

# **Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres**

***- Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung  
der biologischen Aktivität -***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Jan Hiort  
aus Marburg an der Lahn

Düsseldorf, 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent : Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferent : Prof. Dr. Horst Weber

Tag der mündlichen Prüfung : 30.01.2003

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Peter Proksch**

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
erstellt.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Proksch möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die  
interessante und vielseitige Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und  
die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Weber möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme  
des Korreferates bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

---

## 1. Einleitung

---

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Naturstoffe aus Pilzen             | 1  |
| 1.2. Marine Pilze                       | 6  |
| 1.3. Projektvorstellung und Zielsetzung | 13 |

## 2. Material und Methoden

---

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Schwämme des Mittelmeeres - Quelle für marine Pilz- und Bakterien-Isolate | 16 |
| 2.1.1. Sammlung und Aufarbeitung des Schwammmaterials                          | 16 |
| 2.1.1.1. Beschreibung der Tauchplätze  | 16 |
| 2.1.1.2. Ablauf der Probenahme   | 19 |
| 2.1.1.3. Gesammelte Schwammspezies   | 19 |
| 2.1.1.4. Aufarbeitung zur Isolierung der marinen Pilz- und Bakterien-Isolate   | 20 |
| 2.1.2. Untersuchung des Schwammmaterials                                       | 23 |
| 2.1.2.1. Taxonomie   | 23 |
| 2.1.2.2. Elektronenmikroskopie   | 24 |
| 2.1.2.3. Chemische Untersuchung der Schwammextrakte                            | 26 |
| 2.1.3. Anzucht und Extraktion von Kulturen mariner Pilz- und Bakterien-Isolate | 26 |
| 2.1.3.1. Anzuchtbedingungen für marine Pilz- und Bakterien-Isolate             | 26 |
| 2.1.3.2. Extraktion von Kulturen mariner Pilz- und Bakterien-Isolate           | 27 |
| 2.1.4. Charakterisierung und Taxonomie der marinen Pilz-Isolate                | 28 |
| 2.1.5. Salinitätstests   | 30 |
| 2.2. Testung auf Biologische Aktivität   | 30 |
| 2.2.1. Testung auf insektizide Wirkung   | 32 |
| 2.2.1.1. Der Testorganismus <i>Spodoptera littoralis</i>                       | 32 |
| 2.2.1.2. Kulturbedingungen von <i>Spodoptera littoralis</i>                    | 32 |
| 2.2.1.3. Herstellung des Kunstfutters  | 33 |
| 2.2.1.4. Fraßversuche mit <i>Spodoptera littoralis</i>                         | 34 |
| 2.2.2. Testung auf allgemeine Toxizität  | 36 |
| 2.2.2.1. Der Testorganismus <i>Artemia salina</i>                              | 36 |
| 2.2.2.2. Versuchsdurchführung  | 36 |
| 2.2.3. Testung auf antimikrobielle Wirkung                                     | 37 |
| 2.2.3.1. Testorganismen  | 37 |
| 2.2.3.2. Vorbereitungen  | 37 |
| 2.2.3.3. Versuchsdurchführung  | 38 |
| 2.2.4. Testung auf zytotoxische Wirkung  | 38 |
| 2.2.4.1. Der XTT-Test  | 38 |
| 2.2.4.2. Der MTT-Test  | 39 |
| 2.2.4.3. [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau                                     | 40 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|   |    |
|---|----|
| 2.3. Isolierung von Pilzmetaboliten                     | 41 |
| 2.3.1. Flüssig-Flüssig-Verteilung                       | 43 |
| 2.3.2. Dünnschichtchromatographie (DC)                  | 43 |
| 2.3.3. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)               | 44 |
| 2.3.4. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)         | 45 |
| 2.3.5. Säulenchromatographie (SC)                       | 46 |
| 2.3.6. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)       | 47 |
| 2.3.6.1. HPLC-DAD                                       | 47 |
| 2.3.6.2. HPLC-MS <sup>n</sup>                           | 50 |
| 2.3.6.3. Semi-präparative HPLC                          | 51 |
| 2.4. Identifizierung und Strukturaufklärung             | 52 |
| 2.4.1. Massenspektrometrie                              | 53 |
| 2.4.1.1. ESI-MS   | 53 |
| 2.4.1.2. EI-MS  | 54 |
| 2.4.1.3. FAB-MS   | 54 |
| 2.4.1.4. HRMS   | 54 |
| 2.4.2. NMR-Spektroskopie                                | 55 |
| 2.4.2.1. DEPT   | 56 |
| 2.4.2.2. COSY   | 56 |
| 2.4.2.3. nOe-Experimente                                | 57 |
| 2.4.3. IR-Spektroskopie                                 | 57 |
| 2.4.4. Optische Drehung                                 | 57 |
| 2.4.5. CD-Spektroskopie                                 | 58 |
| 2.5. Derivatisierungen                                  | 58 |
| 2.5.1. Marfey-Methode                                   | 58 |
| 2.5.2. Methylierung                                     | 59 |
| 2.5.2.1. Methylierung mit Diazomethan                   | 59 |
| 2.5.2.2. Methylierung mit Methylodid                    | 60 |
| 2.6. Chemikalien, Reagenzien und Chromatographiezubehör | 60 |
| 2.7. Geräte   | 61 |

## 3. Ergebnisse

---

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Ergebnisse der Bearbeitung des Schwammmaterials                  | 63 |
| 3.1.1. Biologisches und chemisches Screening                          | 63 |
| 3.1.2. Elektronenmikroskopie  | 65 |
| 3.2. Ergebnisse der Bearbeitung von Kulturen mariner Bakterienisolate | 66 |
| 3.2.1. Biologisches und chemisches Screening                          | 66 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|  |     |
|--|-----|
| 3.3. Ergebnisse der Bearbeitung von Kulturen mariner Pilzisolat                    | 67  |
| 3.3.1. Biologisches und chemisches Screening                                       | 67  |
| 3.3.2. Isolierung, Identifizierung und Strukturaufklärung von Pilzmetaboliten      | 70  |
| 3.3.2.1. Cycloaspeptid aus <i>Penicillium</i> sp. (E99-1/95)                       | 71  |
| 3.3.2.2. Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium</i> sp. (E99-1/7)                        | 80  |
| a) Citrinin  | 83  |
| b) <i>meta</i> -Chloro- <i>para</i> -hydroxy-phenyl-essigsäureamid                 | 87  |
| 3.3.2.3. Inhaltsstoffe aus <i>Aspergillus niger</i> (E99-3/341)                    | 91  |
| a) Cycloleucomelon   | 95  |
| b) Biscumarin-Derivat  | 99  |
| c) Pyranopyrrol A  | 104 |
| d) Pyranopyrrole B und C   | 109 |
| e) Pyranopyrrol D  | 111 |
| f) Benzylpyridin A   | 114 |
| g) Benzylpyridin B   | 117 |
| 3.3.2.4. Inhaltsstoffe aus <i>Verticillium</i> cf. <i>cinnabarinum</i> (E00-13/33) | 121 |
| a) Indol-3-carboxaldehyd und Indol-3-carboxyl                                      | 123 |
| b) Cyclo(alanyltryptophyl)   | 126 |
| c) Leptosin-Derivat  | 129 |
| 3.3.3. Ergebnisse der Biotests mit Reinsubstanzen                                  | 135 |
| 3.3.3.1. Reinsubstanzen im Agarplatten-Diffusionstest                              | 135 |
| 3.3.3.2. Reinsubstanzen im Fraßversuch mit <i>Spodoptera littoralis</i>            | 135 |
| 3.3.3.3. Reinsubstanzen im <i>brine shrimp assay</i>                               | 136 |
| 3.3.3.4. Reinsubstanzen im Zytotoxizitätstest                                      | 137 |
| 3.3.4. Salinitätstests   | 140 |

## 4. Diskussion

---

|  |     |
|--|-----|
| 4.1. Schwämme als Quelle für marine Isolate von Mikroorganismen                  | 144 |
| 4.2. Das Screening nach neuen biologisch aktiven Naturstoffen                    | 145 |
| 4.3. Biologische Aktivität und chemische Diversität der isolierten Naturstoffe   | 147 |
| 4.3.1. Cycloaspeptid aus <i>Penicillium</i> sp. (E99-1/95)                       | 148 |
| 4.3.2. Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium</i> sp. (E99-1/7)                        | 150 |
| 4.3.3. Inhaltsstoffe aus <i>Aspergillus niger</i> (E99-3/341)                    | 151 |
| 4.3.4. Inhaltsstoffe aus <i>Verticillium</i> cf. <i>cinnabarinum</i> (E00-13/33) | 157 |
| 4.4. "Marine Pilze" oder der Einfluß des Faktors Salz                            | 158 |
| 4.5. Schwammassoziierte Pilze als Quelle für neue Naturstoffe                    | 161 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| <b>5. Zusammenfassung</b>      | 163 |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b> | 168 |
| <b>7. Anhang</b>               | 173 |
| <b>8. Abkürzungen</b>          | 187 |

---





## 1. Einleitung

Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen zur Entwicklung moderner Arzneistoffe, Agrochemikalien und Kosmetika findet die pharmazeutische, biologische und chemische Forschung in der Natur unvergleichliche Ressourcen an chemisch-struktureller Vielfalt, kombiniert mit biologischer Aktivität.

Ungefähr 120.000 bisher bekannte Naturstoffe stehen ca.  $15 \times 10^6$  derzeit verfügbaren synthetischen Verbindungen gegenüber. Dennoch werden die Produkte der Synthesechemie, der kombinatorischen Chemie, der computer-gestützten Wirkstoffentwicklung und der Biokombinatorik das Ergebnis von Millionen Jahren Evolution der chemoökologischen Interaktion verschiedenster Lebensformen zwar vielversprechend ergänzen, aber nicht vollkommen ersetzen können.

Von den 520 zwischen 1983 und 1994 neu zugelassenen Arzneistoffen waren 39 % Naturstoffe oder deren Derivate [Cragg *et al.*, 1997], und neun von 20 der meistverkauften Arzneistoffe im Jahre 1999 waren von Leitstrukturen aus der Natur abgeleitet, wobei Proteine in dieser Statistik nicht berücksichtigt wurden [Harvey, 2000]. Besonders beachtenswert ist die strukturelle Diversität von Naturstoffen. Von den Strukturelementen, die in Naturstoffdatenbanken wie dem "Dictionary of Natural Products" [Chapman and Hall, 2002] zu finden sind, sind 40 % in der synthetischen Chemie nicht vertreten [Henkel *et al.*, 1999].

### 1.1. Naturstoffe aus Pilzen

Pilze sind Kosmopoliten. Neben den allseits bekannten Ständerpilzen in Wäldern und auf Wiesen ist pilzliches Leben auch in Form von Schimmel auf Nahrungsmitteln und feuchten Substraten im Haushalt vertreten. Keimfähige Sporen von verschiedenen Pilzarten sind ubiquitär in der Umwelt und finden sich ebenso in Bodenproben aus den unterschiedlichsten Klimazonen wie in Luftproben, die bei Transatlantik-Flügen gesammelt wurden sowie in Sedimentproben des Meeresgrundes aus über 1000 Metern Tiefe [Johnson *et al.*, 1961].

Derzeit sind insgesamt über 70.000 verschiedene Pilzarten bekannt. Die Sequenzierung pilzlicher ribosomaler RNA, die unmittelbar aus Umweltproben extrahiert und anschließend geklont wurde, läßt aber darauf schließen, daß bisher nur ein Bruchteil der vorkommenden Pilzarten identifiziert und kultiviert werden konnte [Harvey, 2000].

Pilze leben häufig in Symbiosen mit anderen Organismen, sei es in Form der Lebensgemeinschaft Flechte, durch Verknüpfung mit Pflanzen über eine Mykorrhiza oder als Epi- oder Endoparasiten von Pflanzen und Tieren. Mechanischer Schutz vor Fraßfeinden, Parasiten und Konkurrenten ist selbst bei den plektenchymatischen Flechtthalli der Basidiomyceten kaum vorhanden. Die vielen Symbiosen und die hohe Empfindlichkeit des Gewebes waren die treibenden Kräfte für die Entwicklung von biologisch aktiven Verbindungen. Diese Verbindungen haben es möglich gemacht, daß sich die Lebensform Pilz in der Evolution so erfolgreich behaupten konnte.

