -NMR-Spektrum wies starke Signalüberlappung im aliphatischen Bereich zwischen $\delta = 0.7$ bis 1.8 auf. Darüber hinaus konnten Resonanzen für eine Methingruppe bei $\delta = 2.66$ sowie eine Methylengruppe im Doppelbindungsbereich bei $\delta = 4.76$ detektiert werden. Im APT-NMR-Spektrum wurden 30 Signale angezeigt, die sechs Methylgruppen, sechs Methingruppen sowie achtzehn Methylen- bzw. quartären Kohlenstoffatomen zugeordnet werden konnten. Darunter befanden sich Resonanzen eines quartären Kohlenstoffatoms bei $\delta = 148.8$ sowie einer Methylengruppierung bei $\delta = 110.1$, welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebung sp^2 -hybridisiert vorliegen mussten. Im EI-Massenspektrum war das Ion höchster Masse bei $m/z = 410$ erkennbar. Eine Suche in AntiBase³⁰ lieferte Hopen B (**101**) als Strukturvorschlag. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten den Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.¹²¹

101

Bei den Triterpenen handelt es sich um eine Gruppe von Naturstoffen mit hoher struktureller wie funktioneller Diversität. Sie sind in die große Klasse der Isoprenoide eingegliedert, wobei ihre Struktur auf einem C₃₀-Grundgerüst basiert. Von ihnen abgeleitet sind die tetracyclisch aufgebauten Sterole, welche in fast allen eukaryotischen, jedoch sehr selten in prokaryotischen Zellen biosynthetisiert werden. Mit Ausnahme der Archae¹²² findet man bei zahlreichen Bakterienarten stattdessen pentacyclische Triterpenoide, die der Hopan-Reihe zuzuordnen sind.^{123,124} Diese für den Primärmetabolismus bedeutenden Verbindungen stabilisieren die Phospholipid-Doppelschichten in den Plasmamembranen. Bei Bradyrhizobien, einer an Wurzeln von Hülsenfruchtpflanzen symbiotisch lebenden Bakterienart¹²⁵, besitzen Hopanoide eine zusätzliche Funktion. Hier werden sie zum Aufbau einer Diffusionsbarriere genutzt, welche den Schutz des oxidationsempfindlichen Nitrogenase-Komplexes vor Sauerstoff sicherstellt.¹²⁶

7.1.2 Poly(β -hydroxybuttersäure)

Der weiße polymerartige Feststoff **102** konnte im Dünnschichtchromatogramm weder durch UV-Licht noch mittels Sprühreagenzien sichtbar gemacht werden. Die Substanz löste sich gut in Dichlormethan sowie Chloroform, nicht jedoch in Methanol und Aceton.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte Signale für eine Methylgruppe bei $\delta = 1.24$, eine diastereotopie Methylengruppe bei $\delta = 2.59$ und 2.44 sowie eine Methingruppe bei $\delta = 5.23$. Letztere musste aufgrund der chemischen Verschiebung an ein Heteroatom gebunden sein. Im ¹³C-NMR-Spektrum konnte zusätzlich eine Carbonylgruppe bei $\delta = 169.1$ detektiert werden. Ein Vergleich der NMR-Spektren mit denjenigen von Poly(β -hydroxybuttersäure) (**102**), eines in unserem Arbeitskreis häufig isolierten Polymers, führte zur Identifizierung der Verbindung. Das ESI-Massenspektrum wies keine signifikanten Ionen im Bereich bis $m/z = 2000$ auf, was auf das Vorliegen langkettiger Poly(β -hydroxybuttersäure)-Moleküle hindeutete.

102

Polyhydroxysäuren stellen neben Polyisoprenoiden, Polypeptiden, Polysacchariden und Polynucleotiden eine weitere Gruppe weit verbreiteter Biopolymere dar. P(3-HB) (**102**) wurde erstmals 1925 von Lemoigne beschrieben,¹²⁷ der dieses Polymer zu einem späteren Zeitpunkt aus *Bacillus megaterium* isolieren konnte.¹²⁸ Polyhydroxysäuren werden von Mikroorganismen bei Nährstoffmangel in Gegenwart von Kohlenstoff-Quellen unter Energieverbrauch gebildet.¹²⁹ Infolge ihres hohen Molekulargewichts und der damit einhergehenden Schwerlöslichkeit erzeugen Polyhydroxysäuren keinen osmotischen Druck, was zu ihrer Nutzung als mikrobielle Reservestoffe geführt hat.¹³⁰ Neben diesen als sPHB (s für „storage“) bezeichneten Biopolymeren wurden in neuerer Zeit Vertreter einer als cPHB (c für „channel-forming“) beschriebenen Gruppe gefunden, welche sich durch geringe Molekulargewichte (MW $\approx$ 1300 Da) auszeichnen.¹³¹

7.1.3 Komodochinon A

Verbindung **103** gab sich im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.42$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) durch eine orange Eigenfarbe, UV-Löschung bei 254 nm sowie Fluoreszenz bei 366 nm zu erkennen. Eine Farbreaktion beim Besprühen mit Anisaldehyd blieb aus.

Das ESI-Massenspektrum von **103** zeigte ein Ion bei $m/z = 530$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, was auf eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen im Molekül schließen ließ. Im ^1H -NMR-Spektrum war ein mit D_2O austauschbares Signal $\delta = 8.40$ erkennbar, welches für zwei Protonen integrierte. Weiterhin fanden sich Resonanzen für drei aromatische Methingruppen bei $\delta = 7.95$, 7.84 und 7.74, sechs weitere Methingruppen bei $\delta = 5.78$, 4.97, 4.18, 3.98, 3.83 und 3.23, zwei diastereotope Methylengruppen bei $\delta = 2.97$, 2.57, 2.02 und 1.83 sowie vier homotope Methylengruppen bei $\delta = 2.57$, 2.58, 1.28 und 1.04. Aufgrund der geringen Substanzmenge war die Messung eines ^{13}C -NMR-Spektrums nicht möglich. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit den beschriebenen Informationen lieferte Komodochinon A (**103**) als Strukturvorschlag. Ein Vergleich der NMR-Daten ergab jedoch keine zufriedenstellende Übereinstimmung, wobei Unterschiede vor allem im Bereich der chemischen Verschiebung der Zuckerprotonen lagen. Ein MS^n -Experiment zeigte allerdings, dass die

Summenformel der Zuckerreste identisch war. Dies deutete darauf hin, dass dasselbe Aglykon- und Zuckergerüst wie bei Verbindung **103** vorlag, diese jedoch an anderer Position miteinander verknüpft waren.

103

Komodochinon A (**103**) besteht aus einem Anthracyclin-Gerüst, welches mit einem Aminozucker am D-Ring substituiert ist. Untersuchungen ergaben, dass **103** die Differenzierung neuronaler Zellen induziert kann.¹³²

7.1.4 Komodochinon B

Der orange Feststoff **104** wies identisches UV- und Anfärbeverhalten, jedoch geringere Polarität ($R_f = 0.42$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) als Verbindung **103** auf.

Das ESI-Massenspektrum von **104** zeigte ein Ion bei $m/z = 379$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Im ^1H -NMR-Spektrum waren drei mit D_2O austauschbare Signale bei $\delta = 13.40$, 12.06 und 5.28 erkennbar. Darüber hinaus waren Resonanzen für drei aromatischen Protonen bei $\delta = 7.81$, 7.75 und 7.37 , die einem 1,2,3-trisubstituierten Phenylring zugeschrieben wurden, eine Methin-Gruppe bei $\delta = 4.94$, zwei diastereotope Methylengruppen bei $\delta = 3.02$, 2.53 , 2.05 und 1.84 sowie eine Methylgruppe bei $\delta = 1.32$ detektierbar. Dem ^{13}C -NMR-Spektrum waren neunzehn Signale zu entnehmen, von denen zwei im Bereich von Carbonylkohlenstoffatomen ($\delta = 189.7$ und 185.7) lagen. Mit den vorliegenden Daten wurde eine Suche in AntiBase³⁰ durchgeführt, welche Komodochinon B (**104**) als Strukturvorschlag lieferte. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten bestätigte diese Zuordnung.

104

Komodochinon A (**103**) und dessen Aglykon Komodochinon B (**104**) konnten erstmals im Jahr 2003 aus einem marinen Streptomyceten isoliert werden.¹³²

7.2 *Streptomyces* sp. GW16/3128

Agarplatten, Mycel und Kulturbrühe des terrestrischen Stammes *Streptomyces* sp. GW16/3128 waren tief schwarz gefärbt, nach Extraktion der Kulturbrühe mit Essigester ergab sich jedoch ein hellgelber Rohextrakt. Im Dünnschichtchromatogramm fiel eine Zone auf, die schwach UV-löschend war und sich mit Anisaldehyd schwarz anfärbte. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt sehr hohe Aktivitäten gegen *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* sowie *Scenedesmus subspicatus*.

Eine Nährmedienvariation wurde durchgeführt, da der Stamm in M₂-Medium kein ausreichendes Wachstum aufwies. Es zeigte sich, dass die Verwendung eines Fleischextrakt-Mediums hier deutliche Vorteile brachte. Zur Animpfung dienten flüssige Vorkulturen, da direkte Animpfung mittels gut bewachsener Agar-Stückchen zu keinem zufriedenstellenden Wachstum des Stammes führte.

7.2.1 Glykolipide

Der farblose Feststoff **105** zeigte im Dünnschichtchromatogramm sehr schwache UV-Löschung und färbte sich mit Anisaldehyd schwarz an. Verbindung **105** konnte in einer Ausbeute von 0.3 mg/l isoliert werden.

Im ESI-Massenspektrum trat das Ion höchster Intensität bei $m/z = 779$ $[M+Na]^+$ auf. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte Signale für acht Methingruppen bei $\delta = 5.33, 5.24, 4.79, 3.60, 3.56, 3.38$ und 3.30 sowie drei diastereotope Methylengruppen bei $\delta = 4.47, 4.20, 3.86, 3.78, 3.66$ und 3.62 . Im Bereich von $\delta = 2.4 - 0.9$ waren zusätzlich Resonanzen für Acylreste zu erkennen, welche unter Einbeziehung der Integralhöhen auf das Vorliegen zweier

getrennter Ketten hindeuteten. Darüber hinaus war ein Signal bei $\delta = 2.02$ detektierbar, welches aufgrund seiner chemischen Verschiebung und Intensität zwei an ein Doppelbindungssystem gebundenen Methylengruppen zugeschrieben werden konnten. Im ^{13}C -NMR-Spektrum war die genaue Anzahl der Kohlenstoffsignale schwer zu ermitteln, da im Bereich der Methylenresonanzen eine starke Signalüberlappung zu beobachten war. Diese konnte jedoch mittels einer ESI-Massenhochauflösung bestimmt werden, aus der sich eine Summenformel von $\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{O}_{10}$ ergab. Die Auswertung der NMR-Daten legte die Vermutung nahe, dass Verbindung **105** aus einem Zuckergerüst und zwei Acylketten aufgebaut ist. Mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren konnten die erhaltenen Strukturfragmente verknüpft und die Vermutung bestätigt werden. Die genaue Position der Doppelbindung in einer der Acyl-Seitenketten des Glycolipids **105** konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden.

Abbildung 57 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CD_3OD) von **105**.

105

Glykolipide sind bei photosynthetisch aktiven Eukaryoten¹³³ und Prokaryoten¹³⁴ weit verbreitet. In biologischen Untersuchungen zeigten Glykolipide antitumorale,¹³⁵ entzündungshemmende,¹³⁶ phycotoxische,¹³⁷ hemolytische¹³⁸ sowie antivirale¹³⁹ Aktivität.

7.3 *Streptomyces* sp. GW12/1492

Der intensiv gelb gefärbte Rohextrakt des terrestrischen Stammes *Streptomyces* sp. GW12/1492 zeigte im Dünnschichtchromatogramm zwei auffällige Zonen. Die unpolarere Zone besaß eine gelbe Eigenfarbe und färbte sich mit herkömmlichen Sprühreagenzien nicht an, während die polarere Zone farblos war und beim Besprühen mit Anisaldehyd sowie Ehrlichs Reagenz eine dunkelblaue Farbreaktion einging. Darüber hinaus konnte im Dünnschichtchromatogramm auf das Vorhandensein einer großen Menge an Fettsäuren geschlossen werden, welche sich durch nicht UV-löschende, mit Anisaldehyd blau anfärbbare Zonen zu erkennen gaben. Im biologischen Screening zeigte der Rohextrakt antibakterielle Aktivität.

7.3.1 X-14952B

Der Hauptmetabolit **106** des Stammes GW 12/1492 wurde in einer Ausbeute von 100 mg/L aus einem 20 L-Fermentationsansatz erhalten. Die Verbindung fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.28$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) durch UV-Löschung bei 254 nm sowie durch intensive dunkelgrüne Färbung beim Besprühen mit Anisaldehyd auf.

Der hellgelbe Feststoff **106** zeigte im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 802$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Das ^1H -NMR-Spektrum wies ein sehr komplexes Signalmuster auf, während im ^{13}C -NMR-Spektrum die Resonanzen von 42 Kohlenstoffatomen sichtbar waren. Anhand dieser Informationen wurde das Vorliegen eines Makrolid-Grundgerüsts vermutet. Eine Datenbanksuche in AntiBase³⁰ ergab, dass das 20-gliedrige Makrolidlacton X-14952B (**106**) isoliert wurde. Ein Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.¹⁴⁰

106

Verbindung **106** wurde erstmals 1985 von OMURA *et al.* als Sekundärstoff eines Streptomyceten-Stammes isoliert. Die Substanz besitzt antibakterielle und antifungische Aktivität. Ähnliche Wirkungen konnten auch bei den strukturell verwandten Makroliden Concanamycin,¹⁴¹ Virustomycin A¹⁴² und Bafilomycin¹⁴³ gefunden werden.

7.3.2 Cervinomycin A₂

Verbindung **107** wurde als Hauptkomponente einer Mischung unterschiedlicher gelber Substanzen, welche in einer Ausbeute von insgesamt 50 mg/L erhalten wurden, isoliert. Die Auftrennung der übrigen Substanzen war aufgrund der geringen Löslichkeit nicht möglich. Verbindung **107** zeigte UV-Löschung bei 254 nm, war mit den üblichen Sprühreagenzien jedoch nicht anfärbbar.

Das ESI-Massenspektrum von **107** wies ein Ion bei $m/z = 550$ $[M+Na]^+$ auf. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren Signale für eine NH-/OH-Gruppe bei $\delta = 13.96$, fünf aromatische Methin-gruppen bei $\delta = 8.19, 7.96, 7.60, 7.21$ und 7.14 sowie drei diastereotope Methylengruppen bei $\delta = 4.25, 4.04, 3.74, 3.32$ und 3.23 vorhanden. Weiterhin konnten Resonanzen für zwei Methoxygruppen bei $\delta = 4.00$ sowie eine Methylgruppe bei $\delta = 1.41$ detektiert werden. Dem $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum konnten 29 Kohlenstoffsignale entnommen werden. Eine Suche in AntiBase³⁰ mit den vorliegenden Informationen lieferte Cervinomycin A₂ (**107**) als Strukturvorschlag. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit Literaturwerten bestätigte die Zuordnung.¹⁴⁴

107

Die in allen herkömmlichen Lösungsmitteln schwerlöslichen Cervinomycine sind gegen Anaerobier und Mycoplasmen wirksame Antibiotika, welche erstmals aus Kulturen von *Streptomyces cervinus* isoliert wurden.¹⁴⁵ Für die medizinische Anwendung wird gegenwärtig die acetylierte Form von Verbindung **107** untersucht, welche sich durch bessere Löslichkeit und eine geringe Toxizität auszeichnet. Cervinomycin A₂ (**107**) weist hohe Aktivität gegen die Problemkeime *Clostridium difficile*, *Reptococcus variabilis* und *Streptococcus mutans* auf.¹⁴⁶

7.3.3 Sonstige Metaboliten

Hexadecan- und Heptadecansäure

Das zweite Hauptmetabolit **108** des Stammes GW 12/1492 fiel im Dünnschichtchromatogramm durch blaue Anfärbung mit Anisaldehyd auf. Substanz **108** konnte in Form eines farblosen Öls in einer Ausbeute von 100 mg/L isoliert werden. Anhand der ¹H-NMR- und EI-Daten wurde die Verbindung **108** als eine Mischung aus Hexa- und Heptadecansäure (**108**) identifiziert.

108

Anthranilsäureamid und Phenyllessigsäure

Der farblose Feststoff **109** zeigte im Dünnschichtchromatogramm eine bei 254 nm UV-löschende sowie bei 366 nm hellblau fluoreszierende Zone, welche beim Besprühen mit

Anisaldehyd bzw. Ehrlichs Reagenz Gelbfärbung einging. ^1H -NMR- und EI-Massenspektrum bestätigten die Vermutung, dass es sich bei Verbindung **109** um Anthranilsäureamid (**109**) handelte.

Der UV-löschende, farblose Feststoff **61** wies im ^1H -NMR- und EI-Massenspektrum das für Phenyllessigsäure (**61**) charakteristische Signalmuster auf. Substanz **61** war zuvor bereits als Metabolit des Actinomyceten-Stammes T421-A isoliert worden (siehe Kapitel 6.4.2).

7.4 *Streptomyces* sp. GW51/456

Eine chromatographische Aufreinigung der Fraktionen erwies sich als äußerst schwierig, da die zu trennenden Substanzen an Kieselgel wie an Sephadex adsorbiert blieben und auch durch Verwendung verschiedener Lösungsmittel und –gemische nicht eluiert werden konnten.

7.4.1 Thiothymin

Der weiße Feststoff **110** zeigte im Dünnschichtchromatogramm eine auffällige UV-Lösung bei 254 nm.

Dem ^1H -NMR-Spektrum konnten lediglich zwei Singulets bei $\delta = 7.84$ sowie 2.31 entnommen werden, welche einer Methin- bzw. einer Methylgruppe zugeordnet wurden. Das DCI-MS-Spektrum zeigte ein Ion bei $m/z = 143$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anhand eine Suche in AntiBase³⁰ und anschließendem Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit Literaturwerten konnte **110** als Thiothymin (**110**) identifiziert werden.

110

7.4.2 β -Indomycinon

Die orange Substanz **111** fiel im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.75$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) durch Eigenfarbe und UV-Löschung bei 254 nm auf. Die nach Behandlung mit Natronlauge einsetzende Blaufärbung legte die Vermutung nahe, dass es sich bei **111** um ein Chinon-Derivat mit chelierter Hydroxygruppe handelt.

Im ^1H -NMR-Spektrum war anhand der Integralverhältnisse erkennbar, dass ein Gemisch aus zwei Substanzen vorliegen musste. Mittels eines anschließenden LC-MS-Experiments konnten zwei Isomere (**111** und **112**) mit einer Molmasse von 404 identifiziert werden, welche in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

Bei den ^1H -NMR-Signalen der Hauptkomponente handelte es sich um zwei mit D_2O austauschbare Resonanzen bei $\delta = 12.84$ und 2.76 , zwei Singulets bei $\delta = 8.06$ und 6.51 sowie charakteristische Resonanzen für einen 1,2,3-trisubstituierten Aromaten bei $\delta = 7.81$, 7.67 und 7.34 . Im aliphatischen Bereich waren zwei Methingruppen bei $\delta = 5.70$ und 5.35 , eine diastereotope Methylengruppen bei $\delta = 2.90$ und 2.75 sowie drei Methylgruppen bei $\delta = 1.68$, 1.62 und 3.02 zu erkennen. Eine Suche in AntiBase³⁰ lieferte β -Indomycinon (**111**) als Strukturvorschlag für **111**. Ein Vergleich des ^1H -NMR-Daten mit einem in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Referenzspektrum bestätigte die Zuordnung. β -Indomycinon (**112**) gehört zur Substanzklasse der Pluramycine. Diese verfügen über die Eigenschaft, selektiv an DNA binden zu können, worauf ihre antimikrobielle und antitumorale Aktivität zurückgeführt wird.¹⁴⁷

111

7.4.3 Saptomycin A

Ein Vergleich der ^1H -NMR-Signale der Minderkomponente **112** mit denjenigen von **111** deutete auf das Vorliegen einer ähnlichen Struktur mit demselben Anthrachinon-Grundgerüst hin. Es fehlten jedoch im Unterschied zu **111** die Signale der Methylengruppe, stattdessen fanden sich zusätzliche Resonanzen für zwei Methingruppen bei $\delta = 5.00$ und 2.97 . Weiterhin war auffällig, dass sich die chemische Verschiebung der aliphatischen Doppelbindungsprotonen sowie der Methylgruppen im Vergleich zu **111** unterschied. Zusätzlich verfügte eine der Methylgruppe über ein verändertes Aufspaltungsmuster. Eine Suche in AntiBase³⁰ nach einer Verbindung mit demselben Anthrachinon-Gerüst und der gleichen Molmasse wie **111** führte zu Saptomycin A (**112**). Ein Vergleich der ^1H -NMR-Daten von **112** mit einem Referenzspektrum bestätigte, dass es sich bei **112** um Saptomycin A handelt.