Bei der Herstellung von Nahrungsmitteln wie Käse, Hefeteig oder Sojasauce und bei der alkoholischen Gärung macht sich der Mensch seit alters her die Stoffwechselfysiologie von Pilzen zunutze. In einigen Kulturkreisen Asiens und Amerikas werden Pilze auch wegen der halluzinogenen Wirkung ihrer Inhaltsstoffe angewandt [Sauter et al., 1999].

1582 wurde in einem Kräuterbuch des Frankfurter Stadtarztes Adam Lonitzer Lonicerus die Anwendung des Mutterkorns als Wehenmittel zum ersten Mal beschrieben, und 1918 isolierte Arthur Stoll aus den Sklerotien des Gräser-Parasiten *Claviceps purpurea* das Ergotamin (**Abb.1**). Heute werden Mutterkornalkaloide durch Wildsammlung der Sklerotien, gezielte Infektion von Roggenfeldern oder durch Kultivierung in Fermentern in großen Mengen gewonnen. Ergotamin ist in Kombination mit Coffein als Migränemittel bekannt. Ergometrin, der Lysergsäureamid-Teil der Verbindung, wird in der Gynäkologie aufgrund der uteruskontrahierenden Wirkung zur Geburtseinleitung verwendet.

1938 synthetisierte Albert Hoffmann im Labor von Arthur Stoll aus der Lysergsäure das Lysergsäurediethylamid und entdeckte zufällig fünf Jahre später die Wirkung des LSD als stärkstes bisher bekanntes Halluzinogen [Steinegger/Hänsel, 1992].

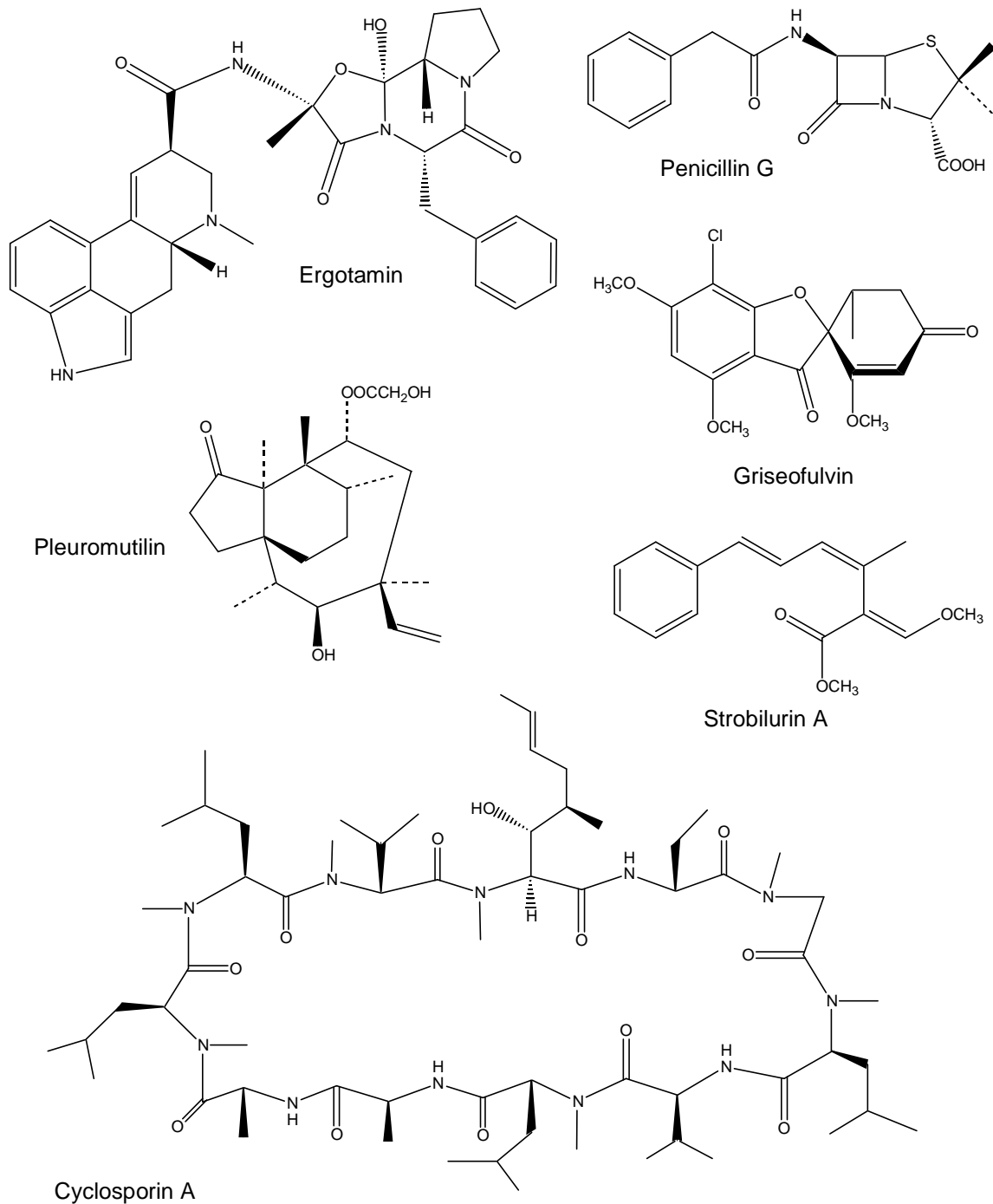
Parallel zur Entwicklung der Mutterkornalkaloide wurden 1923 die ersten Fermentationen mit *Aspergillus-niger*-Kulturen zur biotechnologischen Produktion von Citronensäure durchgeführt. 1928 wurde das Penicillin (**Abb.1**) von Fleming entdeckt und zehn Jahre später wurde es durch Florey und Chain isoliert. Von diesem Moment an gewannen Pilze als Produzenten von Antibiotika und anderen pharmakologisch aktiven Naturstoffen immer mehr an Bedeutung [Dixon, 1995].

So wurde bereits 1939 das Polyketid Griseofulvin aus *Penicillium griseofulvum* isoliert (**Abb.1**). Nach anfänglichem Einsatz gegen phytopathogene Pilze wird der Wirkstoff heute in der Hautpilz-Therapie eingesetzt. 1945 wurde die antibiotische Wirkung eines Wildstammes von *Cephalosporium acremonium* beschrieben [Schneider, 1990]. Bevor 1955 aus Kulturen dieses Pilzes das  $\beta$ -lactamase-stabile Cephalosporin C (**Abb. 3**) isoliert wurde, entdeckten Anchel *et al.* 1950 das antibakterielle Antibiotikum Pleuromutilin (**Abb.1**) aus einem Basidiomyceten aus der Gattung *Clitopilus*. In den 70er Jahren kam das semisynthetische Pleuromutilin-Derivat Tiamulin für den Einsatz in der Veterinärmedizin auf den Markt während in diesem Zeitraum bereits zwei weitere wirtschaftlich bedeutsame Pilzinhaltsstoffe entdeckt wurden.

Strobilurin A (**Abb.1**) ist ein starkes Fungizid mit schwach zytotoxischer Wirkung und wurde 1977 aus dem Kiefernzapfenrübling *Strobilurus tenacellus* isoliert [Anke *et al.*, 1977]. Die Verbindung hemmt die Atmungskette und verhindert auf diese Weise bereits in geringen Konzentrationen die extrem energieaufwendige Keimung von Pilzsporen. Dieser Naturstoff diente als Leitstruktur für die Entwicklung vieler seit Mitte der 90er Jahre im Handel befindlicher Pflanzenschutzmittel [Sauter *et al.*, 1999].

Das Immunsuppressivum Cyclosporin (**Abb.1**) gehörte 1999 zu den 20 meistverkauften Arzneistoffen und wird auch heute noch durch Fermentation aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen [Harvey, 2000]. Der Pilzstamm wurde 1969 aus einer Bodenprobe aus Norwegen isoliert und fiel zunächst dadurch auf, daß er bei anderen Pilzen eine spezifische Art der Verzweigung (Ramifizierung) auslöste. Erst später wurde die spezifische Hemmung der Immunantwort bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation festgestellt [Borel *et al.*, 1995].

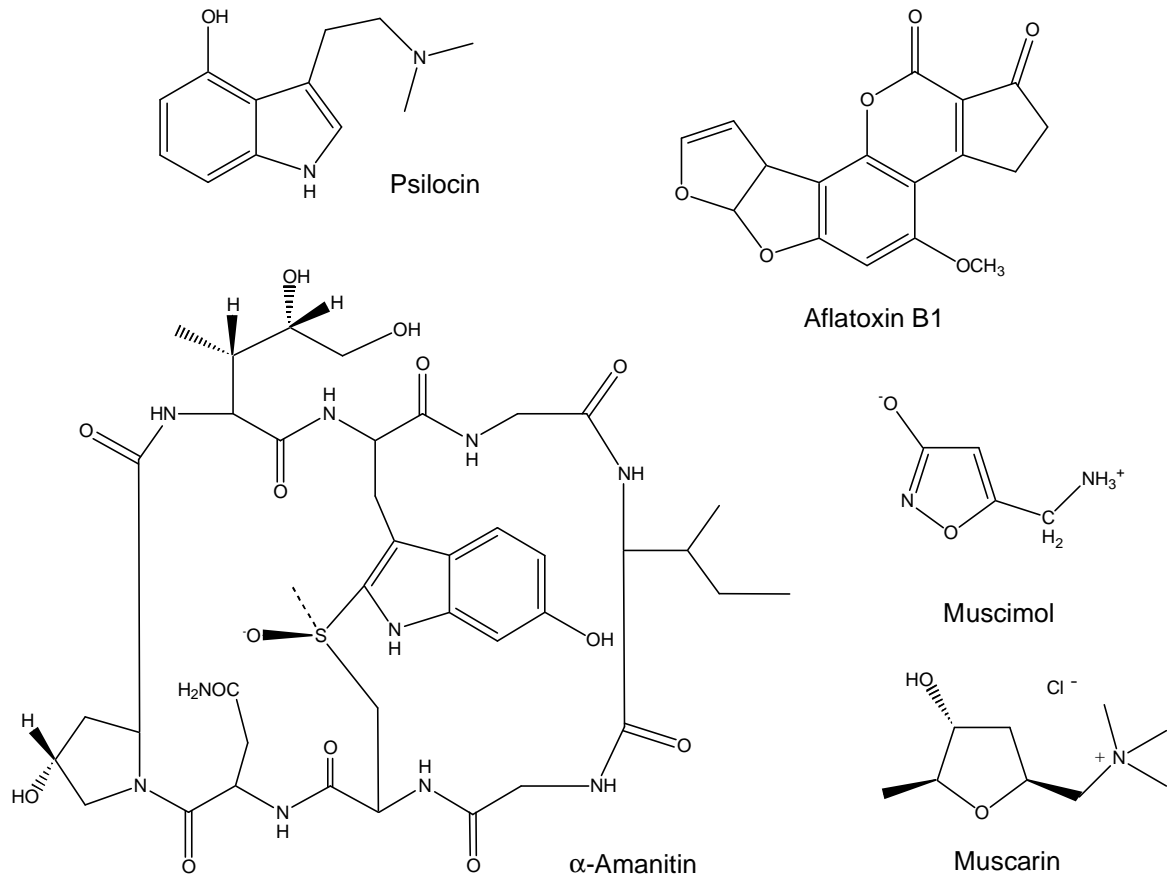
## Einleitung



**Abb. 1:** Biologisch aktive Naturstoffe aus Pilzen I.

Neben den therapeutisch relevanten Inhaltsstoffen sind Pilze auch für ihre zum Teil äußerst giftigen Mycotoxine bekannt. Hierzu zählen die stark cancerogenen Aflatoxine aus *Aspergillus*-Arten, der Acetylcholinrezeptor-Agonist Muscarin aus *Inocybe*- und *Clitocybe*-Arten, das stark psychotrope Psilocin aus dem mexikanischen Zauberpilz sowie das halluzinogene Muscimol und die extrem hepatotoxischen Amatoxine aus *Amanita*-Arten (**Abb.2**).

## Einleitung



**Abb. 2:** Biologisch aktive Naturstoffe aus Pilzen II.

Im Laufe der letzten hundert Jahre lieferten Pilze ein breites Spektrum an bisher unbekanntem Inhaltsstoffen mit biologischer Aktivität. Obwohl terrestrische Pilze nach wie vor intensiv untersucht wurden, nahm aufgrund der Replikation von bekannten Verbindungen die Zahl der aus ihnen isolierten, neuen Naturstoffe in den letzten Jahren ab. [Biabani *et al.*, 1998]. Daher haben Naturstoffchemiker ihre Suche nach neuen Naturstoff-Ressourcen unter anderem auf die Mikroflora der Meere ausgeweitet.

## 1.2. Marine Pilze

Der Lebensraum Meer hat einen Anteil von ungefähr 70 % an der gesamten Erdoberfläche. Das Volumen der Biosphäre des Meeres ist 25 mal größer als das der terrestrischen Biosphäre und reicht von den Eismeeeren der Pole zu den Korallenriffen der Tropen und von den gezeitenabhängig alternierend überfluteten Wattenmeeren in die Tiefen des Mariannengrabens. Hier finden sich so einzigartige Habitats wie die *black smokers* des mittelatlantischen Rückens und die Wälder der Mangroven. Die relativ gering besiedelten offenen Ozeane finden ihren Kontrast in den tropischen Korallenriffen, die hinsichtlich ihrer großen Artenvielfalt und Individuendichte nur den tropischen Regenwäldern vergleichbar sind.

Die Vielfalt des Lebensraums Meer spiegelt sich in der außergewöhnlich hohen Biodiversität seiner Bewohner wieder. So sind von den 33 Stämmen des Tierreichs 28 im Meer vertreten, und 13 dieser Stämme sind im marinen Lebensraum sogar endemisch [Ray *et al.*, 1991].

Seit der Entdeckung der Arabinose-Nukleoside aus dem karibischen Schwamm *Cryptotethya crypta* in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts und der sich daran anschließenden Entwicklung der antiviralen und antitumoralen Analoga Ara-A und -C ist die marine Naturstoffforschung ein sich stetig ausweitender Forschungszweig [König *et al.*, 1996]. Bis 1999 waren bereits über 300 Patente für biologisch aktive marine Naturstoffe erteilt worden, und die Entwicklung einiger Krebstherapeutika reichte bis in die Phase II der klinischen Prüfung (z.B. Halichondrin, Bryostatin, Ecteinascidin), [Proksch *et al.*, 2002].

Ein Problem, das in der marinen Naturstoffforschung bisher häufig aufgetreten ist, ist der mangelnde Nachschub an Substanz für tiefergehende pharmakologische Untersuchungen von Naturstoffen mit vielversprechender biologischer Aktivität beziehungsweise deren klinische Prüfung. Insbesondere war dies dann der Fall, wenn diese Substanzen aus marinen Invertebraten stammten.

Bei einigen der in den letzten 50 Jahren aus marinen Makroorganismen isolierten Verbindungen fallen große strukturelle Gemeinsamkeiten mit mikrobiellen Sekundärstoffen auf. So wurden aus der mikronesischen Seescheide *Eudistoma*

*toealensis* Derivate des Staurosporins isoliert, obwohl Staurosporine bis zu diesem Zeitpunkt nur aus Mikroorganismen bekannt waren [Schupp *et al.*, 1999]. Das Polyketid Pederin ist eine zytotoxische Verbindung, deren Derivate sowohl in Vertretern verschiedener Schwammgattungen zu finden sind, als auch in Käfern der Gattung *Paederus*. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, daß Bakterien für die Pederin-Synthese in den Käfern verantwortlich sind [Kellner *et al.*, 2001]. Ob auch in den Schwämmen Bakterien die Pederin-Produzenten sind, kann bisher allerdings nur vermutet werden.

Das marine Alkaloid Ecteinascidin 743 (ET-743) befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Prüfung als Arzneistoff für die Krebstherapie. Um 1 g dieser Verbindung zu gewinnen, ist die Extraktion von knapp einer Tonne (Frischgewicht) des Manteltierchens *Ecteinascidia turbinata* erforderlich. Versuche, den Tunicaten in Aquakultur anzubauen, sind zwar erfolgreich, die hierdurch erzielten Erträge würden im Falle einer Zulassung des Wirkstoffs den zu erwartenden weltweiten Bedarf aber bei weitem nicht decken können.

Auch ET-743 zeigt in großen Teilen des Moleküls eine hohe Ähnlichkeit zu einem mikrobiellen Naturstoff auf. Von dem Bakterium *Pseudomonas fluorescens* wird Safracin B gebildet, dessen biotechnologische Produktion und partialsynthetische Modifikation zu ET-743 eine wirtschaftlich denkbare Methode zur Gewinnung von genügend Arzneistoff für die weltweite Anwendung wäre [Proksch *et al.*, 2002].

Vor allem in Hinblick auf die Substanzmengen, die für die präklinische und klinische Prüfung sowie im Falle einer späteren, weltweiten Anwendung des neuen Arzneistoffkandidaten erforderlich sind, ist die Frage des ausreichenden Nachschubs an Substanz essentiell. Falls aus der Kultur eines Mikroorganismus eine vielversprechende Verbindung isoliert wird, besteht die Möglichkeit der Nachzucht dieses Stammes in großem Maßstab. Auf diese Weise können die biologischen Ressourcen umweltverträglich genutzt werden und damit entspricht der mikrobielle Ansatz der marinen Naturstoffforschung auch dem Grundsatz der Nachhaltigkeit. Auch aus diesem Grund rückte die marine Mikroflora in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des Interesses der modernen Naturstoffforschung.

Ein weiterer Vorteil des Ansatzes der marinen Naturstoffforschung mit Mikroorganismen ist, daß durch die vielfältigen Experimentiermöglichkeiten (Kulturdauer, Medienzusammensetzung, Temperatur, Schüttel- oder Standkultur) die biologische Diversität der Stammkulturen noch einmal zusätzlich multipliziert werden kann, um ein Maximum an chemischer Diversität der Inhaltsstoffe zu erreichen.

Mitte des 19. Jahrhunderts wurden von Desmazieres, Montagne und Durieu de Maisonneuve zum ersten Mal Pilze aus marinen Habitaten isoliert, und bis 1940 wurden auf diese Weise bereits 50 Arten beschrieben. Auf dem Höhepunkt des Interesses für die marine Mykologie wurden in den 60er Jahren alleine 75 Arten von marinen Substraten isoliert [Kohlmeyer *et al.*, 1979].

Die 321 marinen Pilze, die bis 1991 beschrieben wurden, setzten sich aus 255 Ascomyceten, 60 Fungi imperfecti und nur 6 Basidiomyceten zusammen. Als Quelle dienten so verschiedene Substrate wie Treibgut, Wasser- und Bodenproben sowie die Oberflächen lebender Organismen (unter anderem Algen, Seegräser und Schwämme), [Kohlmeyer *et al.*, 1991]. Später wurde die Liste der Quell-Organismen unter anderem um Mangroven, Fische, Muscheln und Krebse erweitert [Liberra *et al.*, 1995]. 1962 wurden aus einem nicht-identifizierten Schwamm des Nord-Atlantiks die ersten schwamm-assoziierten Hefen und zwei *Fusarium*-Arten isoliert [Siepmann *et al.*, 1962].

Schwämme beherbergen in ihrem Gewebe eine Fülle von assoziierten Bakterien, die sowohl extra- als auch intrazellulär und sogar in den Kernen ihrer Wirtszellen gefunden werden [Friedrich *et al.*, 1999]. Bis zu 40 % der Biomasse eines Schwammes bestehen aus Bakterien, und Schwämme unterscheiden zwischen Tritium-markierten Bakterien in Fütterungsversuchen in der Weise, daß nichtsymbiontische Bakterien bevorzugt verdaut werden [Wilkinson *et al.*, 1984].

In den 30er Jahren fielen Schwämme verschiedener *Hippospongia*-Arten auf Schwammfarmen der Bahamas der Infektion durch einen nicht-identifizierten parasitären Pilz zum Opfer [Johnson *et al.*, 1961].

Für eine den Bakterien vergleichbare ausgeglichene Symbiose von Pilzen mit Schwämmen gibt es aber bis *dato* keine Beweise, und lebende Pilze konnten in Schwämmen bisher nicht identifiziert werden.



Das bloße Isolieren einer Pilzart aus einer marinen Probe ist kein Beweis dafür, daß dieser Pilz tatsächlich im marinen Habitat lebt. Möglicherweise liegt die Art in Form von Sporen oder Hyphenfragmenten im Stadium des latenten Lebens vor. Man unterscheidet demzufolge zwischen fakultativ und obligat marinen Pilzen.

Fakultativ marine Pilze stammen ursprünglich aus dem terrestrischen Habitat oder dem Lebensraum Süßwasser, können aber unter marinen Bedingungen ebenfalls wachsen und gegebenenfalls auch sporulieren. Obligat marine Pilze sind Pilze, die ausschließlich im marinen Habitat wachsen und sporulieren. Hierzu gehören z.B. *Lulworthia*-Arten, *Leptosphaeria australiensis* und *Halosphaeria quadricornuta* [Kohlmeyer *et al.*, 1979]. Der Oberbegriff „marines Pilz-Isolat“ wird vor allem dann verwendet, wenn ein Pilzstamm noch nicht eindeutig als fakultativ oder obligat mariner Pilz identifiziert worden ist.

Der erste Naturstoff aus einem marinen Pilz-Isolat war das oben bereits vorgestellte Cephalosporin C (**Abb. 3**). Der Produzent dieses Antibiotikums wurde 1945 aus dem Meerwasser vor Cagliari auf Sardinien isoliert. Erst 1977 wurde der nächste marine Pilzmetabolit isoliert. Der Gliotoxin produzierende *Aspergillus*-Stamm wurde aus einer Sedimentprobe des Meeresbodens vor der Insel Seto gewonnen. Gliotoxin (**Abb. 3**) ist antibakteriell wirksam gegen *Staphylococcus aureus* und hemmt spezifisch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B [Okutani, 1977 und Pahl *et al.*, 1996].

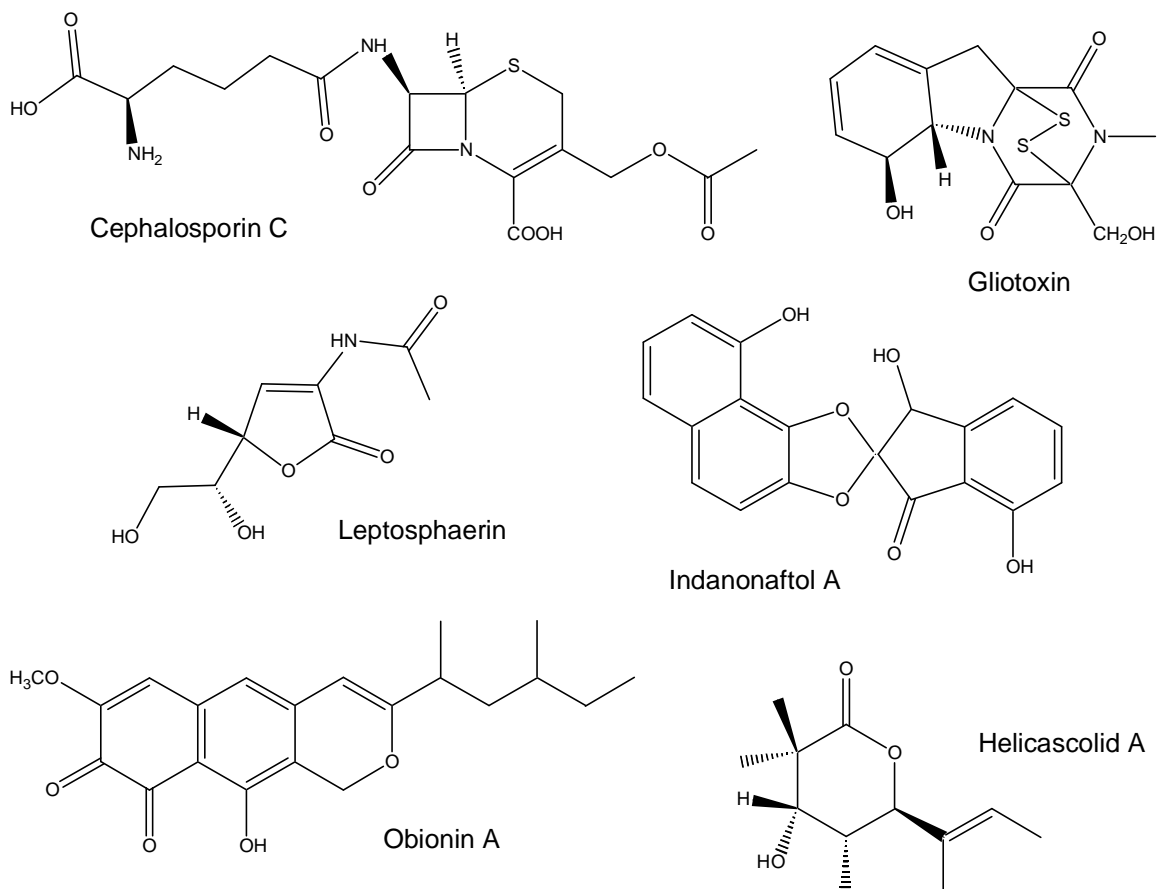
In den folgenden zehn Jahren wurden weniger als zehn weitere Naturstoffe aus marinen Pilzen beschrieben, doch seit dem Ende der 80er Jahre nahm die Zahl der Publikationen auf diesem Feld jährlich zu. So wurde 1993 die erste Verbindung aus einem schwamm-assoziierten Pilz isoliert. Eine Salzmedium-Kultur von *Trichoderma harzianum* aus dem Schwamm *Micale cecilia* produzierte das Polyketid Trichoharzin (**Abb. 3**). Interessanterweise wurde diese Verbindung bei Anzucht auf salzwasserfreiem Medium nicht gebildet [Kobayashi *et al.*, 1993].