112

Saptomycin A (**112**) wurde erstmals im Jahr 1993 von ABE *et al.* als Stoffwechselprodukt von *Streptomyces* sp. HP530 isoliert. Die Saptomycine verfügen über antimikrobiotische Eigenschaften und zeigen Antitumor-Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien.¹⁴⁸

7.5 *Streptomyces* sp. Mei 24

Der nach sechstägiger Kultivierung erhaltene Rohextrakt des Stammes Mei 24 zeichnete sich durch eine grünliche Färbung aus. Im Dünnschichtchromatogramm waren zahlreiche bei Tageslicht farbige Zonen sichtbar. Nach Besprühen mit Anisaldehyd zeigte sich eine ausgedehnte, blau angefärbte Zone, welche aufgrund fehlender UV-Löschung bei 254 nm auf das Vorliegen mehrerer Fettsäuren hindeutete. Nach deren Abtrennung verblieb lediglich eine sehr geringe Menge an Rohextrakt, aus der nur mühsam einige weitere Metaboliten isoliert werden konnten.

7.5.1 4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion

Der rote Feststoff **113** bildete im Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.70$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) eine bei 254 nm UV-löschende, orange Zone, die sich beim Versetzen mit 2 N NaOH rot verfärbte. Nach Besprühen mit Ehrlichs Reagenz stellte sich eine orange Färbung ein.

Im ESI-Massenspektrum von **113** konnte ein Ion bei $m/z = 203$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ detektiert werden. Dem ^1H -NMR-Spektrum waren Signale für ein OH-/NH-Gruppe bei $\delta = 5.79$, zwei aromatische Methingruppen bei $\delta = 9.00$ und 5.70 sowie drei Methylgruppen bei $\delta = 2.90$, 2.73 und 2.68 zu entnehmen. Eine Datenbanksuche in AntiBase³⁰ führte zur Verbindung 4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion (**113**), welche bereits mehrfach in unserem Arbeitskreis isoliert wurde.^{149,150} Ein Vergleich der spektroskopischen Daten bestätigte die Zuordnung. In der Literatur war **113** bislang lediglich als Syntheseprodukt, nicht jedoch als Naturstoff bekannt.¹⁵¹

113

114

7.5.2 4-Methylamino-7,8-dimethyl-isoquinolin-3,6-dion

Die rote Verbindung **114** zeigte im Dünnschichtchromatogramm einen etwas unterschiedlichen R_f -Wert ($R_f = 0.67$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) im Vergleich mit **113**. Beide Verbindungen besaßen jedoch identisches UV- und Anfärbeverhalten.

Im ESI-Massenspektrum zeigte **114** ein Ion bei $m/z = 217$ $[M+H]^+$ und wies somit eine um vierzehn Einheiten geringere Masse als **113** auf. Auch das ^1H -NMR-Spektrum fiel durch große Ähnlichkeit zu demjenigen von **113** auf. Es fehlte jedoch das Signal einer Methylgruppe, stattdessen trat die Resonanz einer zusätzlichen aromatischen Methingruppe bei $\delta = 7.75$ auf. Letztere musste aufgrund der chemischen Verschiebung an das Kohlenstoff in Position 7 gebunden sein.

115

Das strukturell ähnlich aufgebaute Isochinolinchinon Cribrostatin 1 (**115**) konnte aus dem blauen marinen Schwamm *Cribrochalina* sp. isoliert werden. Verbindung **115** wies eine biologische Aktivität gegenüber der P388 lymphozytären Leukämie-Zelllinie auf.¹⁵²

7.5.3 Sonstige Metaboliten

3-Indolylcarbonsäure und 3-Hydroxyacetylindol

Im Dünnschichtchromatogramm waren zwei UV-löschende Zonen auffällig, welche nach Besprühen mit Ehrlichs Reagenz eine violette Farbreaktion eingingen. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Indolderivate handelte. Ein Vergleich der EI-Massen- und ^1H -NMR-Spektren mit denjenigen der Verbindungen **16** und **17** ergab, dass 3-Indolylcarbonsäure (**16**) bzw. 3-Hydroxyacetylindol (**17**) isoliert wurde.

Uracil und *p*-Hydroxybenzoesäure

Die Substanzen **18** und **19** waren im Dünnschichtchromatogramm als UV-löschende Zonen im polaren Bereich erkennbar. Die nach Auftrennung erhaltenen farblosen Feststoffe konnten anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften rasch als Uracil (**18**) und *p*-Hydroxybenzoesäure (**19**) identifiziert werden.

8 Zusammenfassung

Mikroorganismen nehmen einen großen Einfluss auf ökologische und symbiotische Wechselwirkungen in Lebensgemeinschaften, der durch Sekundärmetabolite mit oft einzigartiger Struktur und biologischer Aktivität moderiert wird. Bei den außergewöhnlichen Habitaten Arktis und Antarktis handelt es sich um in diesem Kontext bisher nur wenig untersuchte Ökosysteme. Um Grundlagen zu einem besseren Verständnis der ökologischen und symbiotischen Zusammenhänge zu liefern, über welche Lebensgemeinschaften bei derart unwirtlichen Umweltbedingungen interagieren, war die Untersuchung polarer mikrobieller Sekundärmetaboliten Thema der vorliegenden Arbeit.

Die zu untersuchenden polaren Bakterienstämme wurden vom Alfred-Wegener-Institut (Bremerhaven) zur Verfügung gestellt. Nach einem biologischen und chemischen Screening von mehr als 700 Rohextrakten wurden besonders auffällige Stämme ausgewählt (ca. 20 %), von denen anschließend eine Auswahl am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (Kaiserslautern) im größeren Maßstab kultiviert wurde. Da die erhaltenen Mengen an Rohextrakten sehr gering und die Gemische sehr komplex zusammengesetzt waren, erwies sich deren chromatographische Aufarbeitung als recht aufwendig.

Um ein effizientes und zuverlässiges chemisches Screening zu ermöglichen, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit die HPLC-UV-ESI-MS/MS-Kopplung als geeignete Methode für eine verlässliche Dereplikation weiterentwickelt, die mit dem Programm MS-Manager von ACDLabs eine schnelle und verlässliche Wiedererkennung bekannter Substanzen möglich machte.

Aufgrund der ungewissen Ergebnislage, welche die Bearbeitung polarer Bakterienstämme liefern würde, wurden zusätzlich terrestrische und marine Streptomyceten-Stämme, welche vom Institut für Bodenkunde (Lohra-Kirchvers) und der Fachhochschule Ostfriesland (Emden) bereitgestellt wurden, im biologischen und chemischen Screening untersucht. Fünf auffällige Stämme wurden in größerem Maßstab kultiviert und die gebildeten Sekundärstoffe isoliert.

HPLC-UV-ESI-MS/MS-Datenbank und ESI-Fragmentierung

Die Verwendung der HPLC-UV-ESI-MS/MS-Kopplung ermöglichte eine Trennung der in Rohextrakten bzw. Fraktionen erhaltenen Verbindungen bei gleichzeitiger Messung ver-

schiedener stoffspezifischer Eigenschaften. Die hier experimentell zugänglichen Daten wie Retentionszeit, UV-Spektrum, Molmasse und Fragmentierungsmuster erwiesen sich in den meisten Fällen als ausreichend für eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Substanzen. Zur Erstellung der Datenbank wurden bisher etwa 250 bakterielle Naturstoffe aus unserer Arbeitsgruppe herangezogen, wobei sämtliche massenspektrometrischen Daten sowohl im positiven als auch im negativen Modus detektiert wurden. Es zeigte sich jedoch, dass aufgrund der hohen Diversität an Naturstoffstrukturen und der messtechnischen Begrenzungen des Massenspektrometers nicht alle Verbindungen auswertbar waren. Als limitierende Faktoren erwiesen sich hier vor allem mangelnde ES-Ionisierbarkeit und/oder fehlende UV-Absorption.

Um erste strukturelle Rückschlüsse über Verbindungen erhalten zu können, welche neu bzw. noch nicht in der Datenbank implementiert sind, erwies sich die Aufklärung der charakteristischen, bisher nur wenig untersuchten ESI-Fragmentierungswege als vielversprechend. Dies konnte am Beispiel zweier oft isolierter Verbindungsklassen, den Actinomycinen (Na^+ -Addukte) und Diketopiperazinen (H^+ -Addukte), gezeigt werden. Bei den Actinomycinen war eine komplette Zuordnung der Aminosäure-Sequenzen auf der Basis der gemessenen MS/MS-Spektren möglich, was dieses Verfahren anderen Methoden überlegen macht.

Arktische und Antarktische Bakterien

Der aus dem Darminhalt der antarktischen Krillart *Euphausia superba* isolierte psychrotolerante Stamm *Pseudoalteromonas* sp. T268 produzierte Glutarsäure, Diketopiperazine und Fettsäuren als Hauptmetabolite. Neben Isatin (**19**) konnten auch einige seiner Derivate isoliert werden, nämlich 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (**20**) und 3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol (**21**). Verbindung **21** war bisher in der Literatur weder als Syntheseprodukt noch als Naturstoff beschrieben worden.

19 **20** R = CH₃**21** R = C₂H₅

Als weitere Verbindungsklasse konnten Ubichinone aus dem Rohextrakt von Stamm T268 erhalten werden. Neben Ubichinon Q8 (**27**) wurden zusätzlich Ubichinon KQ2 (**30**) und Ubichinon KQ5 (**28**) isoliert. Die Verbindungen **28** und **30** stellen Vertreter eines neuen Typs von Prenylchinonen dar, deren Biosynthese in der vorliegenden Arbeit diskutiert wird.

27 $n = 7$ **28** $n = 4$ **30** $n = 1$

Der Rohextrakt des aus dem arktischen Meereis isolierten psychrotoleranten Stammes *Salegentibacter holothuriorum* T436 war intensiv gelb gefärbt. Es konnten daraus neben mehreren einfachen niedermolekularen Substanzen 24 aromatische Nitroverbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen isoliert werden. Zehn dieser Verbindungen waren bisher nicht literaturbekannt, drei Substanzen lediglich als Syntheseprodukte beschrieben. Größtenteils handelte es sich um substituierte Mononitro- sowie Dinitrophenole. Interessanterweise wurden auch Nährmedienbestandteile in nitrierter Form gefunden, und zwar 6-Nitro-cyclo(tyrosylprolyl) (**55**), 3'-Nitro-daïdzein (**56**) und 3',5'-Dinitro-genistein (**57**).

55 **56** **57**

Stamm T436 erwies sich zudem als Produzent mehrerer nitrierter Indol-Derivate. So konnten die Verbindungen 2-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**58**), 6-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**59**) und 7-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**60**) isoliert werden, welche sich lediglich in der Position der Nitro-Substitution unterscheiden. Bei den Verbindungen Salegentipyrrol A (**61**) und B (**62**) handelt es sich um Vertreter einer Substanzklasse, die biosynthetisch wahrscheinlich aus *N*_β-Acetyltryptamin durch Ringschluss und anschließende elektrophile Addition eines Nitroniumions entsteht. Alle nitrierten Indol-Derivate von Stamm T436 waren bisher unbekannt. Weitere Untersuchungen am Stamm T436 sind notwendig, um den biosynthetischen Ursprung der Nitrogruppen, für den verschiedene Mechanismen in Frage kommen, zu klären.

58 $R_1 = \text{NO}_2$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{H}$

59 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{NO}_2$; $R_3 = \text{H}$

60 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{NO}_2$

61 $R = \text{H}$

62 $R = \text{NO}_2$

Im Zuge der HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Fragmentierungswege der isolierten aromatischen Nitroverbindungen aufgeklärt. Im negativen Modus konnte in den meisten Fällen eine NO- sowie HNO₂-Abspaltung detektiert werden, während im positiven Modus bevorzugt die Eliminierung von NO₂ auftrat.

Der aus arktischen Pinguinexkrementen stammende, psychrophile Stamm T406 wurde bei einer Temperatur von 4 °C kultiviert. Aus dem erhaltenen cytotoxischen Rohextrakt konnte der Sekundärmetabolit SS-43405e (**88**) isoliert werden, der zur Substanzklasse der Pluramycine gehört. Zusätzlich wurde die bisher nicht bekannte Substanz 2-(Indol-3-yl-2'-methyl)-indol-3-ylethanol (**84**) erhalten. Derartige, strukturell als 2,3-Bisindolylmethane zu klassifizierende Verbindungen, waren bisher lediglich aus der Hefe *Malassezia furfur* und dem thermophilen Archaeobakterium *Sulfolobus acidocaldarius* bekannt.

88 **84**

Der Stamm T846 wurde aus einer Wasserprobe des Humboldt-Stroms vor der chilenischen Küste isoliert. Der nach der Kultivierung erhaltene Rohextrakt war cytotoxisch gegen mehrere Zelllinien aktiv und enthielt 1,3,5-Triazin (**83**) als ungewöhnlichen niedermolekularen Metaboliten. Die heterocyclische Verbindung **83** wurde bislang als Naturstoff nicht beschrieben. Ob die biologische Aktivität durch **83** oder andere Inhaltsstoffe bewirkt wurde, muss noch untersucht werden.

83

Der Stamm *Streptomyces flavogriseus* ACT7651 wurde aus litoralem Sediment, das in der Nähe von Punta Arenas (Feuerland) gesammelt wurde, isoliert. Der durch Adsorption an XAD-16 erhaltene Rohextrakt dieses marinen Streptomyceten enthielt die bekannten Verbindungen Enterocin (**95**), 5-Desoxyenterocin (**96**) und Zimtsäureamid (**99**). Bei den beiden letztgenannten Verbindungen handelt es sich um Intermediate der Enterocin-Biosynthese. Die nicht von XAD-16 adsorbierte wässrige Fraktion wurde mit Essigester getrennt extrahiert und lieferte das Makrolid Venturicidin A (**100**).

95 R = OH**96** R = H

100

Die Sekundärmetaboliten des Stammes ACT7651 unterschieden sich im Hinblick auf Strukturgröße und Verbindungsklasse deutlich von den übrigen aus polaren Bakterien isolierten Verbindungen.

Streptomyceten aus anderen Quellen

Der nach sechstägiger Kultivierung erhaltene phycotoxische Rohextrakt des terrestrischen Actinomyceten *Streptomyces* sp. GW24/1811 enthielt das Anthracyclin Komodochinon B (**104**) und das pentacyclische Triterpenoid Hopen-B (**101**). Hopane sind Triterpene, die bei Bakterien ähnlich wie Cholesterol und Ergosterol bei Tieren und Pflanzen deren Zellmembran stabilisieren. Dieser an sich weit verbreitete Verbindungstyp wurde mit **101** in unserer Arbeitsgruppe hier erstmals isoliert.

104 **101**

Die antibakterielle Wirkung des Rohextraktes aus dem terrestrischen Stamm *Streptomyces* sp. GW12/1492 konnte auf das Makrolid X-14952B (**106**) und das schwerlösliche Cervinomycin A₂ (**107**) zurückgeführt werden. Diese beiden Hauptmetaboliten konnten in ungewöhnlich hohen Ausbeuten von 100 bzw. 50 mg/l isoliert werden.

106 **107**

Aus dem antibakteriell wirksamen Rohextrakt des terrestrischen Stammes *Streptomyces* sp. GW51/456 konnten die zur Substanzklasse der Pluramycine gehörenden Verbindungen β -Indomycinon (**111**) und Saptomycin A (**112**) erhalten werden.

111 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$

112 $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$

Die beiden neuen Isochinolinchinone 4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion (**113**) und 4-Methylamino-7,8-dimethyl-isoquinolin-3,6-dion (**114**) konnten aus dem antibakteriell und phycotoxisch wirksamen Rohextrakt des marinen Nordsee-Stammes *Streptomyces* sp. Mei24 isoliert werden. Ähnliche Verbindungen sind aus tropischen Schwämmen bekannt, was auch dort einen mikrobiellen Ursprung vermuten lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass marine Bakterien, insbesondere solche arktischen und antarktischen Ursprunges, zur Bildung biologisch aktiver und strukturell interessanter Metaboliten befähigt sind. Im Vergleich mit terrestrischen Streptomyceten, welche seit langem als Quelle biologisch wirksamer Sekundärmetabolite bekannt und nach wie vor Gegenstand intensiver Untersuchungen sind, neigen polare Bakterien in höherem Maße zur Produktion niedermolekularer Verbindungen. Der Anteil an neuen, bisher nicht beschriebenen Strukturen war bei den letztgenannten in dieser Arbeit jedoch deutlich größer. Die Bearbeitung der marinen Stämme erwies sich vielfach als schwierig, da nach der Kultivierung meist nur geringe Mengen an Rohextrakten erhalten werden konnten. Als Ursache hierfür können die nicht optimalen Anzuchtbedingungen im Labor angeführt werden, wobei hier insbesondere die Zusammensetzung der Nährmedien eine entscheidende Rolle spielen dürfte. Von den Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich zusammenfassend der Schluss ziehen, dass die Erforschung des Metabolitenmusters polarer Mikroorganismen aus den bisher wenig untersuchten Kältegebieten der Pole sehr vielversprechend ist und in Zukunft verstärkt betrieben werden sollte.

9 Materialien und Methoden

Drehwerte: CD-Polarimeter (Perkin-Elmer, Modell 241).

IR-Spektren: Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR; Perkin-Elmer 297 Infrared Spectrophotometer; Beckman DU-640; Shimadzu FT-IR; (KBr-Presslinge und Film).

UV/VIS-Spektren: Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrometer

¹H-NMR-Spektren: Varian Unity 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz), Varian INOVA 500 (500 MHz), Varian Inova 600 (600 MHz). Tetramethylsilan als der interne Standard.

¹³C-NMR-Spektren: Varian Mercury 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian INOVA 500 (125.7 MHz), Varian Inova 600 (150.8 MHz).

Massenspektren: EI-MS: Finnigan MAT 95 (70 eV). Hochauflösung: Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz. DCI-MS: Finnigan MAT 95 (200 eV), Reaktandgas: NH₃. ESI-MS: Finnigan LCQ. HR-ESI-MS: Bruker Apex-Q III, 7 Tesla.

HPLC-MS: Massenspektrometer: Finnigan LCQ; UV/VIS-Detektor: Finnigan Surveyor PDA Detector (Thermo Electron Corporation); HPLC-Pumpe: Rheos 4000 (Flux Instrument); Entgaser: ERC-3415α (Flux Instruments); Autosampler: Jasco 851-AS Intelligent Sampler (Jasco); Steuersoftware HPLC: Janeiro (Flux Instruments); Datensystem: Xcalibur (Finnigan); Datenbanksoftware: MS-Manager (ACDLabs); Säulen: EC 125/2 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel), Synergi 4μ MAX-RP 80A, 150×2.00 mm 4μ micron (Phenomenex); Lösungsmittel: Methanol gradient grade für die Flüssigkeitschromatographie (Merck und Fluka). Programm: von 10 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 10 min 100 % Methanol, von 100 % Methanol auf 10 % Methanol in 2 min.; Flussrate: 300 μl/min.

Materialien

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co., Düren).

Präparative Dickschichtchromatographie (PDC): Kieselgel P/UV₂₅₄ (55 g/100 ml Wasser, Macherey-Nagel & Co.) goß man auf waagrecht liegende Glasplatten (20×20 cm), ließ an der Luft trocknen und aktivierte 4 h bei 130 °C.

Säulenchromatographie (SC): MN Kieselgel 60, 0.05-0.2 mm (Macherey-Nagel & Co.); Kieselgel 60, 0.063-0.100 mm (Merck).

Ausschlußchromatographie: Sephadex LH-20 (Fluka).

Sprühreagenzien

Anisaldehyd/Schwefelsäure: Zu 100 ml einer Stammlösung aus 85 ml Methanol, 14 ml Eisessig und 1 ml Schwefelsäure fügte man 1 ml Anisaldehyd hinzu.

Ehrlichs Reagenz: 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung aus 25 ml Salzsäure (36 %) und 75 ml Methanol gelöst.

Zinn(II)-chlorid-Salzsäure/4-Dimethylaminobenzaldehyd:

Sprühlösung I: 3 ml Zinn(II)-chlorid-Lösung (15 % in Wasser) werden mit 15 ml Salzsäure (37 %) gemischt und mit 180 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wurde frisch zubereitet.

Sprühlösung II: 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung aus 30 ml Ethanol, 3 ml Salzsäure (37 %) und 180 ml 1-Butanol gelöst.

Vorgang: Mit I sprühen, an der Luft trocknen und mit II nachsprühen.

Mikrobiologische Materialien

Fermenter: 20-l-Fermenter (Meredos GmbH, Göttingen) bestehend aus Kulturgefäß, Magnetgekuppeltem Propellerrührer, Kühlschlange mit Thermostat, Steuereinheit mit pH-Regler, Antischaum-Regler (Meredos GmbH, Göttingen).

Schüttler: Infors AG (CH 4103 Einbach) Typ ITE.

Autoklav: Albert Dargatz Autoklav, Volumen 119 l, Betriebstemperatur 121 °C, Betriebsdruck 1.2 kg/cm²

Stammhaltung: Tiefkühlagerung in Dewargefäß Typ BT 37 Air liquid

Kapillaren zur Tiefkühlagerung: Durchmesser 1.75 mm, Länge 80 mm (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)

Erde für Erdkultur: Luvos Heilerde (LU-VOSJUST GmbH & Co., Friedrichshof)

Ultraturrax: Janke & Munkel KG

Testplättchen: 9 mm Durchmesser, Schleicher & Schüll No. 321 261

Nährbodenbestandteile: Glucose, Hefeextrakt und Malzextrakt (Merck, Darmstadt), Bacto Agar (Difco)

Antischaum-Lösung: Nias PPG 2025 (Union Carbide Belgium N. V., Zwiijndrecht)

Petrischalen: Durchmesser 94 mm, Höhe 16 mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)

Celite: Celite France S. A., Rueil-Malmaison Cedex

Rezepturen

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

Künstliches Seewasser (A)

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

Die Lösungen wurden mit Leitungswasser auf 20 l aufgefüllt.