Eine Präsentation aller aus marinen Pilzen isolierten Verbindungen würde bereits heute den Rahmen dieser Einleitung sprengen. Von 1993 bis 1998 wurden alleine aus schwamm-assoziierten Pilzen über 40 Naturstoffe beschrieben. Im folgenden wird darum nur eine Auswahl von Verbindungen aus marinen Pilzen vorgestellt, die sich durch besondere strukturelle Merkmale aus der Menge der Naturstoffe hervorheben (**Abb. 3 und 4**).

Der erste Naturstoff, der aus einem obligat marinen Pilz isoliert wurde, war das Leptosphaerin aus *Leptosphaeria oraemaris* [Schiehser *et al.*, 1986]. Drei Jahre später wurde aus einem ebenfalls obligat marinen Vertreter derselben Gattung Obionin A isoliert. *Leptosphaeria obiones* wurde von der Oberfläche des Salzmarschgrases *Spartina alterniflora* isoliert, und Obionin A ist eine der wenigen Verbindungen aus der Natur mit einer *ortho*-Chinon-Struktur. Die Substanz ist ZNS-aktiv und wirkt als kompetitiver Hemmstoff am Dopamin-Rezeptor mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2.5 µg/ml [Poch *et al.*, 1989a].

Aus den Mangroven von Hawaii stammte der Ascomycet *Helicascus kanaloanus*. Dieser Pilz produzierte ungewöhnliche δ-Lactone mit geminalen Methylgruppen, von denen eines das Helicascolid A ist [Poch *et al.*, 1989b].

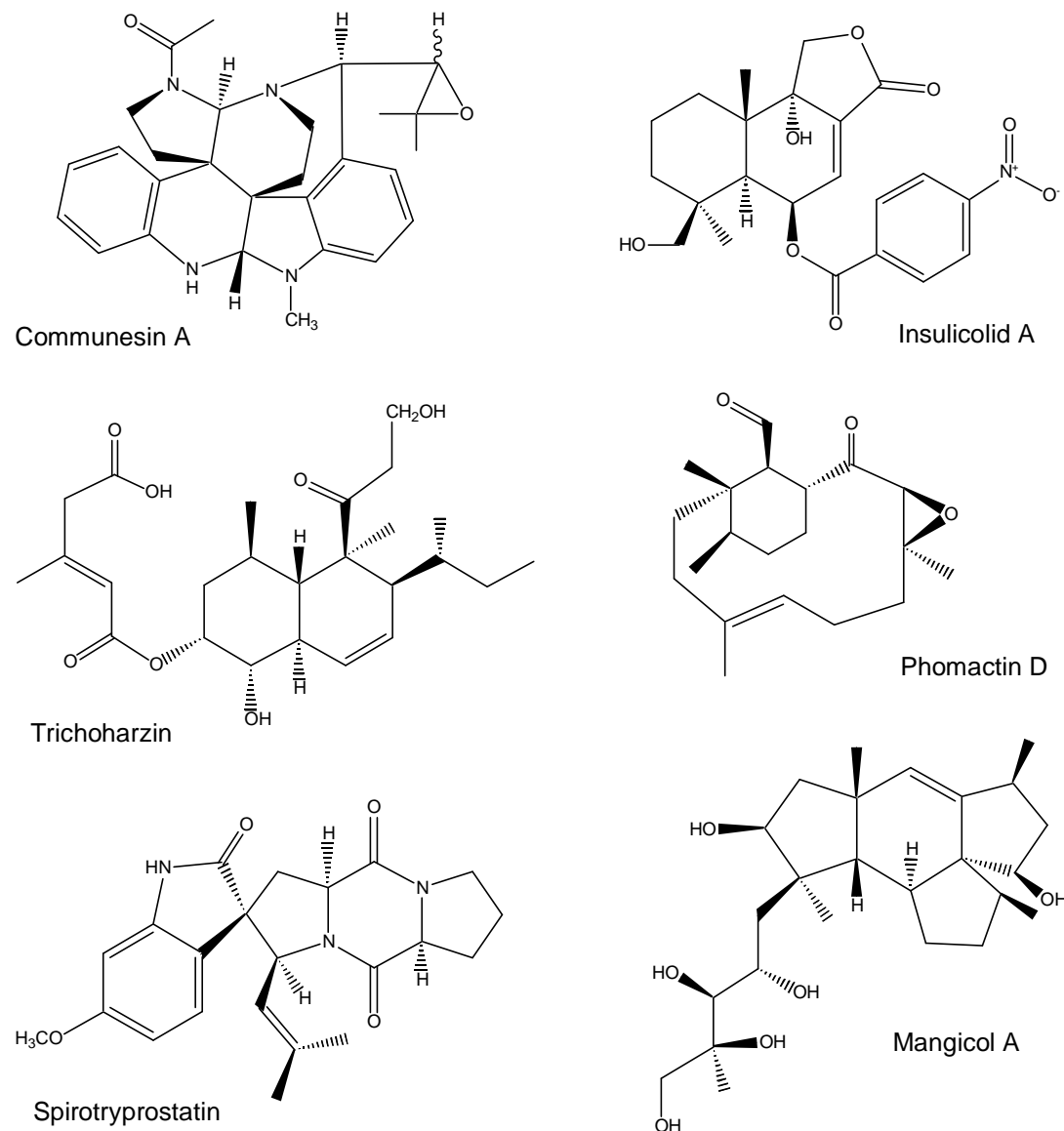
Das Indanonaftol A ist die erste Verbindung, die aus einer marinen Hefekultur beschrieben wurde. Dieses Spiro-Indanon mit einem ungewöhnlichen Kohlenstoffgerüst wurde aus *Hormonema* sp. isoliert [Kodama *et al.*, 1992]



**Abb. 3:** Naturstoffe aus marinen Pilzen I.

1993 wurden aus Kulturen eines mit der Alge *Enteromorpha intestinalis* assoziierten *Penicillium*-Stamms die Alkaloide Communesin A und B isoliert. Beide Verbindungen wirken zytotoxisch gegen P-388-Zellen (lymphozytische Leukämie). Ebenfalls aus einem algen-assoziierten Pilz, *Aspergillus insulicola*, stammte das Sesquiterpen Insulicolid A. Die Besonderheit dieser Verbindung ist die Substitution mit *para*-Nitrobenzoesäure [Rahbaek *et al.*, 1997].

Von der Schale des an der Küste Japans gesammelten Krebses *Chionoecetes opilio* wurde ein Vertreter der Gattung *Phoma* isoliert. Im Ethylacetat-Extrakt der Kulturbrühe aus zwei 600-Liter-Fermentern waren die Phomactine A-G enthalten. Diese Verbindungen hemmen die Blutplättchen-Aggregation mit  $IC_{50}$ -Werten von bis zu  $0.80 \mu\text{M}$  (Phomactin D), [Sugana *et al.*, 1994].



**Abb. 4:** Naturstoffe aus marinen Pilzen II.

Spirotryprostatin A wurde aus einer Kultur des marinen *Aspergillus-fumigatus*-Stamms BM939 isoliert. Diese Verbindung ist ein Diketopiperazin mit einem ungewöhnlichen Spiro-Ringsystem und wirkt zytostatisch durch Hemmung des Zellzyklus in der G2/M-Phase [Cui *et al.*, 1996]. Bemerkenswert ist auch die Ringstruktur des trizyklischen Mangicol A, das von einem marinen Isolat von *Fusarium heterosporum* gebildet wurde [Renner *et al.*, 2000].

Viele der Sekundärstoffe, die zu Beginn dieser Arbeit aus marinen Pilz-Isolaten bekannt waren, sind strukturell ähnlich, zum Teil sogar identisch mit den Inhaltsstoffen terrestrischer Pilze, und zwar gleichermaßen bei fakultativ wie obligat marinen Pilzarten [Pietra, 1997]. Abgesehen von der Tatsache, daß viele Naturstoffe aus marinen Pilzen neu sind, können bei den oben vorgestellten Verbindungen aber auch einige ungewöhnliche Strukturmerkmale ausgemacht werden, die darauf hindeuten, daß das biosynthetische Potential mariner Pilze die chemische Diversität von Naturstoffen eindeutig bereichert [Biabani *et al.*, 1998].

### 1.3. Projektvorstellung und Zielsetzung

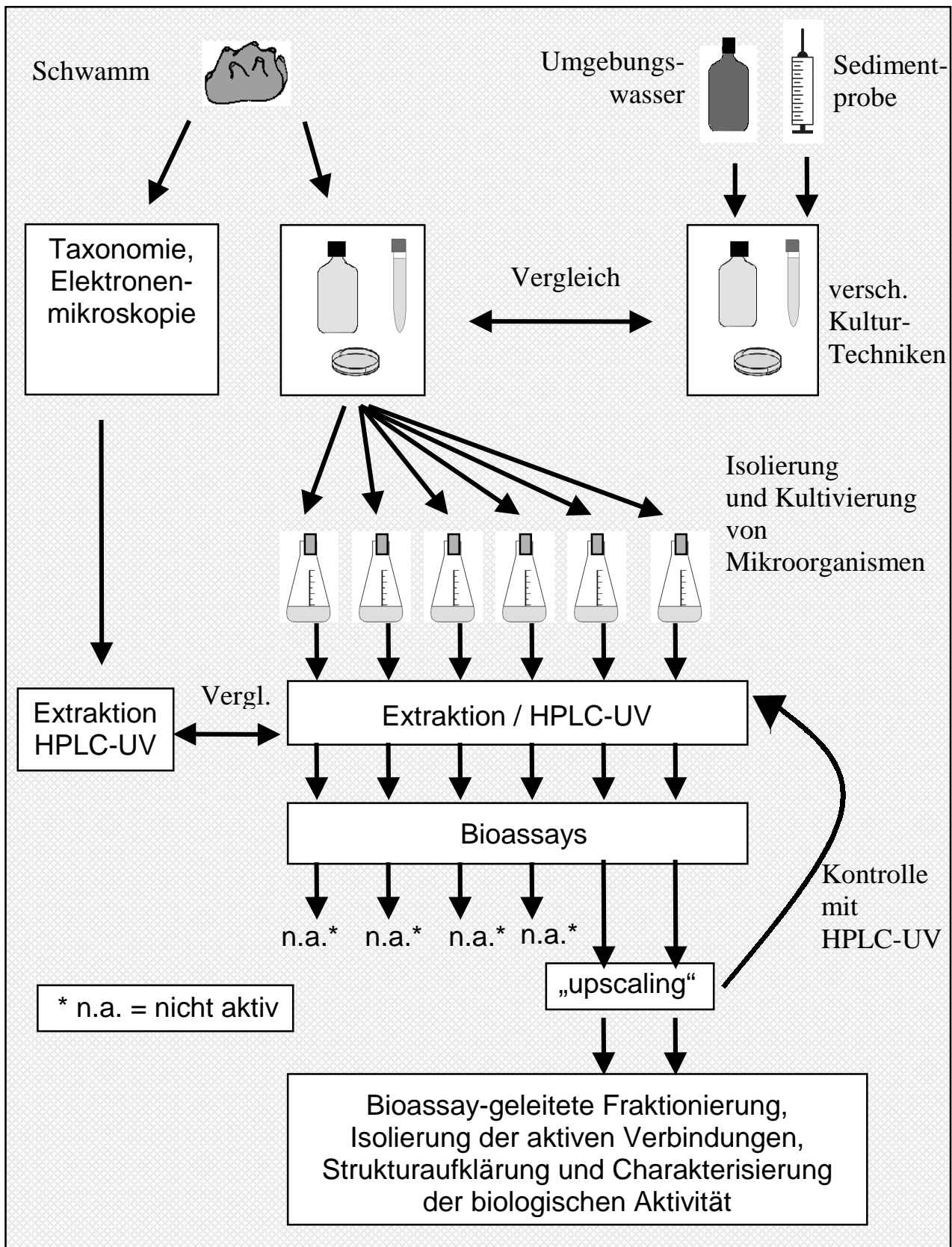
Zu Beginn dieser Arbeit waren nur ca. 5 % der derzeit bekannten ca. 1000 marinen Pilzarten auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht worden. Der Anteil der Verbindungen aus marinen Pilzen am Naturstoffpool lag damit bei weniger als 0.1 % [Schaumann, 1998]. Die mikrobielle Diversität der Meere ist bis heute nur ansatzweise erfaßt worden. Die Sequenzierung ribosomaler RNA, die aus marinem Pikoplankton extrahiert und anschließend geklont wurde, brachte zu Tage, daß hier besonders viele seltene Arten zu vermuten sind [Biabani, 1998].

Das chemische Potential der assoziierten Mikroflora mediterraner Schwämme wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eingehend untersucht. Ein parallel gestartetes Projekt der Firma Biosearch in Italien beschäftigte sich ebenfalls erst seit 1998 mit der Biodiversität und dem Potential der Mikroorganismen des Mittelmeeres [Sponga *et al.*, 1999].

Diese Promotionsarbeit war Teil des BMBF-Verbundprojektes „Bioaktive Naturstoffe: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“ (FKZ 03F0239A). Die Projektpartner waren:

- Dr. K. Schaumann, Marine Mykologie, A.-Wegener-Institut, Bremerhaven
- Prof. Imhoff, Marine Mikrobiologie, Institut für Meereskunde, Kiel
- Prof. Hacker, Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg
- Prof. Bringmann, Organische Chemie, Universität Würzburg
- Dr. Günther, Zentaris AG (vormals Asta Medica), Frankfurt

Auf zwei Sammelexkursionen zum Institut für Meereswissenschaften „Hydra“ in Fetovaia auf der Insel Elba in Italien sollten verschiedene Schwammspezies gesammelt und vor Ort zwecks Isolierung der assoziierten Mikroflora bearbeitet werden. Für die Isolierung und auch für die spätere Anzucht der marinen Mikroorganismen waren die mikrobiologischen Kooperationspartner zuständig.



**Abb. 5:** Schwamm-assoziierte Mikroorganismen als Quelle für neue, biologisch aktive Naturstoffe.

Die gesammelten Schwämme sowie die Kulturen der Mikroorganismen mußten zunächst extrahiert werden. Anschließend sollten diese Extrakte auf biologische Aktivität getestet werden. Zu diesem Zweck sollten vier Testsysteme eingesetzt werden:

1. Zytotoxizitäts-Test
2. Fraßversuche mit Raupen von *Spodoptera littoralis*
3. Testung der allgemeinen Toxizität mit Nauplien von *Artemia salina*
4. Agarplattendiffusionstest auf antibiotische Aktivität

Die Testsysteme wurden so gewählt, daß ein möglichst breites Spektrum an biologischer Aktivität abgedeckt wurde. Die Zytotoxizitäts-Tests sollten im Highthroughput-Verfahren bei der Zentaris AG durchgeführt werden. Die anderen Testsysteme waren bereits im Arbeitskreis etabliert.

Ziel der Arbeit war es, die biologisch aktiven Extrakte des gesammelten bzw. des angezogenen biologischen Materials zu finden und aus ihnen die wirksamen Komponenten durch bioassay-geleitete Fraktionierung zu isolieren. Die so gewonnenen Naturstoffe sollten identifiziert bzw. ihre Struktur aufgeklärt und anschließend ihre biologische Aktivität näher charakterisiert werden (**Abb. 5**).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Schwämme des Mittelmeeres -

#### Quelle für marine Pilz- und Bakterien-Isolate

##### 2.1.1. Sammlung und Aufarbeitung des Schwammmaterials u.a. zur Gewinnung mariner Pilz- und Bakterien-Isolate

Auf zwei Sammelexkursionen zum Institut für Meereswissenschaften „Hydra“ in Fetovaia auf der Insel Elba in Italien wurden im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes FKZ 03F0239A „*Bioaktive Naturstoffe: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen*“ vom 18.04. - 02.05.1999 und vom 04.05. – 22.05.2000 insgesamt 15 verschiedene Schwammspezies gesammelt und vor Ort zwecks Isolierung der assoziierten Mikroflora bearbeitet.

##### 2.1.1.1. Beschreibung der Tauchplätze

Alle Tauchplätze liegen entlang der Westküste der Insel Elba zwischen den Ortschaften Sant´Andrea und Marina di Campo (**Abb. M1**). Alle Tauchgänge wurden in Begleitung von Dipl.-Biol. Andreas Spohr bzw. Dipl.-Biol. Christian Lott vom Institut für Meereswissenschaften „Hydra“ durchgeführt.

##### T1: Capo Sant´Andrea, 42° 48'25"N/10° 08'25"E

Bucht mit langsam abfallendem Sandstrand. Der sandige Untergrund wird durchbrochen von Seegrasswiesen und Felsblöcken, die z.T. zu mehreren Metern Höhe aufgeschichtet sind. Einige Felsen ragen einzeln stehend aus dem Sandboden. Die Felsblöcke bestehen aus den für Elba charakteristischen Plutoniten und sind zum Teil mit biogenem Kalk überzogen.

Am Ufer der Bucht liegt die kleine Ortschaft Sant´Andrea. Die Tauchgänge führten links an der Mole die Sandfläche in nördlich bis nordnordwestlicher Richtung hinab bis z.T. in 15 m Tiefe.



**T2: Punta di Fetovaia, 42° 43'24"N/10° 09'31"E**

Die Punta liegt an der Spitze einer Landzunge, die die Bucht von Fetovaia nach Westen hin abgrenzt. Am Ende der Bucht liegt die kleine Ortschaft Fetovaia. Die Landzunge setzt sich auch unter Wasser – hier allerdings steiler abfallend – fort und bildet mit ihrem Fels ein Blockfeld zwischen 4 und 12 m Tiefe. Die Felsen bestehen größtenteils aus Schiefer und sind auch hier häufig mit einer mehr oder weniger starken Schicht biogenen Kalks überzogen. Südlich der Landspitze befinden sich unter Wasser zwei Canyons, an deren Felswänden in 10 bis 18 m Tiefe zahlreiche Schwammspezies nebeneinander in hoher Dichte anzutreffen sind.

**T3: Scoglio della Triglia, 42° 43'57"N/10° 16'13"E**

Der Tauchplatz befindet sich an einer kleinen Felsinsel in der Bucht von Marina di Campo in einer Tiefe zwischen 10 und 22 m. Das Sammelgebiet zog sich nördlich um die Felsinsel herum und bestand neben einem Blockfeld (nordöstlich) auch aus Steilwänden (nördlich) und einem schmalen Canyon (nordwestlich).

**T4: Capo di Fonza; 42° 44'5"N/10° 17'3"E**

Der Tauchplatz befindet sich am östlichen Ende der Bucht von Marina di Campo und besteht vornehmlich aus einer Steilwand, die in 6 - 8 m beginnt und bis 30 - 40 m senkrecht abfällt. Am Grunde der Wand befindet sich ein Sandfeld. In den Furchen und auf den Fortsätzen der zerklüfteten Wand wachsen viele verschiedene Schwamm- und Korallenspezies nebeneinander. Getaucht wurde hier vornehmlich in Tiefen zwischen 20 und 40 m

**T5: Secca di Corallo, 42° 44'5"N/10° 17'3"E**

Untiefe bis zur Wasseroberfläche 100 m südlich des Kaps südöstlich der Bucht von Lacona. Im Osten steil abfallend auf 34 - 40 Meter. Nach Westen hin flach abfallend mit einigen Blöcken und Coralligène-Feldern. Das Grundgestein wird vom Mittelbaganit (Granodiorit) gebildet und trägt an der Steilwand im Osten und in den kaminartigen Spalten eine stark zerklüftete biogene Kalkauflage von bis zu 1 m Mächtigkeit. Die Proben wurden in den Kavernierungen und Klüften dieser Coralligène-Auflage gewonnen.

**T6: Baia di Fetovaia, 42° 43'24"N/10° 09'31"E**

Getaucht wurde in der Bucht vom Strand aus auf der rechten Seite in Tiefen zwischen 2 und 4 m. Der Fels der Landzunge besteht aus Plutonit. Vereinzelt liegen Blöcke auf der sich anschließenden Sandebene. Dazwischen finden sich Seegrasfelder. Am Ende der Bucht liegt die kleine Ortschaft Fetovaia.

**T7: Baia di Patresi, 42° 47'04"N/10° 05'12"E**

Auf der rechten Seite der Bucht (nördlich) wurde bis zur Landspitze geschnorchelt und anschließend auf ca. 8 m abgetaucht. Bis hierhin setzt sich die Steilküste unter Wasser fort. Im Anschluß befinden sich auf einer Sandebene zwischen Seegrasfeldern z.T. mehrere Meter hohe Blöcke mit z.T. senkrechten und stark mit Schwämmen bewachsenen Wänden. Von der Abtauchstelle wurde die Küstenlinie 20 – 30 m in Richtung Norden verfolgt.



**Abb. M1:** Kartenausschnitt der Insel Elba (die Tauchplätze sind mit T1 bis T7 gekennzeichnet).

### 2.1.1.2. Ablauf der Probenahme

Nachdem eine Probe unter Wasser ausgemacht worden war, wurde sie zunächst fotografiert, während zeitgleich Proben des Umgebungswassers genommen wurden (2 x 1 l in ca. 2 - 4 m Entfernung im Raum vor der Probe). Anschließend wurde der Schwamm möglichst schonend direkt am Ansatz abgeschnitten und mit dem ihn umgebenden Wasser in zuvor sterilisierte Schraubdeckelgefäße bzw. Autoklavierbeutel gegeben. Die Gefäße wurden beim Abtauchen in der Regel in einer Tiefe von 3 - 6 m geflutet.

Schließlich wurde eine Spritze (50 ml) aufgezogen, während mit der Spritzenöffnung in der unmittelbaren Umgebung des Schwamms und an der Stelle, an der der Schwamm entfernt worden war, das Sediment aufgekrazt wurde.

Diese Proben werden als Sedimentproben bezeichnet. Bei jeder Beprobung wurden die Tiefe und die Wassertemperatur bestimmt. Der genaue Ort der Beprobung wurde anhand einer Seekarte der Insel Elba ermittelt.