Spurenelement-Lösung nach Hoagland (1993)

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

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

Die Spurenelementsalze wurden in 1 l Leitungswasser gelöst.

Stamm-Lösung

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

Die Salze wurden mit Leitungswasser auf 2 l aufgefüllt.

Künstliches Seewasser (B)

NaCl	24 g
MgCl ₂	5 g
MgSO ₄	5 g
CaCl ₂	0.5 g
KCl	0.5 g
KBr	0.1 g
FePO ₄ ·H ₂ O	10 mg
demineralisiertes Wasser	1000 ml

M₁-Medium

Pepton	5 g
Hefe-Extrakt	1 g
KBr	1 g
Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 8.0 eingestellt.

M₂ ohne Seewasser

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

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

M₂ mit Seewasser

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

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

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
künstliches Seewasser (B)	500 ml
demineralisiertes Wasser	500 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.6 ± 0.2 eingestellt.

B-Medium

Maisstärke (Merck)	5 g
N-Z-Amine (Sigma)	2,5 g
Rindfleischextrakt (Difco)	3,8 g
Sojamehl (Sojamin 50T)	1 g
Hefeextrakt (Difco)	2,5 g
KNO ₃	1,5 g
Seetangextrakt (Manufactum)	2,5 ml
Seewassermischung (Tropic Marin)	33,3 g

demineralisiertes Wasser	1000 ml
--------------------------	---------

Die Lösung wurde auf pH 8.0 eingestellt.

Fleischextrakt-Medium

Pepton	2 g
Glucose	10 g
Hefe-Extrakt	1 g
Fleischextrakt	1 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt.

Medium für Nordsee-Streptomyceten ("Mei-Stämme")

Malz-Extrakt	10 g
Glucose.H ₂ O	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
CaCO ₃	0.5 g
13.2 % Seewasser	1000 ml

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

LB-Agar

Trypton	5 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.2 eingestellt.

LBm-Agar

Trypton	5 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	500 ml
Seewasser	500 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.2 eingestellt.

Nutrient-broth-Agar

Nutrient broth (Difco)	8 g
Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.6 eingestellt.

M-Test-Agar

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

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

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

Sabouraud-Agar

(für den Testkeim *Candida albicans*)

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

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

Bolds Basal Medium (BBM):

Medium für die Algenstämme *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus subspicatus*

NaNO ₃	250 mg
KH ₂ PO ₄	175 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	75 mg
NaCl	25 mg
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	25 mg
Fe-EDTA	1.0 ml

Spurenelementlösung II 1.0 ml

Die Salze wurden jeweils in 10 ml H₂O gelöst. Diese Lösungen vereinigte man mit der Fe-EDTA-Lösung und der Spurenelementlösung II und füllte auf 1000 ml mit demineralisiertem Wasser auf. Bei festem Medium 15 g Agar-Zusatz.

Fe-EDTA-Lösung

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

Spurenelementlösung II

Lösung A:

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

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

Lösung B:

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

Die Salze wurden in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst.

Lösung A und B wurden vereinigt und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

10 Experimenteller Teil

10.1 *Pseudoalteromonas* sp. T268

Der aus dem Darminhalt der antarktischen Krillart *Euphausia superba* isolierte Stamm T268 bildete beige-farbene, glänzende Kolonien.

10.1.1 Primärscreening

Im Dünnschichtchromatogramm fielen lediglich zwei Zonen auf, die weder UV-löschend noch fluoreszierend waren. Nach Besprühen mit Anisaldehyd und Erwärmung zeigte eine der Zonen eine blaue Anfärbung. Die andere Zone färbte sich weder mit Anisaldehyd noch mit Ehrlichs Reagenz an. Im biologischen Screening (300 µg/Plättchen), das am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (Kaiserslautern) durchgeführt wurde, zeigte der Rohextrakt des Stammes keine auffälligen Aktivitäten.

Tabelle 8 Aktivität des Rohextraktes von *Pseudoalteromonas* sp. T268 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus brevis</i> (ATCC 9999)	10
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	10
<i>Nematospora coryli</i> (ATCC 10647)	10
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 381)	15
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Paecilomyces variotii</i> (ETH 114646)	0

10.1.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung von Stamm T268 in einem 20 l-Fermenter und wurde ebenfalls am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (Kaiserslautern) durchgeführt. Die Fermentation erfolgte in M₁-Medium, wobei zum Animpfen 250 ml einer 24 h alten Vorkultur dienten. Für die Kultivierung wurden ein Belüftungsdruck von 2.5 l/min, eine Rührgeschwindigkeit von 121 Upm sowie eine Temperatur von 20 ± 0.5 °C gewählt.

Die Kulturbrühe wurde nach Zusatz von Celite mittels einer Filterpresse in Mycel und Kulturfiltrat getrennt. Letzteres wurde dreimal mit Essigester extrahiert. Das Mycel wurde mit Essigester versetzt und nach Ultraschall-Behandlung filtriert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend vom Lösungsmittel befreit, wobei sich 4.5 g Rohextrakt ergaben.

10.1.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines Stufengradienten aus Dichlormethan/Methanol (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1) getrennt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden durch Chromatographie an Sephadex[®] LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:2 und MeOH) gereinigt. Erneute Flashchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) lieferte 6.9 mg Isatin (**19**), 3.1 mg 3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (**20**), 2.0 mg 3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol (**21**), 2.3 mg Ubichinon Q8 (**27**), 1.2 mg Ubichinon KQ5 (**29**), 0.8 mg Ubichinon KQ2 (**30**), 1.3 mg Norharman (**31**), 0.3 mg Harman (**31**), ~ 120 mg Glutarsäure (**32**), 31.2 mg Monomethylglutarsäure (**32**), 0.5 mg Indolcarbonsäure (**33**), 1.7 mg 3-Hydroxyacetylindol (**34**), 1.9 mg Uracil (**35**), ~ 40 mg p-Hydroxybenzoesäure (**36**), 3.3 mg Tyrosol (**37**), 0.8 mg Vanillinsäure (**38**) und 1.6 mg 4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-propionsäure (**39**).

Isatin (19): $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$ (147), oranger Feststoff, UV-löschend. – R_f = 0.35 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (gelb), Ehrlich (orange). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.81 (br, 1H, 1-NH), 7.63 (d, 3J = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.57 (t, 3J = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 7.14 (t, 3J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 6.90 (d, 3J = 8.0 Hz, 1H, 7-H). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 147 ($[\text{M}]^{+}$, 43), 119 (100), 92 (74), 64 (39).

3-Hydroxy-3-acetonyloxindol (20): $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (205), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (violett), Ehrlich (grün). – R_t = 7.0 min (LC-MS). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 7.78 (s br, 1H, 3-OH), 7.37 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, 4-H), 7.28 (t, 3J = 7.9 Hz, 1H, 6-H), 7.06 (t, 3J = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 6.89

(d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.21, 2.99 (AB, $^2J = 15.2$ Hz, 2H, 8-H), 2.21 (s, 3H, 10-H). – ^{13}C -NMR ([D₆]DMSO, 75.5 MHz): $\delta = 205.0$ (C_q, C-9), 178.0 (C_q, C-2), 142.4 (C_q, C-7a), 131.4 (C_q, C-3a), 128.9 (CH, C-6), 123.6 (CH, C-4), 121.1 (CH, C-5), 109.3 (CH, C-7), 72.6 (C_q, C-3), 50.2 (CH₂, C-8), 30.5 (CH₃, C-10). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 205 ([M]⁺, 19), 162 (26), 148 (29), 138 (24), 120 (27), 107 (100), 100 (56), 43 (21). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 216 (4.01), 255 (3.69), 291 (3.07) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3371, 3319, 1720, 1622, 1486, 1472, 1403, 1389, 1363, 1335, 1228, 1183, 1115, 1061, 780, 761, 670, 642, 622, 593, 555. – $[\alpha]_D^{20} = +1.94$ (c = 1 mg/ml, MeOH).

3-Hydroxy-3-(1-propanonyl)oxindol (21): C₁₂H₁₃NO₃

(219), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.25$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (hellgrün), Ehrlich (hellrot). – $R_t = 9.4$ min (LC-MS). – ^1H -NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 8.25$ (br, 1H,

3-OH), 7.30 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, 4-H), 7.24 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.02 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, 5-H), 6.86 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.13, 2.94 (AB, $^2J = 15.2$ Hz, 2H, 8-H), 2.44 (q, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, 10-H), 1.00 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3H, 11-H). – ^{13}C -NMR (CD₃OD, 75 MHz): $\delta = 209.8$ (C_q, C-9), 181.2 (C_q, C-2), 143.6 (C_q, C-7a), 132.3 (C_q, C-3a), 130.7 (CH, C-6), 124.8 (CH, C-4), 123.4 (CH, C-5), 111.2 (CH, C-7), 74.8 (C_q, C-3), 50.0 (CH₂, C-8), 37.3 (CH₂, C-10), 7.7 (CH₃, C-11). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 219 ([M]⁺, 61), 174 (21), 162 (94), 140 (100), 126 (18), 120 (62), 92 (16), 57 (22). – $[\alpha]_D^{20} = +10.26$ (c = 1 mg/ml, MeOH).

Ubichinon Q8 (27): C₄₉H₇₄O₄ (726), gelbes Öl, UV-löschend. – $R_f = 0.93$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (violet), Ehrlich (beige). – ^1H -NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 5.09$ -5.06, 5.04 (m, t, 7H, 12-, 16-, 20-, 24-, 28-, 32, 36-H), 4.91 (t, 1H, 8-H), 3.97 (s, 3H, 5-OCH₃), 3.96 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.16 (d, 2H, 7-H), 2.05, 1.94 (2m, 2×14H, 10-, 11-, 14-, 15-, 18-, 19-, 22-, 23-, 26-, 27-, 30-, 31-, 34-, 35-H), 1.99 (s, 3H, 2-H), 1.72 (s, 3H, 9-CH₃), 1.66 (s, 3H, 13-CH₃), 1.56 (s, 15H, 17-, 21-, 25-, 29-, 33-CH₃), 1.55 (s, 6H, 37-CH₃, 38-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1475 [2M+Na]⁺ (100), 749 [M+Na]⁺ (18).

Ubichinon KQ5 (28): $C_{33}H_{48}O_5$ (524), gelbes Öl, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.65 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (blau), Ehrlich (beige). – R_t = 24.6 min (LC-MS). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ = 5.07 (t, 3J = 6.9 Hz, 2H, 16-, 20-H), 5.04 (t, 3J = 6.9 Hz, 1H, 12-H) 4.91 (t, 3J = 6.9 Hz, 1H, 8-H), 3.97 (s, 3H, 5-OCH₃), 3.96 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.16 (d, 3J = 6.9 Hz, 2H, 7-H), 2.35 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, 24-H), 2.10 (s, 3H, 26-H), 2.06-2.01 (m, 6H, 11-, 15-, 19-H), 1.99 (s, 3H, 2-H), 1.96-1.92 (m, 8H, 10-, 14-, 18-, 22-H), 1.72 (s, 3H, 9-CH₃), 1.64 (quintett, 3J = 7.4 Hz, 2H, 23-H), 1.55 (s, 9H, 13-, 17-, 21-H). – ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150.8 MHz): δ = 209.2 (C_q, C-25), 184.8 (C_q, C-1), 183.9 (C_q, C-4), 144.3 (C_q, C-5), 144.2 (C_q, C-6), 141.7 (C_q, C-3), 138.9 (C_q, C-2), 137.6 (C_q, C-9), 135.2 (C_q, C-13), 134.9 (C_q, C-17), 134.1 (C_q, C-21), 125.1 (CH, C-20), 124.2 (CH, C-16), 123.9 (CH, C-12), 118.8 (CH, C-8), 61.1 (CH₃, 5-OCH₃), 61.1 (CH₃, 6-OCH₃), 43.0 (CH₂, C-24), 39.7 (CH₂, C-10), 39.7 (CH₂, C-14), 39.7 (CH₂, C-18), 38.9 (CH₂, C-22), 30.0 (CH₃, C-26), 26.7 (CH₂, C-11), 26.6 (CH₂, C-15), 26.5 (CH₂, C-19), 25.3 (CH₂, C-7), 21.8 (CH₂, C-23), 16.3 (CH₃, 9-CH₃), 16.0 (CH₃, 13-CH₃), 16.0 (CH₃, 17-CH₃), 15.7 (CH₃, 21-CH₃), 11.9 (CH₃, 2-CH₃). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1071 [$2M+Na$]⁺ (100), 547 [$M+Na$]⁺ (25). – HRMS ber. für $C_{33}H_{48}O_5$: 524.35016, gef.: 524.35006. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 275 (3.90) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2929, 2856, 1718, 1652, 1612, 1457, 1385, 1288, 1265, 1205, 1155, 1104, 1027.

Ubichinon KQ2 (30): $C_{18}H_{24}O_5$ (320), gelbes Öl, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.56 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). – Anfärbeverhalten:

Anisaldehyd (grün), Ehrlich (beige). R_t = 17.7 min (LC-MS). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ =

4.91 (t, 3J = 6.9 Hz, 1H, 8-H), 3.98 (s, 3H, 5-

OCH₃), 3.96 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.16 (d, 3J = 6.9 Hz, 2H, 7-H), 2.33 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, 12-H), 2.09 (s, 3H, 14-H), 1.99 (s, 3H, 2-CH₃), 1.93 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, 10-H), 1.70 (s, 3H, 9-CH₃), 1.64 (quintett, 3J = 7.5 Hz, 2H, 11-H). – ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150.8 MHz): δ = 208.9 (C_q, C-13), 184.7 (C_q, C-1), 183.9 (C_q, C-4), 144.4 (C_q, C-5), 144.2 (C_q, C-6), 141.5 (C_q, C-2), 138.9 (C_q, C-3), 136.9 (C_q, C-9), 119.7 (CH, C-8), 61.2 (CH₃, 5-OCH₃), 61.2 (CH₃, 6-OCH₃), 42.9

(CH₂, C-12), 38.9 (CH₂, C-10), 30.0 (CH₃, C-14), 25.3 (CH₂, C-7), 21.7 (CH₂, C-11), 16.1 (9-CH₃), 12.0 (2-CH₃). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%) = 663 [2M+Na]⁺ (100), 343 [M+Na]⁺ (51). – **HRMS** ber. für C₁₈H₂₄O₅: 320.16237, gef.: 320.16242. – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 209 (4.04), 274 (3.98), 394 (2.52) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2931, 2855, 1716, 1651, 1612, 1457, 1385, 1287, 1266, 1205, 1157, 1102, 1018, 946.

Norharman (31a): C₁₁H₈N₂ (168), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm), fluoreszierend (366 nm). – R_f = 0.37 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz. – R_t = 5.9 min (LC-MS). – **¹H-NMR** (D₆-

Aceton, 600 MHz): δ = 10.78 (br, 1H, 9-NH), 8.90 (s, 1H, 1-H), 8.35 (d, ³ J = 6.1 Hz, 1H, 3-H), 8.22 (d, ³ J = 6.1 Hz, 1H, 4-H), 8.05 (d, ³ J = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 7.62 (d, ³ J = 8.2 Hz, 1H, 8-H), 7.53 (t, ³ J = 7.9 Hz, 1H, 7-H), 7.25 (t, ³ J = 8.0 Hz, 1H, 6-H). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 168 ([M]⁺, 100), 140 (14).

Harman (31b): C₁₂H₁₀N₂ (182), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm), fluoreszierend (366 nm). – R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz.

– R_t = 6.7 min (LC-MS). – **¹H-NMR** (D₆-Aceton, 300 MHz): δ = 10.72 (br, 1H, 9-NH), 8.24 (d, ³ J = 6.2 Hz, 1H, 3-H), 8.18 (d, ³ J = 6.2 Hz, 1H, 4-H), 7.89 (d, ³ J = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 7.60 (d, ³ J = 8.2 Hz, 1H, 8-H), 7.51 (t, ³ J = 7.9 Hz, 1H, 7-H), 7.23 (t, ³ J = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 2.77 (s, 3H, 1-CH₃). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 182 ([M]⁺, 100), 154 (14).

Glutarsäure (32a): C₅H₈O₄ (132), farbloser Feststoff, nicht UV-aktiv. – R_f = 0.25 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz. – **¹H-NMR** (D₆-Aceton, 300 MHz): δ = 2.37 (t, ³ J = 6.8 Hz, 4H, 2-H, 4-H), 1.85 (quintet, ³ J = 6.8 Hz, 2H, 3-H). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%) = 155 [M+Na]⁺ (98).

Glutarsäuremonomethylester (32b): C₆H₇O₄ (128), farblose Flüssigkeit, nicht UV-aktiv. – R_f = 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz. – R_t = 10.6 min (LC-MS). – **¹H-NMR** (CDCl₃, 300 MHz): δ = ~10 (br, 1H, OH), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 2.44 (t, ³ J = 6.7 Hz, 2H, 4-H), 2.42 (t, ³ J = 6.7 Hz, 2H, 2-H), 1.96 (quintet, ³ J

= 6.7 Hz, 2H, 3-H). - **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 128 ($[M]^{+}$, 24), 115 (100), 114 (58), 100 (83), 87 (89), 86 (53), 74 (30), 59 (44), 55 (60), 45 (58), 43 (90), 42 (40), 41 (47).

Indolcarbonsäure (33): $C_9H_7NO_2$ (161), farbloses Öl, UV-löschend.

- R_f = 0.44 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). - Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (orange), Ehrlich (violett). - R_t = 11.4 min (LC-MS). - 1H -NMR

(CD_3OD , 300 MHz): δ = 8.09 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, 4-H), 7.88 (s, 1H,

2-H), 7.40 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.16 (t, 3J = 8.1 Hz, 1H, 6-H), 7.13 (t, 3J = 8.1 Hz, 1H, 5-

H). - **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 161 ($[M]^{+}$, 100), 144 (91), 116 (25), 89 (34).

3-Hydroxyacetyllindol (34): $C_{10}H_9NO_2$ (175), weißer Feststoff,

UV-löschend. - R_f = 0.28 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). - Anfärbeverhalten:

Anisaldehyd (braun), Ehrlich (hellrot). - R_t = 10.1 min (LC-

MS). - 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ = 8.22 (m, 1H, 4-H), 8.19

(s, 1H, 2-H), 7.44 (m, 1H, 7-H), 7.22 (m, 2H, 5-H, 6-H), 4.72 (s,

2H, 9-H). - **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 175 ($[M]^{+}$, 24), 144 (100),

116 (18), 89 (12).

Uracil (35): $C_4H_4N_2O_2$ (112), weißer Feststoff, UV-löschend. - R_f = 0.25

($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). - Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlichs

Reagenz. - 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): δ = 10.95 (br, 1H, 2-NH),

10.77 (br, 1H, 4-NH), 7.38 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 5.44 (d, 3J = 8.2 Hz,

1H, 6-H). - **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 112 ($[M]^{+}$, 26), 69 (47), 42 (100).

p-Hydroxy-benzoesäure (36): $C_7H_6O_3$ (138), weißer Feststoff, UV-

löschend. - R_f = 0.49 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). - Anfärbeverhalten: Ehrlich

(violett). - R_t = 7.7 (LC-MS). - 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): δ = 7.86

(d, 3J = 8.6 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 6.80 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, 2-H, 6-H). - **EI-MS**

(70 eV): m/z (%) = 138 ($[M]^{+}$, 54), 121 (100), 93 (22), 65 (19).

p-Hydroxyphenylethanol (37): $C_8H_{10}O_2$ (138), weißer Feststoff, UV-

löschend. - R_f = 0.44 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). - Anfärbeverhalten: Anisal-

dehyd (violett). - 1H -NMR NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.10 (d, 3J =

8.5 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.78 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.84 (br,

1H, OH), 3.83 (t, 3J = 8.0 Hz, 2H, 1-H), 2.81 (t, 3J = 8.0 Hz, 2H, 2-H). -

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 138 ($[[M]^+$, 34), 107 (100), 77 (10).

Vanillinsäure (38): $C_8H_8O_4$ (168), weißer Feststoff, UV-löschend. – R_f = 0.42 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (hellblau). – R_t = 8.3 (LC-MS).. – 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.55 (m, 2H, 2-H, 6-H), 6.82 (d, 3J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 3.89 (s, 3H, OCH_3). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 168 ($[[M]^+$, 100), 153 (61), 125 (22), 97 (36), 51 (19).

4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-propionsäure (39):

$C_{10}H_{12}O_4$ (196), weißer Feststoff, schwach UV-löschend.

– R_f = 0.44 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten:

Anisaldehyd (hellrot). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ =

6.84 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz, 5'-H), 6.71 (s, 1H, 2'-H), 6.70 (d,

3J = 8.5 Hz, 1H, 6'-H), 5.50 (br, 1H, OH), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.89 (t, 3J = 7.1 Hz, 2H, H-2),

2.66 (t, 3J = 7.1 Hz, 2H, H-3). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 196 ($[[M]^+$, 37), 137 (100).

10.2 *Salegentibacter holothuriorum* T436

Der aus mehrere Jahre altem arktischen Eis isolierte Stamm T436 bildete auf Agar-Platten beige Kolonien und färbte den Agar intensiv gelb.