### 2.1.1.3. Gesammelte Schwammspezies

Die Auswahl der Schwammspezies (**Tab. M1**) wurde unter Berücksichtigung ihrer taxonomischen Stellung, des Standorts und des jeweiligen Habitus getroffen, um ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Schwämmen abzudecken. Es wurde also darauf geachtet, daß neben den im Mittelmeer häufiger vorkommenden Horn-Kiesel-Schwämmen (Demospongiae) auch ein Vertreter der Kalkschwämme (Calcarea), nämlich *Leuconia aspera* gesammelt wurde. Desweiteren wurden die Schwämme an sieben verschiedenen Tauchplätzen in Tiefen zwischen einem und 40 Metern beprobt. Der Habitus der gesammelten Schwämme reicht von flach-krustig (*Hamigera*) über handgroß-kugelig (*Agelas*) oder -verzweigt (*Axinella*) bis hin zu fußballgroß-massig (*Haliclona*). Die Konsistenz des Schwammgewebes variiert zwischen knorpelartig fest (*Chondrosia*), badeschwammartig-faserig (*Spongia*) bis zäh-faserig (*Ircinia*), brüchig (*Petrosia*) und gelartig (*Oscarella*).

| Schwammspezies               | Proben-Code   | ZMA-No.<br>(POR) <sup>a</sup> | Tauch<br>-platz | Tiefe<br>[m] | Temp.<br>[° C] | FG<br>[g] |
|------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------|--------------|----------------|-----------|
| <i>Ircinia fasciculata</i>   | E99-1+ E00-13 | 14391                         | T1              | 10           | 14             | 252       |
| <i>Chondrosia reniformis</i> | E99-2         | 14392                         | T2              | 16           | 15             | 1200      |
| <i>Axinella damicornis</i>   | E99-3         | 14393                         | T3              | 12-20        | 16             | 88        |
| <i>Agelas oroides</i>        | E99-4         | 14394                         | T2              | 10-16        | 15             | 620       |
| <i>Acanthella acuta</i>      | E99-5         | 14395                         | T2              | 15-21        | 13             | 42        |
| <i>Spongia officinalis</i>   | E99-6         | 14396                         | T1              | 11           | 15             | 1840      |
| <i>Hamigera hamigera</i>     | E99-7         | 14397                         | T1              | 10           | 14             | 306       |
| <i>Petrosia ficiformis</i>   | E99-8         | 14398                         | T1              | 11           | 14             | 932       |
| <i>Oscarella lobularis</i>   | E00-5         | - <sup>b</sup>                | T4              | 26-32        | 14             | 124       |
| <i>Axinella verrucosa</i>    | E00-12        | 15866                         | T5              | 25           | 15             | 50        |
| <i>Haliclona valliculata</i> | E00-6         | 15861                         | T4              | 40           | 14             | 850       |
| <i>Leuconia aspera</i>       | E00-11        | 14399                         | T6              | 1-3          | 18             | 30        |
| <i>Ircinia spinosula</i>     | E00-15        | 15863                         | T1              | 5-6          | 17             | 466       |
| <i>Hemimycale columella</i>  | E00-16        | 15865                         | T2              | 4-6          | 15             | 100       |
| <i>Aplysina cavernicola</i>  | E00-9         | 15862                         | T4              | 40           | 14             | 768       |

**Tab. M1:** Mediterrane Schwammspezies zweier Sammelexkursionen nach Fetovaia (Elba)/Italien. Aus dem Probencode kann das Jahr der Probenahme abgelesen werden (E99 = 1999, E00 = 2000). Die ZMA-Nummer beschreibt den Code unter dem die Probe am Zoologisch Museum in Amsterdam hinterlegt ist. Die Salinität des Umgebungswassers lag für alle Proben bei 3.65 %.

<sup>a</sup> Der ZMA-Code besteht aus dem Kürzel POR für Porifera gefolgt von den jeweiligen Ziffern für die einzelnen Schwämme. <sup>b</sup> Keine ZMA-Registrierung für E00-5, da es für diesen Schwamm im Mittelmeer keine Verwechslungsmöglichkeiten gibt.

#### 2.1.1.4. Aufarbeitung des Schwammmaterials im Labor zwecks Isolierung der marinen Pilz- und Bakterien-Isolate

Folgende Schwammspezies wurden im Rahmen dieser Arbeit und damit auch im Rahmen des Teilprojekts AK Proksch im BMBF-Verbundprojekt FKZ 03F0239A „Bioaktive Naturstoffe: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“ bearbeitet: *I. fasciculata*, *A. damicornis*, *A. oroides*, *A. acuta*, *S. officinalis*, *H. hamigera*, *P. ficiformis*.

Von diesen Schwämmen wurden kleine Stückchen direkt eingefroren, um später lyophilisiert, extrahiert und in der HPLC analysiert zu werden. Ein weiteres Stückchen wurde für LC-MS-Experimente in Ethylacetat fixiert und eingefroren. Zusätzlich wurden Gewebeproben für die Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie in gepufferter Glutaraldehyd-Lösung fixiert.

Für die taxonomische Bestimmung wurde ein weiteres Stück Schwamm in EtOH zurückgestellt. Der verbleibende Rest wurde gewogen und zur Extraktion größerer Extraktmengen (für biologisches Screening bzw. Isolierung) in EtOH konserviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

#### Mikrobiologische Aufarbeitung zwecks Isolierung mariner Bakterien-Isolate:

Ansatz Verdünnungsreihe/Ausplattieren: Stücke nach Möglichkeit mehrerer Schwamm-Individuen wurden in kleine Stücke zerschnitten und mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Mit diesem Rohextrakt wurde eine Verdünnungsreihe mit den Stufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  in sterilem Mittelmeerwasser angelegt und mit diesen Nähragarplatten beimpft, wobei in der Regel eine Platte pro Medium und Verdünnung angelegt wurde.

Gewebestücke auf Platten: Es wurden unterschiedliche Gewebetypen des Schwamms mit dem Skalpell voneinander getrennt und auf Nähragarplatten gelegt.

#### Für die einzelnen Isolierungsmethoden wurde TSB 3 Medium eingesetzt:

|                              |                 |                         |
|------------------------------|-----------------|-------------------------|
| TSB, Tryptic Soy Broth       | 0.3, 3 und 30 g | Difco                   |
| (Agar                        | 15 g            | Difco)                  |
| Meerwasser, künstl. (~30 ‰S) | 1000 ml         | Biosal/Aqualine Buschke |
| pH (NaOH/HCl)                | 7.2 - 7.4       |                         |

Im Anschluß an die Exkursion wurden die Bakteriengesellschaften durch das Picken von einzelnen Kolonien in über 3200 axenische Kulturen überführt.

Zusätzlich zu den Elbaproben wurden einige Kulturen aus weiteren Schwammproben isoliert und deren Anzuchten in das Screening integriert. Zu diesen Schwämmen gehören *Halichondria panicea* (Ostsee, Kieler Bucht), *Haliclona oculata* (Nordsee vor Helgoland) und *Aplysina aerophoba* (Mittelmeer bei Banyuls, Frankreich).

Die oben genannten Arbeitsgänge wurden im Falle der Elba-, Nord- und Ostseeproben von Dipl.-Biol. Vanessa Grabowski und Dr. Rüdiger Stöhr vom Institut

für Meereskunde in Kiel durchgeführt. Die Isolate aus *A. aerophoba* sowie deren Anzuchten stammen von Dr. Ute Hentschel vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie an der Universität Würzburg.

Mikrobiologische Aufarbeitung zwecks Isolierung mariner Pilz-Isolate:

Vor der Weiterverarbeitung wurden die Schwämme bzw. Schwammstücke in filtriertem Seewasser gewaschen und mit sterilisiertem Präparationsbesteck zerteilt.

Für die einzelnen Isolierungsmethoden wurden die folgenden Medien eingesetzt:

(a) Hefemedium nach Wickerham mit Meersalz (WS)

|                              |           |                          |
|------------------------------|-----------|--------------------------|
| Hefeextrakt                  | 3 g       | Sigma                    |
| Malzextrakt                  | 3 g       | Merck                    |
| Pepton aus Casein            | 5 g       | Merck                    |
| Glucose                      | 10 g      | Caelo                    |
| (Agar                        | 20 g      | Difco)                   |
| Meerwasser, künstl. (~30 ‰S) | 1000 ml   | Biosal, Aqualine Buschke |
| pH (NaOH/HCl)                | 7.2 - 7.4 |                          |

(b) GPYNS

|   |           |                          |
|---|-----------|--------------------------|
| Ammoniumnitrat $\text{NH}_4\text{NO}_3$ | 1.0 g     | Merck                    |
| Glucose (Monohydrat)                    | 1.0 g     | Merck                    |
| Pepton aus Casein                       | 0.5 g     | Merck                    |
| Hefeextrakt                             | 0.1 g     | Sigma                    |
| (Agar                                   | 16.0 g    | Difco)                   |
| Meerwasser, künstl. (~30 ‰S)            | 1000 ml   | Biosal, Aqualine Buschke |
| pH (NaOH/HCl)                           | 7.2 - 7.4 |                          |

Presswasser: Wenn es möglich war, wurde Wasser aus den Wasserleitungssystemen und dem Gewebe ausgepresst und jeweils 0.1, 0.2 und 0.3 ml davon auf zwei verschiedenen Medien ausgestrichen bzw. in Pinuspollenflaschen angesetzt.

Gewebeproben: Es wurden Gewebeproben von der äußeren Oberfläche, dem Mesohyl und aus dem Bereich des inneren Wasserleitungssystems entnommen und

direkt auf Agarplatten mit verschiedenen Medien und in Pinuspollenkulturen angesetzt.

Homogenisat: Klein geschnittene Schwammstücke wurden mit einem Ultra-Turrax weiter zerkleinert und das daraus resultierende Homogenisat entweder direkt ausplattiert oder mit steriler Seewasservorlage in verschiedenen Verdünnungen (1:3 bis 1:50) filtriert und wie zuvor ausplattiert. Desweiteren wurden Pinuspollenkulturen mit 0.1 - 1 ml Schwammhomogenisat auf 25 ml sterilem Seewasser angesetzt.

Abimpfungen und Isolationen: Die Rohkulturplatten wurden regelmäßig auf auswachsende Pilzmycelien hin kontrolliert und diese in einem möglichst frühzeitigen Stadium abgeimpft und in Reinkultur gebracht.

Erhebung der Luftkeime im Labor: Um eventuelle Kontaminationen aus der Umgebungsluft während der Aufarbeitung erkennen zu können, wurden über unterschiedliche Zeitspannen hinweg die Luftkeime im Labor bestimmt.

Im Anschluß an die Exkursion wurden die Pilzgesellschaften durch das Picken von einzelnen Individuen in über 400 axenische Kulturen überführt.

Die oben genannten Arbeitsgänge wurden von Dr. Karsten Schaumann (E99) und Dipl.-Biol. Stefan Steffens (E00) vom Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven durchgeführt.

## **2.1.2. Untersuchung des Schwammmaterials**

### **2.1.2.1. Taxonomie**

Das Schwammmaterial wurde während der Exkursionen noch vor Ort mit Hilfe der Tauchassistenten Herrn Spohr und Herrn Lott sowie der gängigen Bestimmungsliteratur [u.a. Riedl, 1983] taxonomisch eingeordnet. Zur endgültigen Spezifizierung wurden kleine Stücke der Schwämme in Ethanol eingelegt und an einen Spezialisten für marine Invertebraten, Herrn Prof. R.W.M. van Soest am Zoologisch Institut der Universität Amsterdam, geschickt. Die Ergebnisse der Bestimmung finden sich in Abbildung **M2**.

| <u>Porifera</u>  |  |
|------------------|--|
| Demospongiae     |  |
| Tetractinomorpha |  |
| Hadromerida      |  |
| Chondrosidae     | - <i>Chondrosia reniformis</i> Nardo   |
| Axinellida       |  |
| Axinellidae      | - <i>Acanthella acuta</i> Schmidt<br>- <i>Axinella damicornis</i> Esper<br>- <i>Axinella verrucosa</i> Esper |
| Agelasidae       | - <i>Agelas oroides</i> Schmidt  |
| Ceractinomorpha  |  |
| Halichondrida    |  |
| Hymeniacionidae  | - <i>Hemimycale columella</i> Bowerbank  |
| Poecilosclerida  |  |
| Anchinoidae      | - <i>Hamigera hamigera</i> Schmidt   |
| Petrosiida       |  |
| Petrosiidae      | - <i>Petrosia ficiformis</i> Poiret  |
| Dictyoceratida   |  |
| Spongiidae       | - <i>Spongia officinalis</i> L.  |
| Thorectidae      | - <i>Ircinia fasciculata</i> Schmidt<br>- <i>Ircinia spinosula</i> Schmidt                                   |
| Verongiidae      | - <i>Aplysina cavernicola</i> Schmidt  |
| Calcarea         |  |
| Calcaronea       |  |
| Leucosoleniidae  |  |
| Grantiidae       | - <i>Leuconia aspera</i> Schmidt   |

**Abb. M2:** Taxonomische Einordnung der gesammelten Schwammspezies nach Pulitzer-Finali [1983] und Proll [1998].

### 2.1.2.2. Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung des Schwammgewebes einiger ausgewählter Spezies mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden kleine Stückchen dieser Schwämme direkt nach dem Sammeln in gepufferter Glutaraldehyd-Lösung fixiert:

REM: 6.25 % Glutaraldehyd in 50 mM Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7.4)

TEM: 2.5 % Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylat (pH 7.2)



Die weitere Aufarbeitung der Proben lief wie folgt ab:

**REM:** Das fixierte Schwammstückchen (1 mm x 1 mm) wird zunächst 5 x 5 Minuten mit Sörensenpuffer gewaschen und anschließend mit 30 % (15 min.), 50 % (20 min.), 75 % (30 min.), 90 % (45 min.) Aceton und 100 % (5 x 30 min.) wasserfreiem Aceton entwässert. Daraufhin wird das Stückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in diesem Zustand aufgebrochen, um die Bruchstelle später zu untersuchen. Nach Kritischpunkttrocknung wird die Probe mit Gold bedampft und ist fertig für die Rasterelektronenmikroskopie.