10.2.1 Primärscreening

Der Rohextrakt des Stammes T436 zeigte im Dünnschichtchromatogramm ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) eine Reihe gelber und oranger Zonen auf, die sich sowohl im polaren als auch im unpolaren Bereich befanden. Besprühen mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz sowie Zugabe von 2 N NaOH führten zu keiner Farbänderung. Im biologischen Screening (300 μ g/Plättchen) zeigte der Rohextrakt des Stammes folgende Aktivitäten:

Tabelle 9 Aktivität des Rohextraktes von *Salegentibacter holothuriorum* T436 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus brevis</i> (ATCC 9999)	17
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	17
<i>Nematospora coryli</i> (ATCC 10647)	19
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 381)	15
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Paecilomyces variotii</i> (ETH 114646)	0

10.2.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung des Stammes T436 wurde am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (Kaiserslautern) in einem 20 l-Fermenter unter Verwendung des B-Mediums durchgeführt. Die Fermentation erfolgte bei einem Belüftungsdruck von 3 l/min und einer Rührgeschwindigkeit von 121 Upm für 5 Tage bei 22 °C.

10.2.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mittels eines Stufengradienten aus Dichlormethan/Methanol (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1) getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch weitere Chromatographie an Sephadex® LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:2 und MeOH) gereinigt. Nachfolgende Flashchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) ergab 0.4 mg *p*-Nitrophenol (**40**), 1.8 mg 4-Hydroxy-3-nitro-benzoesäure (**41**), 3.0 mg 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure (**42**), 1.7 mg 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-propionsäure (**43**), 1.7 mg 4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäuremethylester (**44**), 2.6 mg 2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol (**45**), 7.1 mg *N*-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl-ethyl)acetamide (**46**), 0.4 mg 2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (**47**), 0.4 mg 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-essigsäuremethylester (**48**), 1.1 mg 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-propionsäure (**49**), 0.6 mg 3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-ethylchlorid (**50**), 0.7 mg 5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-2-chlor-propionsäuremethylester (**51**), 2.7 mg *N*-(3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenylethyl)-acetamid (**52**), 0.4 mg 2,6-Dinitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (**53**), 6.1 mg Pyri-

culamide (**55**), 1.1 mg 7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-2-nitrophenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3'-Nitro-daïdzein) (**56**), 3.9 mg 5,7-Dihydroxy-3-(3,5-dinitro-4-hydroxy-phenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (3',5'-Dinitro-genistein) (**57**), 0.8 mg 2-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**58**), 6-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**59**), 7-Nitro-*N*_β-acetyltryptamin (**60**), 0.4 mg Salegentipyrrol A (**61**), 0.9 mg Salegentipyrrol B (**64**), 1.8 mg 4,5-Dinitro-3-methoxy-phenol (**65**), 1.2 mg 4,6-Dinitro-2-methoxy-phenol (**66**), 2.1 mg 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinon (**67**), 1.1 mg 3-Indolyl-ethyl-methylether (**68**), 4.7 mg Thymin (**69**), 4.2 mg Uracil (**35**) und 2.2 mg p-Hydroxybenzoesäure (**36**).

p-Nitrophenol (40): C₆H₅NO₃ (139), hellgelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R*_f = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – *R*_t = 12.1 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 8.12 (d, ³J = 9.6 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 6.88 (d, ³J = 9.6 Hz, 2H, 3-H, 5-H). – (-)-APCI: *m/z* = 138 [M-H]⁻. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 223 (4.03), 309 (4.07) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2928, 2360, 2340, 1617, 1595, 1518, 1500, 1457, 1385, 1339, 1290, 1168, 1112, 852, 755.

4-Hydroxy-3-nitro-benzoesäure (41): C₇H₅NO₅ (183), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R*_f = 0.25 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – *R*_t = 11.9 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 8.66 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, 2-H), 8.15 (dd, ⁴J = 1.8 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1H, 6-H), 7.13 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, 5-H). – ¹³C-NMR (CD₃OD, 150.8 MHz): δ = 169.8 (COOH), 158.0 (C_q, C-4), 137.9 (CH, C-6), 135.5 (C_q, C-3), 127.8 (CH, C-2), 126.9 (C_q, C-1), 120.8 (CH, C-5). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 183 ([M]⁺, 100), 167 (12), 166 (18), 153 (16), 119 (22), 81 (23), 63 (61), 53 (28). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 237 (4.38), 340 (3.51) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3307, 2924, 2853, 1685, 1626, 1574, 1541, 1433, 1338, 1312, 1257, 1175, 1112.

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäure (42): C₈H₇NO₅ (197), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R*_f = 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – *R*_t = 11.3 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 8.01 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 2-H), 7.54 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 7.10 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, 5-H), 3.63 (s, 2H, CH₂COO). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 197 ([M]⁺, 23), 152 (100), 106 (20), 77 (19), 51 (18). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 226 (3.88), 274 (3.84), 354 (3.52) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3432, 2930, 1698, 1632, 1581, 1493, 1434, 1412, 1331, 1258, 1216, 1180.

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-propionsäure (43):

C₉H₉NO₅ (211), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). –

$R_f = 0.82$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). $R_t = 11.4$ min (LC-MS). –

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 10.46$ (s, 1H, 4-OH), 7.93 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 2-H), 7.43 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, 5-H), 2.93 (t, ³J

= 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂COO), 2.67 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂COO). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 211 ([M]⁺, 32), 193 (46), 152 (100), 147 (38), 106 (15). – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 223 (3.98), 276 (3.92), 358 (3.59) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2925, 1710, 1631, 1583, 1539, 1490, 1429, 1327, 1244, 1187.

4-Hydroxy-3-nitrophenyl-essigsäuremethylester (44):

C₈H₇NO₅ (211), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). –

$R_f = 0.76$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 13.6$ min (LC-MS). –

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): $\delta = 7.99$ (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 7.52 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, 6-H), 7.09 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, 5-H), 3.69 (s, 3H, COOMe), 3.67 (s, 2H, CH₂). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 211 ([M]⁺, 16), 165 (11), 152 (100), 135 (12), 106 (44), 77 (36), 59 (23), 51 (35). – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 220 (4.22), 273 (4.00), 354 (3.68) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3280, 3083, 1736, 1634, 1581, 1537, 1486, 1430, 1420, 1356, 1330, 1307, 1262, 1172.

2-(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)ethanol (45): C₈H₉NO₄ (183),

gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.59$

(CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 13.2$ min (LC-MS). – ¹H-NMR

(CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 10.46$ (s, 1H, 4-OH), 7.96 (d, ⁴J = 2.2

Hz, 1H, 2-H), 7.46 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, 5-H),

3.86 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂OH), 2.84 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂OH). – **EI-MS** (70

eV): m/z (%) = 183 ([M]⁺, 35), 152 (100), 135 (39), 106 (31), 77 (20), 51 (9). – **UV**

(MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 221 (4.12), 275 (3.93), 358 (3.59) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3300,

2929, 2847, 1632, 1586, 1488, 1427, 1326, 1253, 1179.

N-(4-Hydroxy-3-nitrophenylethyl)acetamide (46):

C₁₀H₁₂N₂O₄ (206), gelber Feststoff, UV-löschend (254

nm). – $R_f = 0.51$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 11.1$ min

(LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 10.44$ (s,

D₂O-austauschbar, 1H, 4-OH), 7.89 (d, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, 2-H), 7.41 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, 5-H), 7.08 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, 6-H), 5.72 (br s, D₂O-austauschbar, 1H, NH), 3.46 (q, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 2.79 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 1.93 (s, 3H, Ac). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 206 ([M]⁺⁺, 60), 165 (100), 135 (23), 105 (19), 77 (15), 72 (18), 60 (17), 43 (41). – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 225 (3.90), 275 (3.86), 357 (3.56) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3079, 2934, 1634, 1558, 1532, 1489, 1424, 1321, 1291, 1257, 1171.

2-Nitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (47): C₈H₆N₂O₅ (210),

gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.83$

(CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 13.7$ min (LC-MS). – **¹H-NMR**

(CD₃OD, 300 MHz): $\delta = 8.36$ (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, 2-H), 8.05

(d, $^3J = 13.5$ Hz, 1H, CHNO₂), 7.87 (d, $^3J = 13.5$ Hz, 1H, CHCHNO₂), 7.87 (dd, $^4J = 2.4$ Hz,

$^3J = 8.7$ Hz, 1H, 6-H), 7.10 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, 5-H). – **¹³C-NMR** (CD₃OD, 150.8 MHz): $\delta =$

160.8 (C_q, C-4), 145.8 (C_q, C-3), 138.6 (CH, CHCHNO₂), 137.6 (CH, CHCHNO₂), 136.3

(CH, C-6), 129.3 (CH, C-2), 123.6 (CH, C-5), 121.8 (C_q, C-1). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) =

210 ([M]⁺⁺, 24), 163 (100), 118 (38), 89 (70), 63 (58). – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 222

(4.20), 269 (4.04), 325 (4.20), 435 (sh) (3.54) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3436, 1640, 1624,

1537, 1513, 1504, 1489, 1342, 1275, 1174.

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-essigsäuremethylester

(48): C₉H₈N₂O₇ (256), gelber Feststoff, UV-löschend (254

nm). – $R_f = 0.36$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 12.8$ min (LC-

MS). – **¹H-NMR** (CD₃OD, 600 MHz): $\delta = 7.96$ (s, 2H, 2-H,

6-H), 3.70 (s, 3H, COOCH₃), 3.60 (s, 2H, CH₂COO). – **¹³C-**

NMR (CD₃OD, 150.8 MHz): $\delta = 173.7$ (C_q, COO), 158.3 (C_q, C-4), 143.1 (C_q, C-3, C-5),

132.5 (CH, C-1), 114.4 (CH, C-2, C-6), 52.6 (CH₂, CH₂COO), 39.6 (COOCH₃). – **EI-MS** (70

eV): m/z (%) = 256 ([M]⁺⁺, 14), 226 (13), 197 (12), 59 (16), 44 (100). – **HRMS** ber. für

C₉H₈N₂O₇: 256.03315, gef.: 256.03330. – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 228 (4.33), 432 (3.85)

nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3437, 2925, 1738, 1631, 1553, 1439, 1406, 1384, 1338, 1265,

1238, 1198, 1177, 1116.

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-propionsäure (49):

C₉H₈N₂O₇ (256), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm).

– R_f = 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – R_t = 11.9 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 8.04 (s, 2H, 2-H, 6-H), 2.89 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂COO), 2.62 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂COO). – ¹³C-NMR (CD₃OD, 150.8

MHz): δ = 176.2 (C_q, COOH), 152.7 (C_q, C-4), 141.7 (C_q, C-3, C-5), 131.4 (CH, C-2, C-6), 128.4 (C_q, C-1), 36.1 (CH₂, CH₂CH₂COO), 30.3 (CH₂, CH₂CH₂COO). – (-)-ESI-MS: *m/z* (%) = 533 [2M-2H+Na]⁺ (29), 255 [M-H]⁺ (100). – HRMS ber. für C₉H₈N₂O₇: 256.03315, gef.: 256.03320. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 226 (3.92), 356 (3.16), 436 (3.39) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3412, 1712, 1638, 1542, 1428, 1343, 1262.

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-ethylchlorid (50):

C₈H₇N₂O₅Cl (246), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). –

R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – R_t = 15.6 min (LC-MS). –

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 8.02 (s, 2H, 2-H, 6-H), 3.75 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂Cl), 3.02 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H,

CH₂CH₂Cl). – ¹³C-NMR (CD₃OD, 150.8 MHz): δ = 159.6 (C_q, C-4), 144.2 (C_q, C-3, C-5), 132.2 (CH, C-2, C-6), 119.1 (C_q, C-1), 46.0 (CH₂, CH₂CH₂Cl), 38.2 (CH₂, CH₂CH₂Cl). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 246 ([M]⁺, 16), 197 (100), 151 (16), 91 (98). – HRMS ber. für C₈H₇N₂O₅Cl: 246.00435, gef.: 246.00430. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 230 (4.16), 435 (3.68) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3424, 2926, 1719, 1638, 1543, 1429, 1341, 1256.

3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenyl-2-chlor-propionsäure-

methylester (51): C₁₀H₉ClN₂O₇ (304), orange Feststoff,

UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

– R_t = 17.0 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 600

MHz): δ = 7.82 (s, 2H, 2'-H, 6'-H), 4.56 (t, 1H, ³J = 8.9 Hz, 2-H), 3.73 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.18, 3.06 (ABX, ²J =

15.1 Hz, ³J = 8.9 Hz, 3-H). – (-)-APCI: *m/z* = 303 [M-H]⁺. UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 213 (s, 3.58), 340 (2.89) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3427, 2925, 2854, 1740, 1621, 1545, 1399, 1258, 1098, 701.

N-(3,5-Dinitro-4-hydroxy-phenylethyl)acetamid (52):

$C_{10}H_{11}N_3O_6$ (269), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.19$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – $R_t = 10.3$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): $\delta = 7.82$ (t br, 1H, NH), 7.64 (s, 2H, 2-H, 6-H), 3.17 (m, 2H, CH_2CH_2NH), 2.48 (m, 2H, CH_2CH_2NH), 1.77 (s, 3H, Ac). – ^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 150.8 MHz): $\delta = 169.0$ (C_q , CH_3CO), 158.5 (C_q , C-4), 142.6 (C_q , C-3, C-5), 130.7 (CH, C-2, C-6), 114.4 (C_q , C-1), 40.0 (CH_2 , CH_2CH_2NH), 33.2 (CH_2 , CH_2CH_2NH), 22.5 (CH_3 , CH_3CO). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 537 $[2M-H]^-$ (45), 268 $[M-H]^-$ (100). – HRMS ber. für $C_{10}H_{11}N_3O_6$: 269.06478, gef.: 269.06480. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 225 (3.80), 443 (3.21) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3421, 2928, 1637, 1543, 1460, 1384, 1362, 1338, 1310, 1253, 1205.

2,6-Dinitro-4-(2'-nitroethenyl)phenol (53): $C_8H_5N_3O_7$

(255), orange Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.53$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): $\delta = 8.24$ (s, 2H, 3-H, 5-H), 7.99 (d, $^3J = 13.5$ Hz, 1H, 2'-H), 7.76 (d, $^3J = 13.5$ Hz, 1H, 1'-H). – (-)-ESI-MS: m/z = 531 $[2M-2H+Na]^+$, 254 $[M-H]^+$.

Pyriculamid (55): $C_{14}H_{15}N_3O_5$ (305), gelber Feststoff,

UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.45$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – $R_t = 9.5$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): $\delta = 8.14$ (d, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, NH), 7.70 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, 5-H), 7.34 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, 9-H), 7.08 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, 8-H), 3.94 (m, 1H, 2-H), 3.48 (m, 1H, 2'-H), 3.46 (m, 1H, 3-H_A), 3.27 (m, 1H, 3-H_B), 2.96 (m, 2H, 5'-H), 2.06 (m, 1H, 3'-H_A), 1.83 (m, 1H, 4'-H_A), 1.68 (m, 2H, 3'-H_A, 4'-H_B). – ^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 150.8 MHz): $\delta = 168.2$ (C_q , C-1), 164.5 (C_q , C-1'), 151.1 (C_q , C-7), 136.6 (CH, C-5), 136.2 (C_q , C-6), 127.4 (C_q , C-4), 125.7 (CH, C-9), 119.1 (CH, C-8), 57.8 (CH, C-2), 57.3 (CH, C-2'), 44.7 (CH_2 , C-3), 37.7 (CH_2 , C-5'), 28.5 (CH_2 , C-3'), 21.4 (CH_2 , C-4'). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 655 $[2M-H+2Na]^+$ (100), 633 $[2M+Na]^+$ (25). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 631 $[2M-2H+Na]^+$ (100), 304 $[M-H]^+$ (55). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 208 (3.40), 273 (2.42), 354 (2.08) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3439, 3191, 3081, 2930, 2862, 1623, 1524, 1472, 1445, 1356, 1335, 1280.

7-Hydroxy-3-(4-hydroxy-2-nitrophenyl)-4H-1-**benzopyran-4-on (3'-Nitro-daïdzein, 56):**

$C_{15}H_9NO_6$ (299), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.59 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – R_t = 16.0 min (LC-MS). – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): δ = 10.90 (s br, 1H, OH), 8.45 (s, 1H, 2-H), 8.15 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 2'-H), 7.97 (d, 3J = 8.8 Hz, 1H, 5-H), 7.71 (dd, 3J = 8.8 Hz, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6'-H), 7.12 (d, 3J = 8.8 Hz, 1H, 5'-H), 6.94 (dd, 3J = 8.8 Hz, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 6.88 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 8-H). – ^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 150.8 MHz): δ = 174.3 (C_q , C-4), 162.8 (C_q , C-7), 157.4 (C_q , C-8a), 153.7 (CH, C-2), 153.0 (C_q , C-4'), 136.5 (C_q , C-3'), 135.3 (CH, C-6'), 127.2 (CH, C-5), 125.2 (CH, C-2'), 122.0 (C_q , C-1'), 121.4 (C_q , C-3), 119.6 (CH, C-5'), 116.4 (C_q , C-4a), 115.3 (CH, C-6), 102.1 (CH, C-8). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 621 $[2M+Na]^+$ (78), 300 $[M+H]^+$ (18). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 597 $[2M-H]^-$ (40), 298 $[M-H]^-$ (100). – DCI-MS (NH_3): m/z (%) = 456 $[2M+NH_4]^+$ (14), 237 $[M+NH_4]^+$ (100). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 243 (3.99), 300 (sh, 3.67), 359 (3.22) nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3429, 3281, 1588, 1578, 1537, 1426, 1385, 1310, 1266, 1240, 1179.

5,7-Dihydroxy-3(3,5-dinitro-4-hydroxy-phenyl)-**4H-1-benzopyran-4-on (3',5'-Dinitro-genistein, 57):**

$C_{15}H_8N_2O_9$ (360), orange Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.21 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): δ = 12.78 (br, 1H, OH), 8.27 (s, 1H, 2-H), 8.03 (s, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.12 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 8-H), 6.00 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6-H). – ^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 150.8 MHz): δ = 178.9 (C_q , C-4), 161.6 (C_q , C-5), 159.0 (C_q , C-4'), 157.9 (C_q , C-8a), 152.6 (CH, C-2), 142.9 (C_q , C-3'), 142.9 (C_q , C-5'), 130.4 (CH, C-2'), 130.4 (CH, C-6'), 119.9 (C_q , C-1'), 105.7 (C_q , C-3), 102.3 (C_q , C-4a), 100.2 (CH, C-6), 94.3 (CH, C-8). – (-)-APCI-MS: m/z (%) = 359 $[M-H]^-$ (100). – HRMS ber. für $C_{15}H_8N_2O_9$: 360.02297, gef.: 360.02307. – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 268 (4.12), 434 (3.29) nm.

2-Nitro- N_B -acetyltryptamin (58):

$C_{12}H_{13}N_3O_3$ (247), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.55 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – R_t = 12.8 min (LC-MS). – 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ = 7.74 (d br, 1H, 4-H),

7.41 (m, 2H, 6-H, 7-H), 7.18 (m, 1H, 5-H), 3.51 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 9-H), 3.37 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 8-H), 1.78 (s, 3H, Ac). – $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150.8 MHz): $\delta = 173.4$ (C_q , C-11), 139.2 (C_q , C-2), 135.9 (C_q , C-7a), 129.0 (CH, C-6), 128.2 (C_q , C-3a), 122.7 (CH, C-4), 122.4 (CH, C-5), 117.9 (C_q , C-3), 113.7 (CH, C-7), 40.1 (CH_2 , C-9), 25.5 (CH_2 , C-8), 22.5 (CH_3 , C-12). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%) = 517 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (72), 270 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100). – (-)-**ESI-MS**: m/z (%) = 515 $[2\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ (19), 246 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100). – **HRMS** ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$: 247.09569, gef.: 247.09567. – **UV** (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 216 (4.02), 244 (3.84), 355 (4.00) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 2924, 2854, 1656, 1547, 1452, 1386, 1290$.

6-Nitro-*N* $_{\beta}$ -acetyltryptamin (59): $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$

(247), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). –

$R_f = 0.55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). – $R_t = 12.9$ min

(LC-MS). – $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz): $\delta =$

8.31 (d, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, 7-H), 7.92 (dd, $^3J = 8.7$

Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, 5-H), 7.68 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, 4-H), 7.46 (s, 1H, 2-H), 3.46 (t, $^3J = 6.8$

Hz, 2H, 9-H), 2.97 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 8-H), 1.90 (s, 3H, Ac). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%) = 517

$[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (38), 270 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100). – (-)-**ESI-MS**: m/z (%) = 246 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100).

7-Nitro-*N* $_{\beta}$ -acetyltryptamin (60): $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ (247),

gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.55$

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). – $R_t = 12.9$ min (LC-MS). – $^1\text{H-}$

NMR (CD_3OD , 300 MHz): $\delta = 7.78$ (dd, $^3J = 7.6$ Hz, 4J

$= 1.8$ Hz, 1H, 6-H), 7.71 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz,

1H, 7-H, 4-H), 7.38 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, 5-H), 7.20 (s, 1H, 2-H), 3.34 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 9-

H), 3.04 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, 8-H), 1.89 (s, 3H, Ac). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%) = 517 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$

(38), 270 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100). – (-)-**ESI-MS**: m/z (%) = 246 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100).