**TEM:** Das fixierte Schwammstückchen (1 mm x 1 mm) wird zunächst 5 x 3 Minuten mit 50 mM Cacodylat (pH 7.2) gewaschen und anschließend mit 2 % OsO<sub>4</sub> über Nacht fixiert (im Abzug). Am nächsten Tag wird die Probe 5 x 3 Minuten mit Wasser gewaschen, um dann erneut über Nacht die Kontrastierung mit 0.5 - 2.0%igem Uranylacetat durchzuführen. Nach fünfmaligem Waschen mit Wasser für 3 Minuten wird anschließend mit 30 % (2 x 15 min.), 50 % (30 min.), 75 % (30 min.), 90 % (30 min.), 96 % (30 min.) und 100 % (3 x 30 min.) Ethanol entwässert. Alle Fixierungs- und Waschschrte werden bei 4° C durchgeführt. Erst beim letzten Entwässerungsschritt mit Ethanol wird auf Raumtemperatur gewechselt. Nach diesem Schritt wird noch dreimal mit Propylenoxid und zweimal mit Propylenoxid - Epon (1:1) gewaschen. Beim zweiten Mal wird die Probe in dem Gemisch über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird 3 x 2 Stunden mit Epon gewaschen und anschließend die Matrix zwecks endgültiger Fixierung für 48 Stunden bei 60° C polymerisiert. Mit dem Mikrotom werden Schnitte für die Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop angefertigt.

Die Anfertigung der Präparate sowie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen liefen unter Anleitung von Claudia Gehrig bei Prof. Krohne in der Elektronenmikroskopie am Lehrstuhl für Zoologie I der Universität Würzburg (REM Zeiss DSM 926, TEM Zeiss EM10 mit 80kV).

### **2.1.2.3. Chemische Untersuchung der Schwammextrakte**

Für die Untersuchung ihrer Inhaltsstoffe wurden von den unter 2.1.1.4. genannten Schwämmen größere Mengen des in Ethanol fixierten Schwammmaterials mit Ethylacetat extrahiert. Diese Extrakte wurden zwischen Cyclohexan und Methanol - Wasser (90:10) ausgeschüttelt. Die Rohextrakte sowie die Fraktionen wurden in der HPLC und der LC-MS analysiert.

### **2.1.3. Anzucht und Extraktion von Kulturen mariner Pilz- und Bakterien-Isolate**

#### **2.1.3.1. Anzuchtbedingungen für marine Pilz- und Bakterien-Isolate**

##### **(a) Anzuchtbedingungen für marine Bakterien-Isolate**

Zur Anzucht von Bakterienkulturen für das Screening wurden 300-ml-Standkulturen in 1-Liter-Erlenmeyerkolben angelegt bzw. größere Volumina (1.2 - 5.6 l) in Glasfermentern angezogen. Als Standardmedium wurde in TSB-3-Medium (wie unter 2.1.1.4., ohne Agar) verwendet. Zum Abstoppen der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und lyophilisiert und das Medium eingefroren.

Die oben genannten Arbeitsgänge wurden im Falle der Elba, Nord- und Ostseeproben von Dipl.-Biol. Vanessa Grabowski und Dr. Rüdiger Stöhr vom Institut für Meereskunde in Kiel durchgeführt. Die Isolate aus *A. aerophoba* sowie deren Anzuchten stammen von Dr. Ute Hentschel vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie an der Universität Würzburg.

##### **(b) Anzuchtbedingungen für marine Pilz-Isolate**

Zur Anzucht von Pilzkulturen für das Screening wurden 300-ml-Standkulturen in 1-Liter-Erlenmeyerkolben angelegt. Als Standardmedium wurde WS-Medium (wie unter 2.1.1.4., ohne Agar) verwendet. In Standkultur bei 20° C wurde die Kultur solange gehalten, bis die im Medium enthaltene Glucose weitgehend verbraucht war

(stationäre Phase). Zum Abstoppen der Inkubation wurden die Anzuchten je Kolben mit 20 ml Ethylacetat überschichtet, in PE-Gefäße überführt und eingefroren.

Vor der Anzucht von Pilzkulturen in großem Maßstab wurde von den ausgewählten Stämmen zunächst eine Zwischenanzucht von 300 ml (Standkultur) angelegt. Sobald die Zwischenanzucht angewachsen war, wurde sie mit dem Flügelrührer vorsichtig homogenisiert, und anschließend zur Inokkulation von ca. 30 x 1-Liter-Erlenmeyerkolben, in denen je 300 ml Medium vorlagen, verwendet (Gesamtkulturvolumen: ca. 10l). Die Kultivierungsbedingungen sowie die Methode zum Abstoppen der Inkubation waren die gleichen wie für die Screening-Anzuchten. Zur Kontrolle der Reinheit und Identität der Großkultur wurde sowohl von der Zwischenanzucht als auch von der Standkultur ein Aliquot ausplattiert und mit der Plattenkultur des Ursprungsstamms verglichen.

Die oben genannten Arbeitsgänge wurden von Dr. Karsten Schaumann und Dipl.-Biol. Stefan Steffens vom Alfred-Wegener-Institut, Bremerhaven durchgeführt.

### **2.1.3.2. Extraktion von Kulturen mariner Pilz- und Bakterien-Isolate**

Für das Screening wurden Kulturbrühe und Zellen bzw. Mycelien nicht voneinander getrennt aufgearbeitet. Je 300 ml Kultur wurde einmal mit 200 ml Ethylacetat am Ultra-Turrax für 10 Minuten extrahiert und anschließend beide Phasen gemeinsam über einen Büchnertrichter filtriert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Ethylacetat-Phase mit 50 ml Wasser gewaschen, um das aus dem Medium stammende Salz weitestgehend zu entfernen (auf diese Weise konnte in einem Vorversuch 20 mg Salz / 100 ml unbeimpften Kontrollmediums abgetrennt werden). Die eingeeengte Ethylacetatphase wurde einer Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen Methanol - Wasser (90:10) und Cyclohexan (jeweils 100 ml) durchgeführt (in Vorversuchen wurde ermittelt, daß sich im Schnitt um die 45 % des Extrakts in der Cyclohexanphase lösen). Die Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung wurden per HPLC (z.T. auch LC-MS) analysiert sowie in das Primärscreening auf biologische Aktivität integriert.

Im Falle der Extraktion von Großanzuchten wurden zunächst Extraktionsexperimente mit einem 300 ml Aliquot der Gesamtkultur durchgeführt. Hierfür wurden Kulturbrühe

und Zellen bzw. Mycelien getrennt aufgearbeitet und mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert (Kulturbrühe mit Ethylacetat und Dichlormethan, Zellen bzw. Mycelien mit MeOH und Dichlormethan). Die verschiedenen Extrakte wurden hinsichtlich der Extraktmenge, ihrer Inhaltsstoffe sowie ihrer biologischen Aktivität untersucht. Je nach Ergebnis wurde entschieden, wie mit dem gesamten Kulturvolumen verfahren werden sollte. Extrahiert wurde jeweils mindestens dreimal, wobei in der Summe das ein- bis zweifache des Kulturvolumens an organischem Lösungsmittel eingesetzt wurde (über 90 % des Extrakts werden in den ersten beiden Extraktionsschritten gewonnen). Die weitere Aufreinigung der so gewonnenen Extrakte lief analog dem Standardextraktionsverfahren für das Screening.

#### **2.1.4. Charakterisierung und Taxonomie der im Rahmen dieser Arbeit chemisch untersuchten marinen Pilz-Isolate**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Extrakte von Großanzuchten von insgesamt vier Pilzstämmen bearbeitet:

##### (a) E99-1/95 (*Penicillium* sp.)

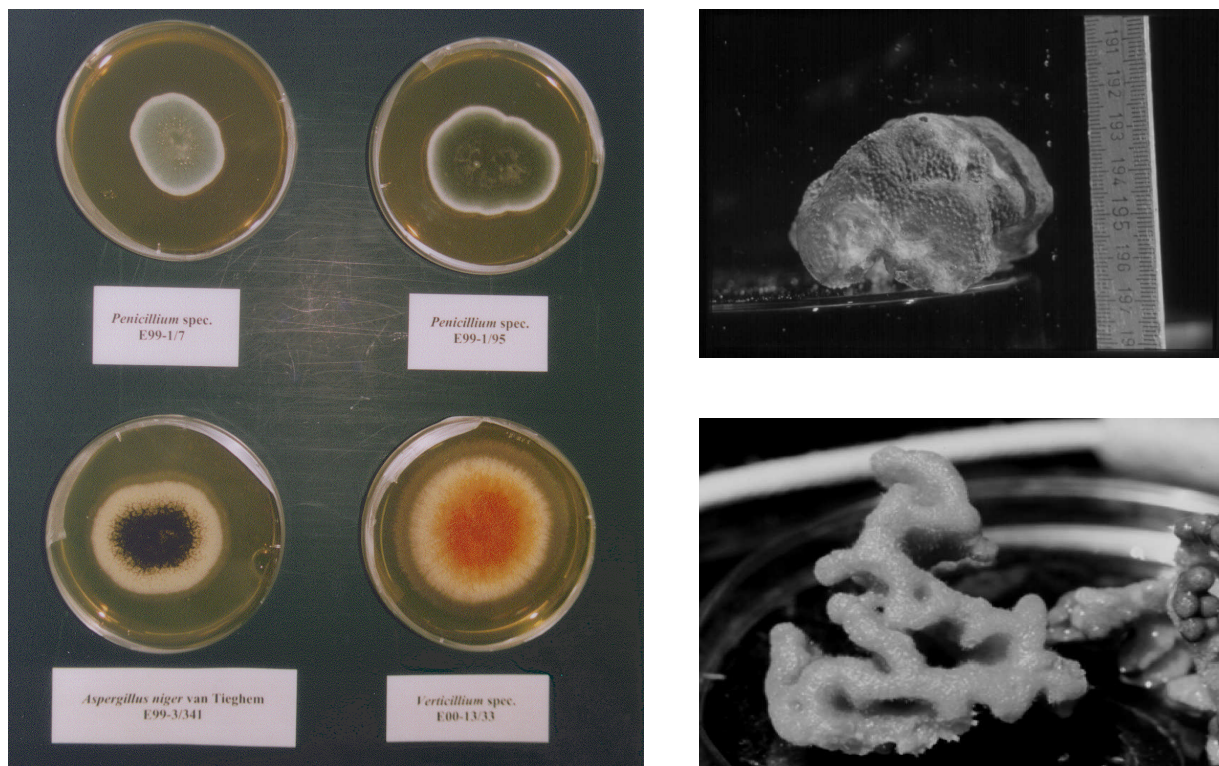
Eine Gewebeprobe (Zupfprobe) aus dem Mesohyl von *Ircinia fasciculata* (E99-1) wurde auf WS-Agar ausgelegt. Aus der hieraus hervorgegangenen Rohkultur wurde nach vier Tagen der *Penicillium*-Stamm E99-1/95 isoliert und wiederum auf WS-Agar, diesmal in Reinkultur angezogen (**Abb. M3**).