1-Acetyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]-3a-nitro-

indol (Salegentipyrrol A, 61): $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ (247), farbloses

Öl, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). –

Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (orange), Ehrlich (grün). – $R_t =$

12.8 min (LC-MS). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 7.42$

(dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, 4-H), 7.24 (dt, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.84 (dt,

$^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, 5-H), 6.66 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1H, 7-H), 6.23 (s, 1H,

8a-H), 5.34 (br, 1H, 8-NH), 3.84 (ddd, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 2.0$ Hz, 1H, 2-H_A), 3.40

(ddd, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 10.5$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, 2-H_B), 3.01 (ddd, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 10.5$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, 3-H_A), 2.81 (ddd, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 2.0$ Hz, 1H, 3-H_B), 2.06 (s, 3H, COCH₃). – **¹³C-NMR** (CDCl₃, 150.8 MHz): $\delta = 170.1$ (C_q, CO), 150.3 (C_q, C-7a), 132.4 (CH, C-6), 125.0 (CH, C-4), 121.8 (C_q, C-3b), 119.6 (CH, C-5), 110.5 (CH, C-7), 99.2 (C_q, C-3a), 78.5 (CH, C-8a), 46.8 (CH₂, C-2), 36.1 (CH₂, C-3), 22.2 (CH₃, COCH₃). – **DCI-MS** (NH₃): m/z (%) = 512 [2M+NH₄]⁺ (5), 495 [2M+H]⁺ (19), 265 [M+NH₄]⁺ (46), 248 [M+H]⁺ (100). – **HRMS** ber. für C₁₂H₁₃N₃O₃: 247.09569, gef.: 247.09581. – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 239 (3.74), 302 (3.04) nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2927, 2856, 1636, 1548, 1438, 1385.

1-Acetyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]-3a,7-dini-

tro-indol (Salegentipyrrol B, 64): C₁₂H₁₂N₄O₅ (292), gelbes

Öl, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.49$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). –

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): $\delta = 8.10$ (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 4-H), 7.70 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 6-H), 7.61 (s br, 1H, 8-NH), 6.84

(t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 5-H), 6.49 (s, 1H, 8a-H), 3.90 (ddd, $^2J =$

10.5 Hz, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 2.2$ Hz, 1H, 2-H_A), 3.45 (ddd, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 10.5$ Hz, $^3J = 6.1$

Hz, 1H, 2-H_B), 3.09 (ddd, $^2J = 13.2$ Hz, $^3J = 10.5$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, 3-H_A), 2.82 (ddd, $^2J =$

13.2 Hz, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 2.2$ Hz, 1H, 3-H_B), 2.10 (s, 3H, 1-COCH₃). – (+)-**ESI-MS**: m/z (%)

= 607 [2M+Na]⁺ (27), 315 [M+Na]⁺ (100). – (-)-**ESI-MS**: m/z (%) = 291 [M-H]⁻ (100). –

HRMS ber. für C₁₂H₁₂N₄O₅: 292.07968, gef.: 292.08089.

4,5-Dinitro-3-methoxy-phenol (65): C₇H₆N₂O₆, orange Feststoff,

UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.51$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – $R_t = 14.1$

min (LC-MS). – **¹H-NMR** (CD₃OD, 600 MHz): $\delta = 8.59$ (d, $^4J = 2.4$

Hz, 1H, 6-H), 7.55 (d, $^4J = 2.4$ Hz, 1H, 2-H), 3.87 (s, 3H, 3-OCH₃). –

¹³C-NMR (CD₃OD, 150.8 MHz): $\delta = 164.6$ (C_q, C-1), 155.6 (C_q, C-

3), 135.2 (C_q, C-5), 132.2 (C_q, C-4), 118.3 (CH, C-6), 106.7 (CH, C-

2), 57.0 (CH₃, 3-OCH₃). – (-)-**APCI**: $m/z = 213$ [M-H]⁻. – **HRMS** ber. für C₇H₆N₂O₆:

214.02258, gef.: 214.02262. – **UV** (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 213 (4.22), 266 (3.92), 342 (3.68)

nm. – **IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3391, 3109, 2946, 2835, 1778, 1607, 1556, 1449, 1344, 1261,

1092, 1027, 946, 918, 804, 711.

4,6-Dinitro-2-methoxy-phenol (66): $C_7H_6N_2O_6$, orange Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.50$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – $R_t = 14.1$ min (LC-MS). – 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): $\delta = 8.51$ (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.75 (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, 3-H), 3.94 (s, 3H, 2- OCH_3). – ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150.8 MHz): $\delta = 157.8$ (C_q , C-1), 153.7 (C_q , C-2), 135.5 (C_q , C-6), 134.2 (C_q , C-4), 116.4 (CH, C-5), 108.3 (CH, C-3), 57.1 (CH_3 , 2- OCH_3). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 214 ($([M]^{++}$, 100), 197 (70), 166 (22), 121 (28), 53 (29), 50 (33).

2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinon (67): $C_8H_8O_4$ (168), gelber Feststoff. – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): $\delta = 5.84$ (s, 2H, 3-H, 5-H), 3.80 (s, 6H, 2 OCH_3). – ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150.8 MHz): $\delta = 186.8$ (C_q , C-1), 176.7 (C_q , C-4), 157.3 (C_q , C-2, C-6), 107.4 (CH, C-3, C-5), 56.5 (CH_3 , 2 OCH_3). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 168 ($([M]^{++}$, 5), 104 (39), 91 (21), 80 (20), 69 (100), 53 (29).

3-Indolyl-ethyl-methylether (68): $C_{11}H_{13}NO$ (175), farbloses Öl, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.80$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (rot), Ehrlich (violett). – $R_t = 15.7$ min (LC-MS). – 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz): $\delta = 7.51$ (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 7'-H), 7.31 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 4'-H), 7.06 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 6'-H), 7.05 (s, 1H, 2'-H), 6.98 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 5'-H), 3.66 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, 1-H), 3.37 (s, 3H, OCH_3), 2.99 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, 2-H). – UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 221, 281 nm. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3415, 2926, 1620, 1457, 1384, 1339, 1228, 1107, 742.

Thymin (69): $C_5H_8N_2O_2$ (126), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.46$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Keine Anfärbung. – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 300 MHz): $\delta = 10.95$ (br, 1H, 2-NH), 10.55 (br, 1H, 4-NH), 7.23 (s, 1H, 5-H), 1.73 (s, 3H, 6- CH_3). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 126 ($([M]^{++}$, 100), 55 (64).

10.3 *Actinomyces* sp. T426

Der aus litoralem Sediment in Feuerland isolierte mesophile Stamm T426 wuchs auf Agarplatten unter Ausbildung eines gelben Luft- sowie eines beigen Substratmycels.

10.3.1 Primärscreening

Beim biologischen Screening des Rohextraktes gegen verschiedenen Organismen (Tabelle 10) konnte lediglich eine cytotoxische Aktivität gegen die angeführten Zelllinien gefunden werden.

Tabelle 10 Für das biologische Screening verwendete Organismen bzw. Zelllinien.

	Organismen	Konzentration *
Bakterien	<i>B. brevis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. dissolvens</i>	20 µl/Plättchen
Pilze	<i>M. miehei</i> , <i>N. corylii</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. variotii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>F. solani</i> , <i>R. oryzae</i>	
Pathogenes Hefe	<i>C. albicans</i>	
Pathogene Bakterien	<i>S. aureus</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	
Nematoden	<i>C. elegans</i>	10 µl/ml
Cytotoxizität	MCF-7, HepG2, HeLA S3, Jurkat, Colo 320, L1210, MDAMB231	60 µl/400 µl

* Das Extrakt aus 200 ml Kultur wurde in 3 ml MeOH aufgenommen.

10.3.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierung und Aufarbeitung wurden am IBWF (Kaiserslautern) durchgeführt. Für die Vorkulturen wurde Stamm T426 in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, welche mit 200 ml B-Medium befüllt waren, bei 120 Upm und 22 °C inkubiert. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte ebenfalls bei 22 °C in B-Medium bei pH 8. Die so erhaltene Kulturbrohe wurde mit Celite versetzt und filtriert. Das Mycel wurde daraufhin mit Essigester extra-

hiert. Der pH-Wert des Kulturfiltrats wurde auf 4 eingestellt und anschließend ebenfalls mit Essigester extrahiert.

10.3.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Eine Vortrennung des Rohextraktes erfolgte bereits am IBWF (Kaiserslautern). Es wurden sechs Fraktionen (1 – 6) mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines Stufengradienten aus Cyclohexan/Essigester (CH/EE 9:1, CH/EE 8:2, CH/EE 7:3, CH/EE 6:4, CH/EE 5:5) erhalten. Nachfolgende Trennung an Sephadex LH-20 (MeOH) führte zu den Fraktionen 7 – 10, welche jedoch nur in sehr geringen Mengen anfielen und folglich nur einem HPLC-ESI-MS/MS-Screening unterzogen werden konnten. Aus den Fraktionen 3 – 6 konnten durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (MeOH) und mittels präparativer Dickschichtchromatographie 7.3 mg Tryptophol (**76**) und 2.1 mg *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester (**77**) isoliert werden.

Tryptophol (76): C₁₀H₁₁NO (161), farbloses Öl, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (rot), Ehrlich (violett). – R_t = 11.8 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.03

(s br, 1H, 1-NH), 7.62 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, 4-H), 7.37 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, 7-H), 7.20 (dt, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, 5-H), 7.12 (dt, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (s, 1H, 2-H), 3.90 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, 9-H), 3.03 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, 8-H). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 161 ([M]⁺, 25), 130 (100), 103 (6), 77 (7).

***p*-Hydroxybenzoesäuremethylester (77):** C₈H₈O₃ (152), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.63 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung. – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.86 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 6.81 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 3.83 (s, 3H, OCH₃). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 152 ([M]⁺, 44), 121 (100), 93 (18), 65 (10).

10.4 *Actinomyces* sp. T421

Der aus litoralem Sediment in Feuerland isolierte Stamm T421 bildete auf Agarplatten graues Luft- sowie gelbes Substratmycel aus.

10.4.1 Primärscreening

Beim biologisches Screening des Rohextraktes gegen verschiedene Organismen (siehe Tabelle 10) konnte eine zu Stamm T426 vergleichbare cytotoxische Aktivität festgestellt werden (vgl. Kapitel 10.3.1).

10.4.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierung und Aufarbeitung wurden am IBWF (Kaiserslautern) unter den in Kapitel 10.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Im Unterschied zu Stamm T426 erfolgte die Fermentation hier in LB-Medium bei einer Temperatur von 18 °C.

10.4.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde am IBWF (Kaiserslautern) chromatographisch aufgereinigt. Es konnten 1.2 mg *trans*-3-Methylthioacrylsäure (**78**), 1.1 mg Benzoesäure (**79**) und 1.3 mg Phenyl-essigsäure (**80**) isoliert werden.

***trans*-3-Methylthioacrylsäure (78):** C₄H₆O₂S (118), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R_f* = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

– Keine Anfärbung. – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.88 (d, ³*J* = 15.0 Hz, 1H, 3-H), 5.66 (d, ³*J* = 15.0 Hz, 1H, 2-H), 2.37 (s, 3H, 5-H). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 118 ([M]⁺, 100), 103 (91), 101 (17), 100 (30), 85 (15), 73 (28), 72 (23), 58 (22), 47 (17), 45 (33). – DCI-MS (NH₃): *m/z* (%) = 153 [M+NH₃+NH₄]⁺ (32), 136 [M+NH₄]⁺ (100).

Benzoesäure (79): C₇H₆O₂ (122), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R_f* = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung. – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.12 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.62 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 1H, 4-H), 7.48 (t, ³*J* = 7.5 Hz, 2H, 3-H, 5-H). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 122 ([M]⁺, 100), 105 (90), 77 (48), 51 (18).

Phenyl-essigsäure (80): C₈H₈O₂ (136), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – *R_f* = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung. – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.30 (m, 5H, Ar-H), 3.66 (s, 2H, 2-H). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 136 ([M]⁺, 38), 92 (18), 91 (100), 65 (11).

10.5 Stamm T846

Der Stamm T846 wurde aus einer Wasserprobe des Humboldt-Stroms vor der chilenischen Küste isoliert.

10.5.1 Primärscreening

Im Dünnschichtchromatogramm waren einige UV-löschende Zonen zu erkennen. Nach Besprühen mit Anisaldehyd färbten sich zwei Zonen violett an. Eine weitere, stark UV-löschende und sehr polare Zone ging weder mit Anisaldehyd noch mit Ehrlichs Reagenz eine Farbreaktion ein.

10.5.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierung und Aufarbeitung wurden am IBWF (Kaiserslautern) durchgeführt.

10.5.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Eine Vortrennung erfolgte am IBWF (Kaiserslautern) durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Zwei der dabei erhaltenen Fraktionen wurden aufgrund auffälliger Zonen im Dünnschichtchromatogramm weiter bearbeitet. Nachfolgende Chromatographie an Sephadex LH-20 (MeOH) und Kieselgel lieferte 3.1 mg 3-Indolylcarbaldehyd (**81**), 2.8 mg 3-Indolylcarbonensäure (**33**), 26.2 mg 3-Methylthiopropionsäure (**82**) und 12.4 mg Triazin (**83**).

3-Indolylcarbaldehyd (81): C_9H_7NO (145), farbloses Öl, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.37$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (orange), Ehrlich (violett). – $R_t = 12.0$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($[D_6]Aceton$, 300 MHz): $\delta = \sim 11.2$ (br, 1H, 1-NH), 10.02 (s, 1H, CHO), 8.21 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 8.19 (s, 1H, 2-H), 7.53 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, 4-H), 7.24 (m, 2H, 5-H, 6-H). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 145 ($[M]^+$, 82), 144 (100), 116 (40), 89 (54), 63 (26).

3-Methylthio-propionsäure (82): $C_4H_8O_2S$ (120), farbloses Öl, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.51$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Keine Anfärbung. – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): $\delta = 10.76$ (br, 1H, COOH), 2.74 (m, 2H, 3-H), 2.66 (m, 2H, 2-H), 2.11 (s, 3H, SCH_3).

1,3,5 Triazin (83): $C_3H_3N_3$ (81), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.21$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Keine Anfärbung. – $R_t = 6.3$ min (LC-MS). – 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): $\delta = 8.53$ (s, 3H, 2-H, 4-H, 6-H). – ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150.8 MHz): $\delta = 170.5$ (CH, C-2, C-4, C-6).

10.6 Stamm T406

Der aus Pinguinexkrementen isolierte Stamm T406 wuchs in Form gelber, feiner Kolonien und zeigte psychrophiles Verhalten.

10.6.1 Primärscreening

Im Dünnschichtchromatogramm waren mehrere gelbe bzw. UV-löschende Zonen auffällig, von denen eine nach Besprühen mit Anisaldehyd eine dunkelviolette Farbreaktion einging. Das biologische Screening des Rohextraktes gegen verschiedenen Organismen (Tabelle 10) ergab die bereits bei den Stämmen T426 (Kapitel 10.3.1) und T421-A (Kapitel 10.4.1) auffällige Cytotoxizität gegenüber bestimmten Zelllinien. Weiterhin wies Stamm T406 eine Aktivität gegen Nematoden auf.

10.6.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierung und Aufarbeitung wurden am IBWF (Kaiserslautern) unter den in Kapitel 10.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Fermentation erfolgte in B-Medium bei 4 °C, wobei sich 3.1 g Rohextrakt ergaben.

10.6.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines Stufengradienten aus Dichlormethan/Methanol (CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1, $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2, $CH_2Cl_2/MeOH$ 97:3, $CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5, $CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) getrennt. Anschließend chromatographische Reinigung an Sephadex LH20 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 3:2 und MeOH) sowie Flashchromatographie an Kieselgel ($CH_2Cl_2/MeOH$) ergaben 1.9 mg 2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (**84**), 3.6 mg Ubichinon Q7 (**87**), 0.2 mg SS-43405e (**88**), 1.3 mg 2-(3-

Indolyl)ethylacetat (**89**), 1.5 mg Cyclo(Dehydroala-Leu) (**90**), 18.1 mg Phenylethanol (**91**) und 8.4 mg 2-(3-Indolyl)ethanol (**76**).

2-(Indol-3-ylmethyl)-indol-3-ylethanol (84**):**

C₁₉H₁₈N₂O (290), farbloser Feststoff, UV-löschend

(254 nm). – *R_f* = 0.75 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Anfär-

beverhalten: Anisaldehyd (violett). – *R_t* = 16.6 min

(LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.46

(d br, ³J = 7.7 Hz, 1H, 4'-H), 7.43 (d br, ³J = 8.0 Hz,

1H, 4''-H), 7.31 (d br, ³J = 8.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.20 (d br, ³J = 7.6 Hz, 1H, 7'-H), 7.05 (t br,

³J = 7.6 Hz, 1H, 6''-H), 6.97 (m, 1H, 6'-H), 6.96 (m, 1H, 2''-H), 6.94 (m, 1H, 5'-H), 6.92 (m,

1H, 5''-H), 4.22 (s, 2H, 8'-H), 3.69 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, 1-H), 3.04 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, 2-H). –

¹³C-NMR (CD₃OD, 150.8 MHz): δ = 138.3 (C_q, C-7''a), 137.2 (C_q, C-7'a), 136.6 (C_q, C-2'),

130.1 (C_q, C-3'a), 128.6 (C_q, C-3''a), 123.8 (CH, C-2''), 122.3 (CH, C-6''), 121.4 (CH, C-6'),

119.6 (CH, C-5''), 119.41 (CH, C-4''), 119.37 (CH, C-5'), 118.6 (CH, C-4'), 114.0 (C_q, C-

3''), 112.2 (CH, C-7''), 111.6 (CH, C-7'), 108.0 (C_q, C-3'), 63.7 (CH₂, C-1), 29.0 (CH₂, C-2),

23.3 (CH₂, C-8'). – EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 290 ([M]⁺, 33), 259 (100), 130 (37). – DCI-

MS (NH₃): *m/z* (%) = 582 [2M+H]⁺ (0.5), 308 [M+NH₄]⁺ (14), 291 [M+H]⁺ (100). – UV

(MeOH): λ_{max} (lg ε) = 224 (4.08), 282 (2.91), 385 (2.55) nm.

Ubichinon Q7 (87**):** C₄₄H₆₆O₄ (658), gelbes Öl, UV-löschend (254 nm). – *R_f* = 0.95

(CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (violett). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300

MHz): δ = 5.10-5.04 (m, 6H, 12-, 16-, 20-, 24-, 28-, 32-H), 4.91 (t, 1H, 8-H), 3.97 (s, 3H, 5-

OCH₃), 3.96 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.16 (d, 2H, 7-H), 2.05-1.94 (m, 24H, 10-, 11-, 14-, 15-, 18-,

19-, 22-, 23-, 26-, 27-, 30-, 31-H), 1.99 (s, 3H, 2-CH₃), 1.71 (s, 3H, 9-CH₃), 1.65 (s, 3H, 13-

CH₃), 1.56 (s, 12H, 17-, 21-, 25-, 29-CH₃), 1.55 (s, 6H, 33-CH₃, 34-H).

SS-43405e (88): $C_{22}H_{18}O_5$ (362), gelber Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.88$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Keine Anfärbung. – $R_t = 24.7$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): $\delta = 12.92$ (s, 1H, OH), 8.03 (s, 1H, 6-H), 7.80 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, 8-H), 7.65 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, 9-H), 7.34 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, 10-H), 6.24 (s, 1H, 3-H), 3.00 (s, 3H, 5-H), 2.70 (sextett, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, 13-H), 1.95 (dq, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, 14- H_A), 1.76 (dq, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, 14- H_B), 1.41 (d, 3H, 13- CH_3), 0.96 (t, 3H, 15-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 747 $[2M+Na]^+$ (100), 363 $[M+H]^+$ (41). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 745 $[2M-2H+Na]^-$ (100), 361 $[M-H]^-$ (17).

2-(3-Indolyl)ethylacetat (89): $C_{12}H_{13}NO_2$ (203), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.81$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (rot), Ehrlich (violett). – $R_t = 15.7$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): $\delta = 8.00$ (br, 1H, 1-NH), 7.64 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 4-H), 7.38 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, 7-H), 7.20 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, 5-H), 7.13 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.06 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, 2-H), 4.35 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, 9-H), 3.10 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, 8-H), 2.05 (s, 3H, 12-H). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 203 ($[M]^+$, 28), 143 (100), 130 (90).

Cyclo(Dehydroala-Leu) (90): $C_9H_{14}N_2O_2$ (182), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.51$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (orange), Ehrlich (orange). – $R_t = 9.7$ min (LC-MS). – 1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 600 MHz): $\delta = 10.47$ (br, 1H, 1-NH), 8.40 (s br, 1H, 4-NH), 5.18 (s, 1H, 11- H_A), 4.79 (s, 1H, 11- H_B), 3.96 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, 6-H), 1.80 (septett, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, 8-H), 1.58 (m, 2H, 7-H), 0.86 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H, 9-H, 10-H). – ^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 150.8 MHz): $\delta = 166.4$ (C_q , C-5), 158.2 (C_q , C-2), 134.7 (C_q , C-3), 98.9 (CH_2 , C-11), 53.7 (CH , C-6), 43.5 (CH_2 , C-7), 23.3 (CH , C-8), 22.6 (CH_3 , C-9), 22.1 (CH_3 , C-10).

Phenylethanol (91): $C_8H_{10}O$ (122), farblose Flüssigkeit, UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.63$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). – Keine Anfärbung. – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): $\delta = 7.32$ (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.25 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 3.83 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, 1-

H), 2.86 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, 2-H). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 122 ($[M]^{*+}$, 34), 92 (58), 91 (100), 65 (18).

10.7 *Streptomyces flavogriseus* ACT7651

Der Stamm wurde aus litoralem Sediment isoliert, das aus der Nähe von Punta Arenas (Feuerland) stammte.

10.7.1 Primärscreening

Der Rohextrakt von Stamm ACT2298 fiel im Dünnschichtchromatogramm durch mehrere UV-löschende Zonen auf, welche sich beim Besprühen mit Anisaldehyd blau färbten.

Tabelle 11 Aktivität des Rohextraktes von Stamm ACT2298 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus subtilis</i>	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	25
<i>Escherichia coli</i>	30
<i>Candida albicans</i>	17
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	11
<i>Chlorella vulgaris</i>	12
<i>Chlorella sorokiniana</i>	13
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	13

10.7.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung erfolgte im 15 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit jeweils 200 ml M2-Medium befüllt und mit einem 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft wurden. Die Fermentation wurde auf einem Linearschüttler bei 28 °C für vier Tage durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte zunächst durch Korrektur des pH-Wertes auf 5.0, Zusatz von Celite und Filtration. Das Kulturfiltrat wurde an XAD-16 adsorbiert, das Adsor-

berharz anschließend mit 10 l Wasser gewaschen und mit 5 l Methanol eluiert. Das nach dieser Behandlung vorliegende Kulturfiltrat wurde zusätzlich mit Essigester extrahiert und führte zu 50 mg hellgelbem Extrakt. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal mit Essigester und zweimal mit Aceton unter Ultraschall-Behandlung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen ergaben nach Entfernen des Lösungsmittels 6.8 g Rohextrakt.

10.7.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1000 ml CH₂Cl₂/MeOH 95:5 und 2000 ml CH₂Cl₂/MeOH 9:1) getrennt. Anschließend chromatographische Reinigung an Sephadex LH20 (CH₂Cl₂/MeOH 3:2 und MeOH) sowie präparative Dickschichtchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) ergaben 67.7 mg 2-Desoxyuridin (**92**), 45.1 mg 2-Desoxythymidin (**93**), 10.9 mg 2'-O-Methyluridin (**94**), 54 mg Enterocin (**95**), 43 mg 5-Deoxyenterocin (**96**) und 33 mg *trans*-Zimtsäureamid (**99**). Der Essigester-Extrakt des Kulturfiltrates wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) getrennt. Weitere Reinigung an Sephadex LH20 (MeOH) lieferte 4.3 mg Venturicidin A (**100**).

2-Desoxyuridin (92): C₉H₁₂N₂O₅ (228), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.05 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (blau), schwach Ehrlich (braun). – R_t = 2.9 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.97 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, 6-H), 6.26 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 5.69 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, 5-H), 4.37 (dt, ³J = 6.0 Hz, 3.4 Hz, 1H, 3'-H), 3.92 (q, ³J = 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 3.76, 3.72 (ABX, ²J = 12.0 Hz, ³J = 3.3 Hz, 2H, 5'-H), 2.22 (m, 2H, 2'-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 251 (95). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 227 (20). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 228 ([M]⁺, 2), 117 (100), 112 (29), 96 (15), 73 (52), 69 (51), 45 (39).

2-Desoxythymidin (93): C₁₀H₁₄N₂O₅ (242), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.07 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (blau), Ehrlich (schwach braun). – R_t = 3.9 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.80 (s, 1H, 6-H), 6.28 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.39 (m, 1H, 3'-H),

3.90 (q, 3J 3.4 Hz, 1H, 4'-H), 3.78, 3.72 (m, 2J = 12.1 Hz, 3J = 3.1 Hz, 2H, 5'-H), 2.23 (m, 2H, 2'-H), 1.86 (s, 5-CH₃). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 507 [2M+Na]⁺ (68), 265 [M+Na]⁺ (100), 243 [M+H]⁺ (2). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 287 [M+HCOO]⁻ (100), 241 [M-H]⁻ (6).

2'-O-Methyluridin (94): C₁₀H₁₄N₂O₆ (258), weißer Feststoff, UV-

löschend (254 nm). – R_f = 0.09 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). –

Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (grün), Ehrlich (schwach braun). –

R_t = 3.6 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 8.08

(d, 3J = 7.9 Hz, 1H, 6-H), 5.93 (d, 3J = 3.4 Hz, 1H, 1'-H), 5.69 (d, 3J

= 8.2 Hz, 1H, 5-H), 4.24 (t, 3J = 6.0 Hz, 1H, 3'-H), 3.97 (dt, 3J =

6.0, 3.0 Hz, 1H, 4'-H), 3.87 (dd, 3J = 12.3, 3.0 Hz, 1H, 5'-H_B) 3.84

(dd, 3J = 6.0, 3.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.74 (dd, 3J = 12.3, 3.0 Hz, 1H, 5'-H_A), 3.51 (s, 3H, 2'-OCH₃).

Enterocin (95): C₂₂H₂₀O₁₀ (444), weißer Feststoff, UV-

löschend (254 nm). – R_f = 0.21 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). –

Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (blau), Ehrlich (hellrot). –

R_t = 8.4 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ =

7.84 (d, 3J = 7.7 Hz, 2H, 18-H, 22-H), 7.51 (t, 3J = 7.5 Hz,

1H, 20-H), 7.39 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, 19-H, 21-H), 6.30 (d,

4J = 2.2 Hz, 1H, 11-H), 5.42 (d, 4J = 2.2 Hz, 1H, 13-H),

4.77 (m, 1H, 6-H), 4.69 (br, 1H, OH), 4.64 (s, 1H, 3-H),

4.61 (d, 3J = 4.5 Hz, 1H, 5-H), 4.57 (br, 1H, OH), 4.42 (d,

3J = 2.5 Hz, 1H, 9-H), 4.35 (br, 1H, OH), 3.75 (s, 3H, 15-H), 2.53 (dd, 2J = 14.7 Hz, 3J = 3.1

Hz, 1H, 7-H_{ax}), 1.84 (dd, 2J = 14.7 Hz, 3J = 2.6 Hz, 1H, 7-H_{eq}). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 911

[2M+Na]⁺ (100), 467 [M+Na]⁺ (16), 445 [M+H]⁺ (8).

5-Desoxyenterocin (96):

C₂₂H₂₀O₉ (428), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). –

R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung. – R_t =

10.2 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ =

7.84 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H, 18-H, 22-H), 7.60 (t, 3J = 7.1 Hz,

1H, 20-H), 7.48 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, 19-H, 21-H), 6.28 (d, 4J

= 1.9 Hz, 1H, 11-H), 5.48 (d, 4J = 1.9 Hz, 1H, 13-H), 4.99

(m, 1H, 6-H), 4.21 (s, 1H, 9-H), 3.99 (s, 1H, 3-H), 3.80 (s,

3H, 15-H), 2.83 (dd, $^2J = 15.1$ Hz, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, 5-H_{ax}), 2.71 (dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J = 2.8$ Hz, 1H, 7-H_{ax}), 2.16 (t, $^3J = 15.1$ Hz, 1H, 5-H_{äq}), 1.85 (t, $^3J = 14.4$ Hz, 1H, 7-H_{äq}). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 879 [2M+Na]⁺ (100), 857 [2M+H]⁺ (5), 429 [M+H]⁺ (23).

trans-Zimtsäureamid (99): C₉H₈O₂ (147), weißer Feststoff,

UV-löschend (254 nm). – $R_f = 0.39$ (CH₂Cl₂/ MeOH 9:1). –

Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (hellrot), Ehrlich (gelb). – $R_t =$

11.1 min (LC-MS). – ¹H-NMR (d-Aceton, 300 MHz): $\delta = 7.58$

(m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.57 (d, $^3J = 15.7$ Hz, 1H, 2-H), 7.38 (m,

3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.13 (br, 1H, NH), 6.74 (d, $^3J = 15.7$ Hz, 1H, 3-H), 6.68 (br, 1H, NH).

– EI-MS (70 eV): m/z (%) = 146 ([M]⁺, 100), 131 (56), 103 (85), 102 (44), 77 (79), 51 (62), 44 (82).

Venturicidin A

(100): C₄₁H₆₇NO₁₁

(750), farblose Kris-

talle, schwach UV-

löschend (254 nm). –

$R_f = 0.28$ (CH₂Cl₂/

MeOH 9:1). – Anfär-

beverhalten: Anisal-

dehyd (dunkelblau), Ehrlich (dunkelblau). – $R_t = 20.8$ min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300

MHz): $\delta = 5.58$ (s br, 1H, 3-OH), 5.48 (m, 1H, 5-H), 5.39 (m, 1H, 14-H), 5.38 (m, 1H, 9-H),

5.27 (m, 1H, 15-H), 4.82 (br, 2H, CONH₂), 4.64 (m, 2H, 19-CH, 3'-H), 4.54 (m, 1H, 1'-H),

4.44 (s, 1H, 7-H), 3.83 (m, 1H, 13-H), 3.51 (m, 1H, 23-H), 3.23 (m, 1H, 5'-H), 3.22 (m, 1H,

4'-H), 3.14 (br, 1H, 4'-OH), 2.76 (m, 1H, 24-H), 2.59 (m, 2H, 2-H), 2.57 (m, 1H, 26-H_A),

2.53 (s br, 1H, 23-OH), 2.30 (m, 1H, 26-H_B), 2.24 (m, 1H, 2'-H_A), 2.14 (m, 3H, 4-H, 16-H),

2.09 (m, 1H, 10-H_A), 1.90 (m, 1H, 10-H_B), 1.83 (m, 1H, 18-H), 1.77 (m, 1H, 20-H), 1.67 (m,

1H, 2'-H_B), 1.60 (m, 1H, 22-H), 1.47 (s, 3H, 6-CH₃), 1.44 (m, 2H, 12-H), 1.44 (m, 1H, 11-

H_A), 1.39 (s, 3H, 8-CH₃), 1.31 (d, 3H, 5'-CH₃), 1.20 (m, 1H, 17-H_A), 1.17 (m, 1H, 11-H_B),

1.15 (m, 1H, 21-H_A), 1.08 (m, 3H, 24-CH₃), 1.03 (m, 1H, 17-H_B), 1.03 (m, 3H, 27-H), 0.98

(m, 1H, 21-H_B), 0.92 (d, 3H, 16-CH₃), 0.85 (m, 3H, 22-CH₃), 0.82 (m, 3H, 20-CH₃), 0.82 (m,

3H, 18-CH₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): $\delta = 216.8$ (C_q, C-25), 173.0 (C_q, C-1), 157.4

(C_q, C-6'), 138.8 (CH, C-15), 134.4 (C_q, C-8), 133.1 (C_q, C-6), 129.5 (CH, C-14), 129.4 (CH,

C-9), 116.7 (CH, C-5), 98.3 (CH, C-1'), 93.8 (C_q, C-3), 83.1 (CH, C-19), 82.7 (CH, C-13),

80.1 (CH, C-7), 77.8 (CH, C-23), 75.4 (CH, C-3'), 75.1 (CH, C-4'), 71.9 (CH, C-5'), 48.3 (CH, C-24), 43.4 (CH₂, C-2), 41.7 (CH₂, C-21), 36.7 (2CH₂, C-17, C-2'), 36.0 (CH₂, C-26), 35.1 (CH₂, C-4), 34.80 (CH, C-16), 34.78 (CH₂, C-12), 32.4 (CH, C-22), 32.1 (CH, C-20), 31.6 (CH, C-18), 27.2 (CH₂, C-10), 25.9 (CH₂, C-11), 19.5 (16-CH₃), 19.2 (6-CH₃), 17.8 (5'-CH₃), 16.0 (22-CH₃), 14.3 (24-CH₃), 12.5 (20-CH₃), 12.0 (18-CH₃), 10.7 (8-CH₃), 7.5 (CH₃, C-27). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 772 [M+Na]⁺ (100). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 748 [M-H]⁻ (60).

10.8 *Streptomyces* sp. GW24/1811

Der aus einer Bodenprobe aus Malta isolierte terrestrische Stamm bildete auf Agarplatten weiße Kolonien.

10.8.1 Primärscreening

Der nach dreitägiger Kultivierung erhaltene Rohextrakt von Stamm GW24/1811 wies im Dünnschichtchromatogramm eine Reihe farbloser Zonen auf. In einem zweiten, sechstägigen Kultivierungsversuch zeigte der erhaltene Rohextrakt im Dünnschichtchromatogramm mehrere orange und violette Zonen, welche sich bei Behandlung mit 2 N NaOH blau bzw. braun verfärbten. Im Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* ergab sich eine Mortalitätsrate von 95 %, während diese bei *Caenorhabditis elegans* 89 % betrug.

Tabelle 12 Aktivität des Rohextraktes von Stamm GW24/1811 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus subtilis</i>	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	11
<i>Escherichia coli</i>	16
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	30
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

10.8.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Fermentation erfolgte im 20 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit jeweils 200 ml M₂-Medium befüllt waren und mit einem 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft wurden. Die Kultivierung wurde auf einem Linearschüttler bei 28 °C für 3 bzw. 6 Tage durchgeführt. Ab dem fünften Tag zeigten die Kulturen eine auffällige orange Färbung.

Die Kulturbrühe wurde anschließend mittels einer Filterpresse über Celite filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde dreimal mit Essigester extrahiert, während das Mycel dreimal mit Essigester und zweimal mit Aceton unter Ultraschall-Behandlung extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden vom Lösungsmittel befreit, wobei sich 6.4 g Rohextrakt ergaben.

10.8.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten aus Chloroform/Methanol (CHCl₃, CHCl₃/MeOH 99:1, CHCl₃/MeOH 98:2, CHCl₃/MeOH 97:3, CHCl₃/MeOH 96:4, CHCl₃/MeOH 95:5, CHCl₃/MeOH 9:1, CHCl₃/MeOH 4:1 und CHCl₃/MeOH 3:2) getrennt. Nach eintägiger Lagerung bei 4 °C im Lösungsmittel Chloroform fielen bei der ersten Fraktion 4.9 mg Hopen-B (**101**) in Form farbloser Kristalle an. Weitere chromatographische Aufreinigung der zweiten Fraktion an Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 3:2) und anschließende präparative Dickschichtchromatographie lieferten 1.3 mg Komodochinon A (**103**) und 4.6 mg Komodochinon B (**104**). Aus der dritten Fraktion konnten nach Chromatographie an Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 3:2) 56.0 mg Poly(β-hydroxybuttersäure) (**102**) isoliert werden.

Hopen-B (101): C₃₀H₅₀ (410), farblose Kristalle, nicht UV-aktiv. – R_f = 0.98 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (violett). – R_t = 12.2 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 4.76 (s, 2H, 23-H), 2.66 (q, 1H, 21-H), 1.83 (m, 2H, 20-H), 1.73 (s, 3H, 24-H), 1.62 (m, 2H, 1-H), 1.60 (m, 2H, 16-H), 1.47 (m, 2H, 6-H), 1.35 (m, 2H, 2-H), 1.31 (m, 2H, 3-H), 1.20 (m, 2H, 15-H), 0.94 (s, 3H, 28-H), 0.92 (s, 3H, 29-H), 0.82 (s, 3H, 25-H), 0.79 (s, 3H, 27-H), 0.77 (s, 3H, 26-H), 0.70 (s, 3H, 30-H), 0.68 (m, 1H, 5-H). – ¹³C-

NMR (CDCl₃, 125.7 MHz): δ = 148.8 (C_q, C-22), 110.1 (CH₂, C-23), 56.1 (CH, C-5), 54.9 (CH, C-17), 50.4 (CH, C-9), 49.4 (CH, C-13), 46.5 (CH, C-21), 44.8 (C_q, C-18), 42.10 (CH₂, C-3), 42.05 (C_q, C-14), 41.89 (C_q, C-8), 41.88 (CH₂, C-19), 40.3 (CH₂, C-1), 37.4 (C_q, C-10), 33.6 (CH₂, C-15), 33.4 (CH₃, C-25), 33.2 (C_q, C-4), 33.2 (CH₂, C-7), 27.4 (CH₂, C-20), 25.0 (CH₃, C-26), 24.0 (CH₂, C-12), 21.7 (CH₂, C-16), 21.6 (CH₃, C-24), 20.9 (CH₂, C-11), 18.7 (2CH₂, C-2, C-6), 16.74 (CH₃, C-29), 16.68 (CH₃, C-28), 16.1 (CH₃, C-30), 15.8 (CH₃, C-27). – **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 410 ([M]⁺, 13), 191 (68), 189 (38), 137 (34), 123 (54), 111 (47), 109 (70), 97 (52), 95 (98), 85 (39), 83 (79), 81 (89), 71 (63), 69 (100), 67 (45), 43 (58), 41 (41).

Poly(β -hydroxybuttersäure) (102): weißer Feststoff, nicht UV-

aktiv. – Keine Anfärbung. – **¹H-NMR** (CDCl₃, 300 MHz): δ = 5.23 (sext, ³*J* = 6.0 Hz, CH), 2.59 (dd, ²*J* = 15.5 Hz, ³*J* = 7.6 Hz, CH₂, H_A), 2.44 (dd, ²*J* = 15.5 Hz, ³*J* = 5.8 Hz, CH₂, H_B), 1.24 (d, ³*J* = 6.0 Hz, CH₃). – **¹³C-NMR** (CDCl₃, 150.8 MHz): δ = 169.1 (COO), 67.6 (CH), 40.8 (CH₂), 19.8 (CH₃).

Komodochinon A (103): C₂₇H₃₁NO₁₀

(529), orange Feststoff, UV-löschend (254

nm). – *R_f* = 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). –

Keine Anfärbung. – *R_t* = 12.4 min (LC-

MS). – **¹H-NMR** ([D₆]DMSO, 600 MHz):

δ = 8.40 (s br, 2H, 2OH) 7.95 (m, 1H, 1-

H), 7.84 (m, 1H, 2-H), 7.74 (m, 1H, 3-H),

5.78 (br s, 1H, 1'-H), 4.97 (m, 1H, 7-H),

4.18 (d br, 1H, 2'-H), 3.98 (q, ³*J* = 6.1 Hz,

1H, 5'-H), 3.83 (d br, 1H, 3'-H), 3.23 (t br, 1H, 4'-H), 2.97 (d, ²*J* = 18.7 Hz, 1H, 10-H_A), 2.57

(d, ²*J* = 18.7 Hz, 1H, 10-H_B), 2.57 (s, 3H, N-CH₃), 2.58 (s, 3H, N-CH₃), 2.02 (d, ²*J* = 13.7 Hz,

1H, 8-H_A), 1.83 (m, 1H, 8-H_B), 1.28 (s, 3H, 13-H), 1.04 (d, ³*J* = 6.1 Hz, 3H, 6'-H). – **(+)-ESI-**

MS: m/z (%) = 1609 [3M+Na]⁺ (44), 1081 [2M+Na]⁺ (100), 1059 [2M+H]⁺ (82), 530 [M+H]⁺

(38). – **(-)-ESI-MS:** m/z (%) = 1080 [2M+Na-2H]⁻ (100), 529 [M-H]⁻ (72).

Komodochinon B (104):

C₁₉H₁₆O₇ (356), roter Feststoff, UV-löschend (254 nm)

und orange fluoreszierend (366 nm). – $R_f = 0.42$

(CH₂Cl₂/ MeOH 95:5). – Keine Anfärbung. – $R_t = 19.6$

min (LC-MS). – ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz): δ

= 13.40 (s br, 1H, 11-OH), 12.06 (s br, 1H, 4-OH),

7.81 (dd, ³J = 7.7 Hz, 7.5 Hz, 1H, 2-H), 7.75 (dd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 1-H), 7.37 (dd,

³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3-H), 5.28 (s, 1H, OH), 4.94 (s br, 1H, 7-H), 3.02 (d, ²J = 18.5

Hz, 1H, 10-H_A), 2.53 (d, ²J = 18.5 Hz, 1H, 10-H_B), 2.05 (dd, ²J = 13.7 Hz, 1H, 8-H_A), 1.84

(dd, ²J = 13.7 Hz, 1H, 8-H_B), 1.32 (s, 3H, 13-H). – ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 150.8 MHz): δ =

189.7 (C_q, C-5), 185.7 (C_q, C-12), 161.4 (C_q, C-4), 156.4 (C_q, C-6), 156.1 (C_q, C-11), 137.9

(C_q, C-6a), 137.1 (CH, C-2), 137.0 (C_q, C-10a), 133.0 (C_q, C-12a), 124.4 (CH, C-3), 118.9

(CH, C-1), 115.9 (C_q, C-4a), 110.3 (C_q, C-5a), 109.6 (C_q, C-11a), 67.5 (C_q, C-9), 61.4 (CH, C-

7), 40.4 (CH₂, C-8), 37.4 (CH₂, C-10), 29.8 (CH₃, C-13). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1091

[3M+Na]⁺ (45), 735 [2M+Na]⁺ (100), 379 [M+Na]⁺ (7). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 733

[2M+Na-2H]⁺ (100), 355 [M-H]⁻ (52).

10.9 *Streptomyces* sp. GW16/3128

Sowohl Agarplatten also auch Mycel und Kulturbrühe vom terrestrischen Stamm *Streptomyces* sp. GW16/3128 waren tief schwarz gefärbt.

10.9.1 Primärscreening

Im Dünnschichtchromatogramm des hellgelben Rohextraktes fiel eine Zone auf, die schwach UV-löschend war und sich mit Anisaldehyd schwarz anfärbte.

Tabelle 13 Aktivität des Rohextraktes von Stamm GW16/3128 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus subtilis</i>	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	18
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	20
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	sehr hoch
<i>Chlorella sorokiniana</i>	40
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	32

10.9.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung von GW16/3128 erfolgte im 20 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit je 200 ml Fleischextrakt-Medium befüllt waren und auf einem Linearschüttler drei Tage bei 28 °C inkubiert wurden. Zum Beimpfen diente eine sechs Tage alte Vorkultur, welche im selben Medium angezüchtet wurde.

Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte wie in Kapitel 10.8.2 beschrieben, wobei sich 3.3 g Rohextrakt ergaben.

10.9.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten aus Chloroform/Methanol (CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 98:2, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 97:3, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 96:4, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1 und 500 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:2) getrennt. Anschließende Trennung an Sephadex LH-20 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:2 und MeOH) und Säulenchromatographie an Kieselgel führte zu 6.4 mg Glykolipid **105**.

Glykolipid 105: $C_{43}H_{80}O_{10}$ (756), weißer Feststoff, schwach UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.20 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (schwarz). – 1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ = 5.33 (t, 2H, 3J = 12.0 Hz), 5.24 (m, 1H, 2-H), 4.79 (d, 3J = 8.3 Hz, 1H, 1'''-H), 4.47 (dd, 2J = 12.0 Hz, 3J = 3.2 Hz, 1H, 1-H_A), 4.20 (dd, 2J = 12.0 Hz, 3J = 6.4 Hz, 1H, 1-H_B), 3.86 (dd, 2J = 11.2 Hz, 3J = 6.4 Hz, 1H, 3-H_A), 3.78 (dd, 2J = 10.5 Hz, 3J = 2.3 Hz, 1H, 6'''-H_A), 3.66 (dd, 2J = 10.5 Hz, 3J = 6.3 Hz, 1H, 6'''-H_B), 3.62 (m, 1H, 3-H_B), 3.60 (m, 1H, 3'''-H), 3.56 (m, 1H, 5'''-H), 3.38 (dd, 3J = 9.2 Hz, 3J = 7.5 Hz, 1H, 2'''-H), 3.30 (m, 1H, 4'''-H), 2.32 (m, 4H, 2'-H, 2''-H), 2.02 (m, 4H), 1.60 (m, 4H, 3'-H, 3''-H), 1.31 (br, 44-H, 22 Alkyl- CH_2), 0.90 (m, 6H, 17'-H, 17''-H). – ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150.8 MHz): δ = 175.0 (C_q , 1'-COO), 174.7 (C_q , 1''-COO), 130.9 (CH), 130.8 (CH), 100.7 (CH, C-1'''), 74.9 (CH, C-3'''), 73.9 (CH, C-5'''), 73.4 (CH, C-2'''), 71.62 (CH, C-2), 71.57 (CH, C-4'''), 67.1 (CH₂, C-3), 63.8 (CH₂, C-1), 62.6 (CH₂, C-6'''), 35.2 (CH₂, C-2'), 35.0 (CH₂, C-2''), 33.1 (CH₂), 33.0 (CH₂), 30.9 (9CH₂), 28.20 (CH₂), 28.17 (CH₂), 26.1 (CH₂, C-3'), 26.0 (CH₂, C-3''), 23.8 (2CH₂, C-16', C-16''), 14.6 (CH₃, C-17', C-17'').

10.10 *Streptomyces* sp. GW12/1492

10.10.1 Primärscreening

Der Rohextrakt zeigte im Dünnschichtchromatogramm zwei auffällige Zonen. Die unpolare Zone besaß eine gelbe Eigenfarbe und färbte sich mit herkömmlichen Sprühreagenzien nicht an, während die polare Zone farblos war, beim Besprühen mit Anisaldehyd und Ehrlichs Reagenz jedoch eine dunkelblaue Farbreaktion einging.

Tabelle 14 Aktivität des Rohextraktes von Stamm GW12/1492 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus subtilis</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	13
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	20
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

10.10.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung erfolgte im 20 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit je 200 ml M₂-Medium befüllt waren und mit einem 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft wurden. Die Fermentation wurde auf einem Linearschüttler bei 28 °C für vier Tage durchgeführt, wobei sich ab dem zweiten Tag eine Gelbfärbung der Kulturbrühe einstellte.

Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte wie in Kapitel 10.8.2 beschrieben. Es ergaben sich so 15.2 g Rohextrakt.

10.10.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten aus Chloroform/Methanol (CHCl₃, CHCl₃/MeOH 99:1, CHCl₃/MeOH 98:2, CHCl₃/MeOH 97:3, CHCl₃/MeOH 96:4, CHCl₃/MeOH 95:5, CHCl₃/MeOH 9:1, CHCl₃/MeOH 4:1 und CHCl₃/MeOH 3:2) getrennt. Nach mehreren Trennversuchen an Kieselgel gelang die Isolierung von 4.7 mg Cervinomycin A₂ (**107**). Aus der zweiten Fraktion konnten durch Säulenchromatographie an Kieselgel 2 g Hexa- und Heptadecansäure (**108**) erhalten werden. Die weitere Auftrennung der dritten Fraktion an Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH) lieferte 2.2 g X-14952B (**106**), während aus Fraktion vier 2.0 mg Anthranilsäureamid und 4.0 mg Phenyllessigsäure isoliert werden konnten.

X-14952B (106): $C_{42}H_{69}NO_{12}$ (779), weißer Feststoff, schwach UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.28 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (dunkelblau), Ehrlich (dunkelblau). – R_t = 20.1 min (LC-MS). – 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 5.61 (s br, 1H, OH), 5.51 (dd, 3J = 15.4 Hz, 8.6 Hz, 1H, 15-H), 5.44 (m, 1H, 5-H), 5.40 (dd, 3J = 10.3 Hz, 5.1 Hz, 1H, 9-H), 5.19 (dd, 3J = 15.4 Hz, 9.6 Hz, 1H, 14-H), 5.03 (s br, 2H, NH_2), 4.82 (dd, 3J = 8.9 Hz, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 4.59 (m, 1H, 3'-H), 4.52 (dd, 3J = 9.8 Hz, 1.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.41 (s, 1H, 7-H), 3.89 (m, 1H, 13-H), 3.50 (m, 1H, 23-H), 3.27 (m, 1H, 17-H), 3.23 (m, 1H, 5'-H), 3.18 (t, 3J = 8.9 Hz, 1H, 4'-H), 2.64 (m, 1H, 24-H), 2.62 (d, 2J = 16.7 Hz, 1H, 2- H_A), 2.54 (d, 2J = 16.7 Hz, 1H, 2- H_B), 2.47 (q, 3J = 7.3 Hz, 2H, 26-H), 2.22 (ddd, 2J = 12.3 Hz, 3J = 5.2 Hz, 1.8 Hz, 1H, 2'- H_A), 2.12 (m, 1H, 16-H), 2.08 (m, 2H, 4-H), 2.06 (m, 1H, 10- H_A), 1.95 (m, 1H, 18-H), 1.83 (m, 1H, 10- H_B), 1.74 (m, 1H, 22-H), 1.64 (m, 1H, 2'- H_B), 1.56 (m, 3H, 12- H_B , 24- CH_2CH_3), 1.55 (m, 1H, 20-H), 1.44 (s, 3H, 6- CH_3), 1.41 (m, 2H, 11- H_A), 1.40 (m, 1H, 12- H_B), 1.36 (s, 3H, 8- CH_3), 1.28 (d, 3J = 6.0 Hz, 3H, 5'- CH_3), 1.20 (m, 1H, 11- H_B), 1.19 (m, 1H, 21- H_A), 1.00 (t, 3J = 7.1 Hz, 3H, 27-H), 0.94 (m, 1H, 21- H_B), 0.90 (d, 3J = 6.7 Hz, 3H, 16- CH_3), 0.86 (d, 3J = 7.0 Hz, 3H, 18- CH_3), 0.84 (t, 3J = 7.4 Hz, 3H, 24- CH_2CH_3), 0.82 (d, 3J = 6.7 Hz, 3H, 20- CH_3), 0.80 (d, 3J = 6.7 Hz, 3H, 22- CH_3). – ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 150.8 MHz): δ = 217.2 (C_q , C-25), 173.5 (C_q , C-1), 157.4 (C_q , 3'-OCONH₂), 134.8 (C_q , C-8), 134.3 (CH, C-14), 134.1 (CH, C-15), 132.9 (C_q , C-6), 129.3 (CH, C-9), 116.8 (CH, C-5), 98.2 (CH, C-1'), 94.0 (C_q , C-3), 82.3 (CH, C-13), 81.9 (CH, C-19), 80.0 (CH, C-7), 77.7 (CH, C-17), 76.7 (CH, C-23), 75.2 (CH, C-3'), 75.0 (CH, C-4'), 71.9 (CH, C-5'), 55.1 (CH, C-24), 43.3 (CH₂, C-2), 42.0 (CH, C-16), 38.0 (CH₂, C-26), 37.0 (CH₂, C-21), 36.8 (CH₂, C-2'), 35.1 (CH₂, C-12), 35.0 (CH₂, C-4), 34.4 (CH, C-18), 33.3 (CH, C-20), 32.5 (CH, C-22), 27.0 (CH₂, C-10), 26.0 (CH₂, C-11), 22.7 (CH₂, 24- CH_2CH_3), 19.2 (CH₃, 6- CH_3), 17.8 (CH₃, 5'- CH_3), 17.1 (CH₃, 16- CH_3), 15.8 (CH₃, 20- CH_3), 12.7 (CH₃, 22- CH_3), 11.7 (CH₃, 24- CH_2CH_3), 10.7 (CH₃, 8- CH_3), 7.2 (CH₃, 27- CH_3), 5.4 (CH₃, 18- CH_3).

Cervinomycin A₂ (107): C₂₉H₂₁NO₉

(527), gelber Feststoff, UV-löschend (254

nm). – R_f = 0.62 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). –Keine Anfärbung. – R_t = 17.9 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz): δ =13.96 (s, 1H, OH), 8.19 (d, ³J = 8.5 Hz,1H, 10-H), 7.96 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, 9-H),

7.60 (s, 1H, 19-H), 7.21 (s, 1H, 7-H), 7.14

(s, 1H, 16-H), 4.25 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, 2-H), 4.04 (m, 1H, 1-H), 4.00 (s, 3H, 17-OCH₃), 4.00 (s, 3H, 18-OCH₃), 3.74 (m, 1H, 1-H),3.32 (d, ³J = 14.8 Hz, 1H, 5-H), 3.23 (d, ³J = 14.8 Hz, 1H, 5-H), 1.41 (s, 3H, 30-H). – ¹³C-NMR (CD₂Cl₂, 150.8 MHz): δ = 182.0 (C_q, C-23), 178.8 (C_q, C-12), 172.7 (C_q, C-21), 165.1(C_q, C-28), 161.6 (C_q, C-26), 156.2 (C_q, C-17), 154.2 (C_q, C-13), 151.4 (C_q, C-15), 149.4 (C_q,C-18), 141.1 (C_q, C-8), 138.2 (C_q, C-24), 137.1 (C_q, C-6), 132.7 (CH, C-9), 130.1 (C_q, C-11),124.0 (CH, C-10), 121.2 (C_q, C-22), 120.0 (C_q, C-25), 119.9 (C_q, C-20), 117.9 (CH, C-7),107.9 (C_q, C-27), 105.1 (CH, C-19), 100.9 (CH, C-16), 92.5 (C_q, C-4), 64.7 (CH₂, C-2), 57.0(17-OCH₃), 56.8 (18-OCH₃), 42.4 (CH₂, C-1), 41.3 (CH₂, C-5), 22.9 (CH₃, C-30). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1077 [2M+Na]⁺ (100), 550 [M+Na]⁺ (18). **Anthranilsäureamid (109):** C₇H₈N₂O (136), farbloser Feststoff, UV-löschend (254 nm), fluoreszierend (366 nm). – R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH95:5). – Anfärbeverhalten: Anisaldehyd (gelb), Ehrlich (gelb). – R_t = 4.2min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.36 (d, ³J = 8.0 Hz,1H, 6-H), 7.23 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 6.68 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, 3-H),6.64 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 5.70 (s br, 4H, 2NH₂). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 136([M]⁺, 91), 119 (100), 92 (50), 65 (22). **10.11 Streptomyces sp. GW 51/456****10.11.1 Primärscreening**

Der Rohextrakt wies eine intensive Gelbfärbung auf. Dünnschichtchromatographie führte zu keiner klaren Trennung der gebildeten Substanzen.

Tabelle 15 Aktivität des Rohextraktes von Stamm GW 1909 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	19
<i>Bacillus subtilis</i>	19
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	13
<i>Candida albicans</i>	12
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	30
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

10.11.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm GW1909 wurde auf zwei Agarplatten (Nährmedium M₂) für 72 h bei 28 °C inkubiert. Die so erhaltenen Kulturen wurden zum Beimpfen von sechs mit je 200 ml Medium befüllten 1 l Schikanekolben verwendet. Diese Vorkulturen wurden anschließend für 72 h bei 28 °C und 95 Upm kultiviert. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte im 20 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit jeweils 200 ml M₂-Medium befüllt und mit ca. 10 ml der Vorkulturen beimpft wurden. Die anschließende Kultivierung erfolgte auf einem Linearschüttler bei 28 °C für drei Tage. Direkte Animpfung aus den Agarplatten führte zu keinem guten Wachstum von dem Stamm. Ab zweitem Tag wurde gelb gefärbte Kulturbrühe beobachtet.

Die Kulturbrühe wurde darauf hin mittels einer Filterpresse über Celite filtriert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde an XAD-2 adsorbiert, das Adsorberharz mit 20 l Wasser gewaschen und mit 10 l Methanol eluiert. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal mit Essigester und dreimal mit Aceton unter Ultraschall-Behandlung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen ergaben nach Entfernung des Lösungsmittels 6.8 g Rohextrakt.

10.11.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten aus Dichlormethan/Methanol (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH 99:1, CH₂Cl₂/MeOH 98:2, CH₂Cl₂/

MeOH 97:3, CH₂Cl₂/MeOH 96:4, CH₂Cl₂/MeOH 95:5, CH₂Cl₂/MeOH 9:1, CH₂Cl₂/MeOH 4:1 und CH₂Cl₂/MeOH 3:2) getrennt. Die zweite Fraktion fiel im Dünnschichtchromatogramm durch eine orange Zone auf und lieferte nach Auftrennung mit Kieselgel und Sephadex (MeOH) 1.8 mg eines Gemisches aus β -Indomycinon (**111**) und Saptomycin A (**112**). Mehrere Trennungsschritte mittels präparativer Dickschichtchromatographie lieferten schließlich 3.7 mg Thiothymin (**110**).

Thiothymin (110): C₅H₆N₂OS (142), weißer Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). – Keine Anfärbung. – ¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ = 7.84 (s, 1H, 6-H), 2.31 (s, 3H, 5-CH₃). – DCI-MS (NH₃): m/z (%) = 177 [M+NH₃+NH₄]⁺ (10), 160 [M+NH₄]⁺ (100), 143 [M+H]⁺ (35). – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 142 ([M]⁺, 48), 86 (10), 68 (34), 43 (38).

β -Indomycinon (111): C₂₄H₂₀O₆ (404), oranger Feststoff, UV-löschend (254 nm) und orange fluoreszierend (336 nm). – R_f = 0.75 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Keine Anfärbung. – R_t = 21.8 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 12.84 (s br, 1H, OH), 8.06 (s, 1H, 6-H), 7.81 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, 8-H), 7.67 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 7.34 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, 10-H), 6.51 (s, 1H, 3-H), 5.70 (m, 1H, 18-H), 5.35 (m, 1H, 17-H), 3.02 (s, 3H, 13-H), 2.90 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 6.7 Hz, 1H, 16-H_A), 2.76 (s br, 1H, OH), 2.75 (m, 1H, 16-H_B), 1.68 (s, 3H, 15-H), 1.62 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, 19-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 831 [2M+Na]⁺, 405 [M+H]⁺.

Saptomycin-A (112): C₂₄H₂₀O₆ (404), oranger Feststoff, UV-löschend (254 nm) und orange fluoreszierend (366 nm). – R_f = 0.70 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5). – Keine Anfärbung mit Anisaldehyd und Ehrlich. – R_t = 20.7 min (LC-MS). – ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 12.63 (s br, 1H, OH), 8.07 (s, 1H, 6-H), 7.81 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, 8-H), 7.67 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 7.34 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, 10-H), 6.25 (s, 1H, 3-H), 5.64 (m, 1H, 18-H), 5.49 (m, 1H, 17-H), 5.00 (m, 1H, 16-H), 3.49 (br d, 1H, OH),

3.02 (s, 3H, 13-H), 2.97 (m, 1H, 14-H), 1.68 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, 19-H), 1.43 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, 15-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 831 $[2M+Na]^+$, 405 $[M+H]^+$.

10.12 *Streptomyces* sp. Mei24

10.12.1 Primärscreening

Das grün gefärbte Rohextrakt des Nordsee-Bakteriums zeigte im Dünnschichtchromatogramm zeigte beim Tageslicht zahlreiche blaue und violette Zonen. Die farblosen und nicht UV-löschenden Zonen wurden mit Anisaldehyd/Schwefelsäure bei der Wärme in verschiedene Farben angefärbt.

Tabelle 16 Aktivität des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. Mei24 im biologischen Screening.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Bacillus subtilis</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	27
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	0
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Candida albicans</i>	13
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	11
<i>Chlorella vulgaris</i>	26
<i>Chlorella sorokiniana</i>	25
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	27

10.12.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Kultivierung von Stamm Mei 24 erfolgte im 20 l Schüttelkultur-Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben, welche mit je 200 ml Mei-Stamm-Medium befüllt und mit einem 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft wurden. Die Fermentation wurde auf einem Linearschüttler bei 28 °C für sechs Tage durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte wie in Kapitel 10.8.2 beschrieben. Es ergaben sich so 1.7 g Rohextrakt.

10.12.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten aus Dichlormethan/Methanol (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 und $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1) getrennt. Weitere chromatographische Aufreinigung der zweiten Fraktion an Kieselgel (Cyclohexan/EE) lieferte 0.8 mg 4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion (**113**) und 0.8 mg 4-Methylamino-7,8-dimethyl-isoquinolin-3,6-dion (**114**). Die dritte Fraktion ergab nach Chromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) 346.5 mg eines Fettsäure-Gemischs. Die restlichen Fraktionen führten nach mehreren chromatographischen Trennschritten an Kieselgel sowie Sephadex zu 0.6 mg Indolcarbonsäure (**33**), 0.4 mg 3-Hydroxyacetylindol (**34**), 2.4 mg Uracil (**35**) und 6.5 mg p-Hydroxybenzoesäure (**36**).

4-Methylamino-7-methyl-isoquinolin-3,6-dion (**113**):

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ (202), roter Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.67 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Ehrlich (orange). – R_t = 11.4 min (LC-MS). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ = 9.13 (s, 1H, 2-H), 7.75 (s, 1H, 7-H), 6.06 (s br, 1H, 4-NH), 5.77 (s, 1H, 5-H), 2.94 (d, 3J = 4.6 Hz, 3H, 4-NHCH₃), 2.70 (s, 3H, 7-H).

4-Methylamino-7,8-dimethyl-isoquinolin-3,6-dion (**114**):

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (216), roter Feststoff, UV-löschend (254 nm). – R_f = 0.70 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). – Anfärbeverhalten: Ehrlich (orange). – R_t = 13.9 min (LC-MS). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ = 9.00 (s, 1H, 2-H), 5.79 (s br, 1H, 4-NH), 5.70 (s, 1H, 5-H), 2.90 (d, 3J = 4.6 Hz, 3H, 4-NHCH₃), 2.73 (s, 3H, 8-H), 2.68 (s, 3H, 7-H). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 217 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (15).

11 Literaturverzeichnis

- ¹ M. H. G. Munro, J. W. Blunt, *MarinLit Database 2002*, University of Canterbury.
- ² D. J. Newman, G. M. Cragg, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1693-1713.
- ³ A. M. S. Mayer, K. R. Gustafson, *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 291-299.
- ⁴ K. L. Rinehart, J. B. Gloer, R. G. Hughes, H. E. Renis, J. P. McGovren, E. B. Swynenberg, D. A. Stringfellow, S. L. Kuentzel, L. H. Li, *Science* **1981**, *212*, 933-935.
- ⁵ G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, E. Arnold, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846-6848.
- ⁶ M. G. Haygood, S. K. Davidson, *Appl. Env. Microbiol.* **1997**, *63*, 4612-4616.
- ⁷ M. Murata, H. Naoki, T. Iwashita, S. Matsunaga, M. Sasaki, A. Yokoyama, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2060-2062.
- ⁸ T. Nonomura, M. Sasaki, N. Matsumori, M. Miata, K. Tachibana, T. Yasumoto, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1675-1678.
- ⁹ M. Spindler, G. S. Dieckmann, *Spektrum der Wissenschaft*, Februar **1991**, 48-57.
- ¹⁰ D. Schröder, *Dissertation*, Universität Göttingen **2001**.
- ¹¹ C. A. Volk, H. Lippert, E. Lichte, M. Koeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *14*, 3154-3158.
- ¹² J. Voss, K. Taraz, H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch. C* **1999**, *54*, 156-162.
- ¹³ Römpp Chemie Lexikon, 4. Auflage, (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **1990**.
- ¹⁴ C. Burk, E. Usleber, E. Martlbauer, *Arch. Lebensmittelhyg.* **1998**, *49*, 16-20.
- ¹⁵ M. Kodama, T. Ogata, S. Sato, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1075-1077.
- ¹⁶ S. Gallacher, E. A. Smith, *Protist* **1999**, *150*, 245-255.
- ¹⁷ M. S. Gil-Turnes, M. E. Hay, W. Fenical, *Science* **1989**, *246*, 116-118.
- ¹⁸ M. S. Gil-Turnes, W. Fenical, *Biol. Bull.* **1992**, *182*, 105.
- ¹⁹ G. M. Lipkind, H. A. Fozzard, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1-13.
- ²⁰ K. Miyazawa, T. Noguchi, *J. Toxicol.-Toxin Rev.* **2001** *20*, 11-33.
- ²¹ U. Simidu, T. Noguchi, D. F. Hwang, Y. Shida, K. Hashimoto, *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 1714-1715.
- ²² M. J. Lee, D. Y. Jeong, W. S. Kim, H. D. Kim, C. H. Kim, W. W. Park, Y. H. Park, K. S. Kim, H. M. Kim, D. S. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1698-1701.
- ²³ E. D. Weinberg, *Perspect. Biol. Med.* **1993**, *36*, 215-221.
- ²⁴ K. G. Wooldridge, P. H. Williams, *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *12*, 325-348.
- ²⁵ B. E. Britigan, G. T. Rasmussen, C. D. Cox, *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1071-1076.
- ²⁶ Y. Dessaux, A. Petit, J. Tempe, *Phytochem.* **1993**, *34*, 31-38.
- ²⁷ J. Köppel, J. Tenczer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 995-1003.
- ²⁸ P. G. M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *J. Chromatogr. A* **2002**, *974*, 161-168.
- ²⁹ L. L. Lopez, P. R. Tiller, M. W. Senko, J. C. Schwartz, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 663-668.
- ³⁰ Laatsch, H. AntiBase 2002, A Natural Products Database for Rapid Structure Determination. Chemical Concepts, Weinheim 2002; see Internet <http://www.gwdg.de/~ucoc/laatsch/>.

-
- ³¹ Autorenkollektiv, *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 12:1, Chapman & Hall, CRC, **2003**.
- ³² M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. HumphreySmith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, *BioTechnology* **1996**, *14*, 61-65.
- ³³ P. Edman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1949**, *22*, 475-483.
- ³⁴ P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- ³⁵ K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 445-463.
- ³⁶ Z. Tozuka, H. Kaneko, T. Shiraga, Y. Mitani, M. Beppu, S. Terashita, A. Kawamura, A. Kagayama, *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 793-808.
- ³⁷ D. A. McCrery, M. L. Gross, *Anal. Chim. Acta* **1985**, *178*, 91-103.
- ³⁸ A. Reis, M. R. M. Domingues, P. Domingues, A. J. Ferrer-Correia, M. A. Coimbra, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1497-1505.
- ³⁹ S. A. Waksman, H. B. Woodruff, *Proc. Soc. Biol. Med.* **1940**, *45*, 609-614.
- ⁴⁰ H. Brockmann, H. Lackner, *Naturwissenschaften* **1960**, *47*, 230-231.
- ⁴¹ H. Lackner, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 400-411.
- ⁴² A. Mauger, E. Katz, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *176*, 181-186.
- ⁴³ H. Schulten in *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, (Hrsg.: H. Morris), Heyden, London, **1981**, s. 27.
- ⁴⁴ A. B. Mauger, O. A. Stuart, J. A. Ferretti, J. V. Silverton, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7154-7163.
- ⁴⁵ J. Greaves, M. McCamish, J. Roboz, *Proceedings of the 32nd ASMS Conference in Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Antonio, TX, **1984**, s. 447.
- ⁴⁶ M. Barber, D. Bell, M. Morris, L. Tetler, M. Woods, B. W. Bycroft, J. J. Monaghan, W. E. Morden, B. N. Green, *Talanta* **1988**, *35*, 605-611.
- ⁴⁷ J. Roboz, E. Nieves, J. F. Holland, M. McCamish, C. Smith, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 67-70.
- ⁴⁸ D. Thomas, M. Morris, J. M. Curtis, R. K. Boyd, *J. of Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1111-1125.
- ⁴⁹ D. W. Russel, *J. Chem. Soc.* **1962**, 753-761.
- ⁵⁰ C. G. Macdonald, J. S. Shannon, *Tetrahedron Lett.* **1964**, *31*, 2087-2092.
- ⁵¹ B. C. Das, P. Varenne, A. Taylor, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 569-574.
- ⁵² H. A. Gillis, D. W. Russell, A. Taylor, J. A. Walter, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 19-21.
- ⁵³ M. S. Gil-Turnes, M. E. Hay, W. Fenical, *Science* **1989**, *246*, 116-118.
- ⁵⁴ L. Liang, *Dissertation* **2003**, Universität Göttingen.
- ⁵⁵ H. P. Zhang, H. Shigemori, M. Ishibashi, T. Kosaka, G. R. Pettit, Y. Kamano, J. Kobayashi, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10201-10206.
- ⁵⁶ H. P. Zhang, Y. Kamano, Y. Ichihara, H. Kizu, K. Komiyama, H. Itokawa, G. R. Pettit, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5523-5528.
- ⁵⁷ Y. Kamano, H. P. Zhang, Y. Ichihara, H. Kizu, K. Komiyama, G. R. Pettit, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *51*, 5523-5528.
- ⁵⁸ J. D. Bu'Lock, D. Drake, D. J. Winstanley, *Phytochem.* **1972**, *11*, 2011-2018.
- ⁵⁹ R. Meganathan, *Cell. Molec. Biol.* **1996**, 642-656.

-
- ⁶⁰ M. S. Gill-Tunes, *Dissertation*, San Diego **1988**.
- ⁶¹ M. D. Collins, D. Jones, *Microbiol. Rev.* **1981**, *45*, 316-354.
- ⁶² R. A. Morton in In *Quinones in Electron Transport*, (Hrsg.: G. E. W. Wolstenholme und C. M. O'Connor), Churchill, London, **1961**, 5-35.
- ⁶³ F. L. Crane in In *Quinones in Electron Transport*, (Hrsg.: G. E. W. Wolstenholme und C. M. O'Connor), Churchill, London, **1961**, 36-78.
- ⁶⁴ B. Soballe, R. K. Poole, *Microbiol.* **1999**, *145*, 1817-1830.
- ⁶⁵ J. R. F. Allen, B. R. Holmstedt, *Phytochem.* **1980**, *19*, 1573-1582.
- ⁶⁶ K. Yomosa, A. Hirota, H. Sakai, A. Isogai, *J. Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 921-922.
- ⁶⁷ S. Inoue, K. Okuda, H. Tanino, H. Kakoi, T. Goto, *Chem. Lett.* **1980**, 297-298.
- ⁶⁸ G. Habermehl, P. Hammann, *Naturstoffchemie*, Springer-Verlag, Berlin, **1992**, s. 151.
- ⁶⁹ X. Fu, F. J. Schmitz, R. S. Tanner, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1950-1954.
- ⁷⁰ M. Lang, P. Spiteller, V. Hellwig, W. Steglich, *Angew. Chem, Int. Ed.* **2001**, *40*, 1704-1705.
- ⁷¹ H. Zhang, W. Jin, Y. Wang, *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* **1990**, *15*, 321-324.
- ⁷² T. Morita, H. Aoki, *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1501-1505.
- ⁷³ R. T. Sherwood, US Patent No. 3179653 (1962); *Chem. Abstr.* **1965**, *63*, 1170.
- ⁷⁴ J. R. Dimmock, *J. Sci. Food Agric.* **1967**, *18*, 368-372.
- ⁷⁵ S. I. Sviridov, B. S. Ermolinskii, *Chem. Nat. Comp.* **1990**, *26*, 691-696.
- ⁷⁶ A. K. Bose, Z. Urbanczyk-Lipkowska, G. V. Subbaraju, M. S. Manhas, S. N. Ganguly, *Oceanogr. Indian Ocean* **1992**, 407-411.
- ⁷⁷ Z. Urbanczyk-Lipkowska, M. Y. Lee, *Pol. J. Chem.* **1992**, *66*, 1805-1811.
- ⁷⁸ R. Jiang, B. Li, C. Xiao, D. Yang, J. Wu, *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* **1997**, *22*, 81-83, 139.
- ⁷⁹ D. Shangguan, R. Jiang, B. Li, C. Xiao, J. Wu, *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* **1999**, *24*, 254-257, 299.
- ⁸⁰ S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi, R. J. Masuma, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 275-282.
- ⁸¹ S. -W. Yang, G. A. Cordell, *J. Nat Prod.* **1997**, *60*, 44-48.
- ⁸² K. Ohta, *Proceedings-International Seaweed Symposium* **1979**, *9*, 401-411.
- ⁸³ K. Ohta, M. Takagi, *Phytochem.* **1977**, *16*, 1085-1086.
- ⁸⁴ P. Mende, M. Siddiqi, R. Preussmann, B. Spiegelhalder, *Cancer Lett.* **1994**, *83*, 277-282.
- ⁸⁵ G. A. Cordell, P. T. O. Chang, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, *Lloydia* **1977**, *40*, 340-343.
- ⁸⁶ G. C. Robinson, *U. S.* **1970**, 5 pp.
- ⁸⁷ M. Siddiqueullah, R. McGrath, L. C. Vining, F. Sala, D. W. S. Westlake, *Can. J. Biochem.* **1967**, *45*, 1881-1889.
- ⁸⁸ R. Cardillo, C. Fuganti, D. Ghiringhelli, D. Giangrasso, P. Grasselli, A. Santopietro-Amisano, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 459-461.
- ⁸⁹ C. J. Chang, H. G. Floss, D. J. Hook, J. A. Mabe, P. E. Manni, L. L. Martin, K. Schroder, T. L. Shieh, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 555-566.
- ⁹⁰ S. Kirner, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 346-347.
- ⁹¹ G. T. Carter, J. A. Nietsche, J. J. Goodman, M. J. Torrey, T. S. Dunne, M. M. Siegel, D. B. Borders, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1271-1273.

-
- ⁹² Y. Li, S. J. Gould, P. J. Proteau, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5181-5185.
- ⁹³ J. Yinon, M. Laschever, *Org. Mass Spectrom.* **1981**, *16*, 264-266.
- ⁹⁴ A. G. Harrison, R. K. M. R. Kallury, *Org. Mass Spectrom.* **1980**, *15*, 284-288.
- ⁹⁵ J. J. Brophy, V. Diakiw, R. J. Goldsack, D. Nelson, J. Shannon, *Org. Mass Spectrom.* **1979**, *14*, 201-203.
- ⁹⁶ T. Karancsi, P. Slegel, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 975-977.
- ⁹⁷ R. G. Gillis, M. J. Lacey, J. S. Shannon, *Org. Mass Spectrom.* **1974**, *9*, 359-364.
- ⁹⁸ R. Surette, L. C. Vining, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 646-652.
- ⁹⁹ R. G. Ackman, C. S. Tocher, J. McLachan, *J. Fish. Res. Board Can.* **1966**, *23*, 357-364.
- ¹⁰⁰ D. C. Yoch, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5804-5815.
- ¹⁰¹ P. Mayser, W. Steglich, H.-J. Kraemer, B. Irlinger, *Ger. Offen.* **2002**.
- ¹⁰² R. H. White, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 5859-5860.
- ¹⁰³ M. R. Hansen, L. H. Hurley, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 249-258.
- ¹⁰⁴ K. W. Glombitza, *Archiv für Mikrobiol.* **1967**, *57*, 39-42.
- ¹⁰⁵ P. Fenn, R. D. Durbin, J. E. Kuntz, *Phytochem.* **1977**, *16*, 899-901.
- ¹⁰⁶ R. P. Maskey, P. N. Asolkar, E. Kapaun, I. Wagner-Döbler, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 643-649.
- ¹⁰⁷ O. S. Kwon, S. H. Park, B.-S. Yun, Y. R. Pyun, C.-J. Kim, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 954-958.
- ¹⁰⁸ J. Watanabe, J. Kawabata, H. Kurihara, R. Niki, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 177-178.
- ¹⁰⁹ H. Cramer, W. Pfleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2114-2136.
- ¹¹⁰ N. Miyairi, H. I. Sakai, T. Konomi, H. Imanaka, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 227-235.
- ¹¹¹ N. Sitachitta, M. Gadepalli, B. S. Davidson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8073-8080.
- ¹¹² H. Kang, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1543-1546.
- ¹¹³ P. Babczinski, M. Dorgerloch, A. Lobberding, H. J. Santel, R. R. Schmidt, P. Schmitt, C. Wunsche, *Pestic. Sci.* **1991**, *33*, 439-446.
- ¹¹⁴ B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70-99.
- ¹¹⁵ H. Seto, T. Sato, S. Urano, J. Uzawa, H. Yonehara, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 4367-4370.
- ¹¹⁶ J. Piel, K. Hoang, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5415-5416.
- ¹¹⁷ J. Piel, C. Hertweck, P. R. Shipley, D. M. Hunt, M. S. Newman, B. S. Moore, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 943-955.
- ¹¹⁸ C. E. Salomon, N. A. Magarvey, D. H. Sherman, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 105-121.
- ¹¹⁹ A. Gogoll, D. Tanner, *Magnet. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 863-871.
- ¹²⁰ M. Brufani, W. Keller-Schierlein, W. Löffler, I. Mansperger, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1968**, *51*, 1293.
- ¹²¹ S. Neunlist, P. Bissleret, M. Rohmer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *171*, 245-252.
- ¹²² M. Rohmer, P. Bouvier, G. Ourisson, *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130*, 1137-1150.
- ¹²³ M. Rohmer, P. Bouvier, G. Ourisson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 847-851.
- ¹²⁴ G. Ourisson, M. Rohmer, K. Poralla, *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 301-303.
- ¹²⁵ D. C. Jordan, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1982**, *32*, 136-139.
- ¹²⁶ A. M. Berry, O. T. Harriott, R. A. Moreau, S. F. Osman, D. R. Benson, A. D. Jones, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6091-6094.
- ¹²⁷ M. Lemoigne, *Ann. Inst. Pasteur* **1925**, *39*, 144.
- ¹²⁸ M. Lemoigne, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1926**, *8*, 770-782; *Ann. Inst. Pasteur* **1927**, *41*, 148.
- ¹²⁹ V. H.-M. Müller, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 483-509.

- ¹³⁰ M. Doudoroff, R. Y. Stainer, *Nature* **1959**, *183*, 1440-1442.
- ¹³¹ R. P. Maskey, I. Kock, M. Shaaban, I. Grün-Wollny, E. Helmke, F. Mayer, I. Wagner-Döbler, H. Laatsch, *Polym. Bull.* **2002**, *49*, 87-93.
- ¹³² T. Itoh, M. Kinoshita, S. Aoki, M. Kobayashi, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1373-1377.
- ¹³³ E. Heinz in *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*, (Hrsg.: M. Tevini, H. K. Lichtenthaler), Springer, Berlin, Heidelberg und New York, **1997**, s. 102-115.
- ¹³⁴ B. W. Nicolas in *The Biology of blue-green algae*, (Hrsg.: N. G. Carr, B. A. Whitton), University of California Press, Berkeley und Los Angeles, **1973**, s. 144-161.
- ¹³⁵ J. Shirakibura, N. Murakami, M. Watanabe, A. Nagatsu, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1664-1666.
- ¹³⁶ H. Kikuchi, Y. Tsukitani, T. Manda, T. Fujii, H. Nakanishi, M. Kobayashi, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3544-3547.
- ¹³⁷ N. Murakami, H. Imamura, J. Sakakibara, N. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3497-3499.
- ¹³⁸ A. Mitsui, D. Rosner, A. Goodman, G. Reyes-Vasques in *Red Tides. Biology, Environmental Science, and Toxicology*, (Hrsg.: T. Okaichi, D. M. Anderson, T. Nemoto), Elsevier, New York, **1989**, s. 367-370.
- ¹³⁹ D. Gordon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 659-663.
- ¹⁴⁰ S. Omura, A. Nakagawa, N. Imamura, K. Kushida, C.-M. Liu, L. H. Sello, J. W. Westley, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 674-676.
- ¹⁴¹ J. W. Westley, C.-M. Liu, L. H. Sello, R. H. Evans, N. Troupe, J. F. Blount, A. M. Chiu, L. J. Todaro, P. A. Miller, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1738-1740.
- ¹⁴² S. Omura, N. Imamura, K. Hinotozawa, K. Otoguro, G. Lukacs, R. Faghiih, R. Tolmann, B. H. arison, J. L. smith, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1783-1786.
- ¹⁴³ G. Werner, H. Hagenmaier, K. Albert, H. Kohlshorn, H. Drautz, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5193-5196.
- ¹⁴⁴ A. Nakagawa, S. Omura, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 301-308.
- ¹⁴⁵ S. Omura, Y. Iwai, K. Hinotozawa, Y. Takahashi, J. Kato, A. Nakagawa, A. Hirano, H. Shimizu, K. Haneda, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 645-652.
- ¹⁴⁶ A. Nakagawa, Y. Iwai, H. Shimizu, S. Omura, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1636-1638.
- ¹⁴⁷ M. R. Hansen, L. H. Hurley, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 249-258.
- ¹⁴⁸ N. Abe, Y. Nakakita, T. Nakamura, N. Enoki, H. Uchida, M. Munekata, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1530-1535.
- ¹⁴⁹ M. Speitling, Dissertation **1998**, Universität Göttingen.
- ¹⁵⁰ M. A. Shaaban Mahmoud, Dissertation **2004**, Universität Göttingen.
- ¹⁵¹ M. M. Joullie, J. K. Puthenpurayil, *J. Heterocyc. Chem.* **1969**, *6*, 697-705.
- ¹⁵² G. R. Pettit, J. C. Collins, D. L. Herald, D. L. Doubek, M. R. Boyd, J. M. Schmidt, J. N. A. Hooper, L. P. Tackett, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1170-1175.

Danksagung

Ein großes Dankeschön richtet sich an Dr. H. Frauendorf, dessen exzellente Betreuung in massenspektrometrischen Fragen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Kultivierung und das biologische Screening der polaren Stämme danke ich Wael Al Zereini und Prof. Dr. H. Anke (Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung, Kaiserslautern). Dr. E. Helmke (Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven) möchte ich für die Bereitstellung der arktischen und antarktischen Bakterienstämme danken.

Dr. I. Grün-Wollny (Institut für Bodenkunde, Lohra-Kirchvers) und Prof. Dr. M. Meiners (Fachhochschule Ostfriesland, Emden) gilt mein Dank für die Bereitstellung der terrestrischen bzw. marinen Streptomyceten.

Bei Herrn Reinhard Machinek, Carola Zolke, Christiane Siebert und Martin Weitemeyer bedanke ich mich für das oft zeitraubende Messen der vielen NMR-Spektren.

Für die Aufnahme der Massenspektren möchte ich mich bei Györgyi Udvarnoki und Gabriele Krökel bedanken.

Friederike Lissy danke ich für die Unterstützung bei mikrobiologischen Arbeiten. Yvonne Bartoschek und Avan Taha gilt mein Dank für UV- und IR-Messungen sowie das chemische Screening von Bakterienstämmen. Andreas Kohl möchte ich für die Herstellung von PDC-Platten und für die Hilfe bei technischen Problemen danken.

Bei Olaf Senge und Frank Hambloch bedanke ich mich für die Unterstützung bei den HPLC- und GC-MS-Messungen.

Jens Bitzer, Prof. Dr. A. Zeeck und Prof. Dr. H. Lackner gilt mein Dank für die Überlassung der Actinomycine.

Marc Corbella und Isis Ricarno danke ich für die Synthesen der Nitroverbindungen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Laatsch möchte ich mich herzlich für das gute Arbeitsklima, die fruchtbaren Diskussionen und die vielen lustigen Stunden außerhalb der Chemie bedanken.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die stets ihr möglichstes getan haben, mich zu unterstützen und – trotz der großen räumlichen Distanz – immer für mich da waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Tim für das sorgfältige Korrekturlesen dieses Manuskripts und die ständige Unterstützung in guten sowie schwierigen Zeiten.

Lebenslauf

Am 03.11.1975 wurde ich als erstes Kind von Lianny Irawati und Putu Laksana Oka in Surabaya, Indonesien geboren.

Von Juli 1982 bis Juni 1988 besuchte ich die St. Don Bosco-Grundschule in Jakarta, Indonesien. Danach wechselte ich zur St. Theresia-Mittelschule (Jakarta), wo ich bis zum Juni 1991 blieb. Anschließend war ich Schülerin der St. Theresia-Oberschule (Jakarta), die ich im Juni 1994 mit Bestehen der Abschlussprüfung verließ.

Von Oktober 1994 bis Juli 1995 besuchte ich im Rahmen der Vorbereitung für ein Studium an einer deutschen Hochschule das Studienkolleg in München.

Zum Wintersemester 1995/1996 begann ich das Studium der Chemie an der Universität Bayreuth, wo ich im Januar 1998 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung bestand. Im Juli 2001 legte ich die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab.

In der Zeit von August 2001 bis April 2002 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Krausch an der Universität Bayreuth meine Diplomarbeit mit dem Titel „AFM-Untersuchung an Biopolymeren“ an.

Seit Juni 2002 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. H. Laatsch an der vorliegenden Dissertation.

Ich besitze die indonesische Staatsangehörigkeit.