##### (b) E99-1/7 (*Penicillium* sp.)

Der *Penicillium*-Stamm E99-1/7 wurde aus dem homogenisierten Schwammgewebe von *Ircinia fasciculata* (E99-1) isoliert. 10 g des Schwammgewebes wurden hierzu in 100 ml sterilem Meerwasser zerkleinert. 2 ml des Filtrats wurden auf WS-Agar ausplattiert. Nach vier Tagen wurde aus der Rohkultur der Stamm E99-1/7 gepickt und wiederum auf WS-Agar, diesmal in Reinkultur angezogen (**Abb. M3**).

(c) E99-3/341 (*Aspergillus niger* van Tieghem)

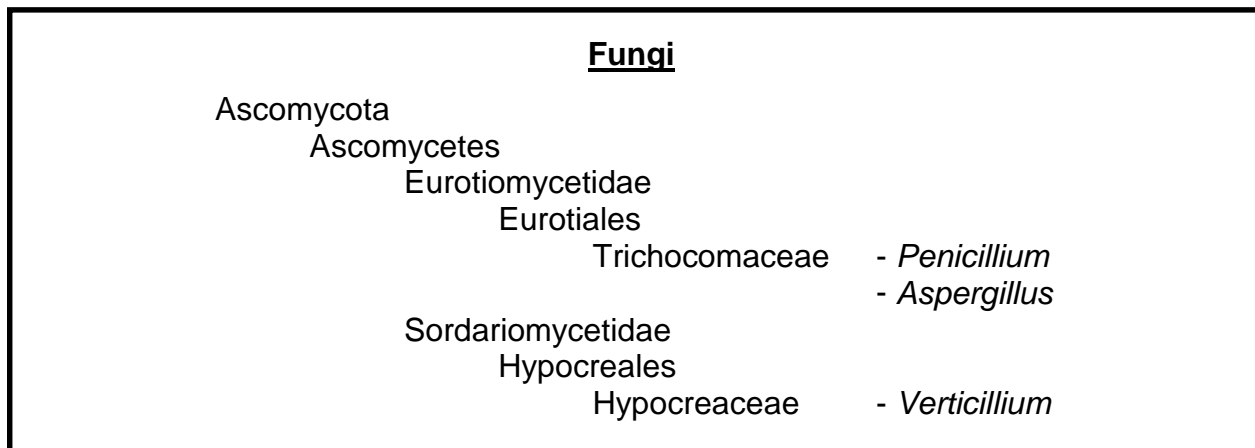
0.1 ml des Preßwassers von *Axinella damicornis* (E99-3) wurden für einen Oberflächenausstrich auf WS-Agar verwendet. Aus dieser Rohkultur wurde nach vier Tagen der Stamm E99-3/341 isoliert. Dieser Stamm wurde auf GPYNS-Agar kultiviert und später vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn/Niederlande als *Aspergillus niger* van Tieghem (Referenz-Nummer: det 146 2002) identifiziert (**Abb. M3**).



**Abb. M3:** Kulturen der Pilzstämme E99-1/7, E99-1/95, E99-3/341 und E00-13/33 auf WS-Agar-Platten (links) und die jeweiligen "Wirts"-Schwämme E99-1 (*Ircinia fasciculata*; rechts oben) und E99-3 (*Axinella damicornis*; rechts unten)

(d) E00-13/33 (*Verticillium cf. cinnabarinum*)

Der *Verticillium*-Stamm E00-13/33 wurde aus dem homogenisierten Mesohyl von *Ircinia fasciculata* (E00-13) isoliert. 10 g des Schwammgewebes wurden hierzu in 100 ml sterilem Meerwasser zerkleinert. 2 ml des Filtrats wurden auf WS-Agar ausplattiert. Nach vier Tagen wurde aus der Rohkultur der Stamm E00-13/33 gepickt und wiederum auf WS-Agar, diesmal in Reinkultur angezogen (**Abb. M3**).



**Abb. M4:** Einordnung der bearbeiteten Pilzgattungen in das taxonomische System nach dem „Ainsworth and Bisby’s Dictionary of the Fungi“ [Kirk *et al.*, 2001].

### 2.1.5. Salinitätstests

Zur Bestimmung des Wachstums und der Produktivität der verschiedenen Stämme in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Mediums wurden Salinitätstests durchgeführt. Hierzu wurden aus den Stammkulturen der vier bearbeiteten Stämme Zwischenkulturen auf WS-Platten angelegt (drei Parallelen). Mit den Zwischenkulturen wurden WS-Flüssigmedien (je 300 ml in 1-Liter-Erlenmeyerkolben) mit drei verschiedenen Salzkonzentrationen („0“, 1.5 und 3.0 %) inokkuliert.

Die Kulturen wurden nach einer Woche optisch beurteilt und fotografiert. Am Ende der Kultivierungszeit wurde die jeweilige Biomasse (Abtropfgewicht) bestimmt, und die Mycelien sowie die Kulturbrühen wurden extrahiert, die Extrakte gewogen und mittels HPLC verglichen.

## 2.2. Testung auf Biologische Aktivität

Die Extrakte der unter 2.1.1.4. genannten Schwämme sowie die Extrakte von aus diesen Schwämmen isolierten Bakterien- und Pilzkulturen wurden einem breiten Screening mit verschiedenen Testsystemen unterzogen, um ihr Potential an biologisch aktiven Verbindungen abschätzen zu können.

**Testsysteme:**

| Aktivität             | Konzentration   |                |
|-----------------------|-----------------|----------------|
|                       | Rohextrakt      | Fraktionen     |
| Zytotoxizität         | <3.2 µg/ml      | <3.2 µg/ml     |
| Insektizide Wirkung   | 1300 – 2600 ppm | 650 – 1300 ppm |
| Antibiotische Wirkung | 250 - 500 µg    | 125 – 250 µg   |
| Allgemeine Toxizität  | 20 – 200 µg/ml  | 10 – 100 µg/ml |

**Auswertung:**

Zytotoxizität als Wachstumshemmung [%]

| Konz. [µg/ml]   | sehr aktiv | aktiv  | schwach aktiv |
|-----------------|------------|--------|---------------|
| <b>3.16</b>     | 100        | 100    | bis 70        |
| <b>0.316</b>    | 100        | bis 70 | bis 50        |
| <b>0.0316</b>   | bis 70     | bis 50 | bis 30        |
| <b>0.00316</b>  | bis 50     | bis 30 | bis 0         |
| <b>0.000316</b> | bis 30     | bis 0  | bis 0         |

Insektizide Wirkung nach 7 Tagen

→ Überlebensrate, ÜR [%] auf Kontrolle

→ Wachstumsrate, WR [%] auf Kontrolle

|           | Konzentration | sehr aktiv | aktiv  | schwach aktiv |
|-----------|---------------|------------|--------|---------------|
| <b>WR</b> | hoch          | 0          | bis 10 | bis 30        |
|           | niedrig       | bis 10     | bis 30 | bis 50        |
| <b>ÜR</b> | hoch          | 0          | bis 50 | bis 100       |
|           | niedrig       | bis 30     | bis 80 | bis 100       |

Antibiotische Wirkung = nach 24 Stunden

→ Wachstumshemmhof um Disc in [cm] Durchmesser

| Dosis        | sehr aktiv | aktiv     | schwach aktiv |
|--------------|------------|-----------|---------------|
| <b>20 µl</b> | ab 1.5 cm  | ab 1.2 cm | ab 0.8 cm     |
| <b>10 µl</b> | ab 1.0 cm  | ab 0.8 cm | -             |

Allgemeine Toxizität nach 24 Stunden

→ Überlebensrate [%] im Vergleich zur Kontrolle und Verhalten

| Konzentration    | sehr aktiv   | aktiv       | schwach aktiv |
|------------------|--------------|-------------|---------------|
| <b>hoch</b>      | 0            | bis 30      | bis 50        |
| <b>niedrig</b>   | bis 30       | bis 50      | bis 100       |
| <b>Verhalten</b> | sehr langsam | verlangsamt | schnell       |

**Abb. M5:** Die vier im Screening eingesetzten Biotests wurden nach diesem Standard-Schema ausgewertet.

Zu diesem Zweck wurden die in **Abb. M5** aufgeführten vier Testsysteme eingesetzt. Zur Ermittlung der bioaktiven Fraktionen auf dem Wege der Isolierung der wirksamen Strukturen und zur Charakterisierung der biologischen Aktivität der isolierten Reinsubstanzen kamen diese Testsysteme ebenfalls zum Einsatz.

### **2.2.1. Testung auf insektizide Wirkung (Fraßversuche mit *Spodoptera littoralis*)**

#### **2.2.1.1. Der Testorganismus *Spodoptera littoralis* BOISD.**

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der insektiziden Wirkung von Extrakten, Fraktionen und Reinsubstanzen aus marinen Pilz-Isolaten wurden die Raupen des polyphagen Nachtfalters *Spodoptera littoralis* BOISD. [Noctuidae, Lepidoptera] verwendet. Die Raupen stammen aus einer langjährigen Laborzucht und werden unter kontrolliert konstanten Bedingungen als Laborpopulation kultiviert.

Die ägyptische Baumwolleule *S. littoralis* ist ein Nachtfalter, der im Mittelmeerraum und in großen Teilen Afrikas verbreitet ist und dort z.T. erhebliche Fraßschäden auf vielen Kulturpflanzenplantagen anrichtet [Broza *et al.*, 1980]. Dieser polyphage Vertreter der Noctuiden [Lepidoptera] frißt an über 112 Pflanzenarten aus 44 Familien und ist damit ein extremer Nahrungsgeneralist [Moussa *et al.*, 1960].

Unter Laborbedingungen ist *S. littoralis* leicht zu halten. Die Raupen können mit künstlicher Nahrung gefüttert werden und durch den kurzen Lebenszyklus von ca. 4 Wochen stehen stets Raupen in allen gewünschten Larvalstadien für Versuche zur Verfügung.

#### **2.2.1.2. Kulturbedingungen von *Spodoptera littoralis* im Labor**

Die Raupen und Falter werden in einem mit 27° C temperierten Kulturschrank bei einer Luftfeuchtigkeit von 70 - 90 % und einer Licht-/Dunkelphase von 16 h/8 h gehalten.

Die Raupen befinden sich nach Entwicklungsstadien getrennt in Kunststoffboxen (20 x 20 x 10 cm). Bei der verwendeten Nahrung handelt es sich um ein Kunstfutter, das aus gemahlener weißen Bohnen, Hefe, Agar-Agar, Vitamin C, einem Antibiotikum und einem Konservierungsmittel besteht (→ 2.2.1.3.).



Am Ende des sechsten Larvalstadiums stellen die Raupen die Nahrungsaufnahme ein, verkürzen sich und beginnen sich zu verpuppen. Dieses Stadium wird als Präpuppe bezeichnet. Die wehrlosen Präpuppen müssen nun aus der Kultur entfernt werden, da sonst Kannibalismus durch andere Raupen auftreten kann.

Auf Vermiculit, einem Silikatmineral, kann die Verpuppung abgeschlossen werden. Dabei graben sich die Präpuppen in das Material ein, wie sie es auch unter natürlichen Bedingungen tun [Gawaad *et al.*, 1974]. Vermiculit eignet sich hierfür, da es gute Wärmeisolationseigenschaften hat und viel Feuchtigkeit aufnehmen kann [Rösler, 1987].

Die fertigen Puppen werden in unbelichteten Kulturschränken bei 26 - 28° C gehalten. Die geschlüpften Falter werden dann in einen Eimer umgesetzt, der wieder einer Licht- / Dunkelphase ausgesetzt wird. Im Eimer steht zur Ernährung der Falter ein mit Zuckerlösung getränktes Stück Watte zur Verfügung. Die Eiablage der Weibchen erfolgt auf Filterpapieren, die im Eimer aufgestellt werden.

Die Gelege der Falter werden schließlich aus dem Papier ausgeschnitten und im Dunkelkulturschrank bis zum Schlüpfen der jungen Raupen (*neonates*) aufbewahrt.

### 2.2.1.3. Herstellung des Kunstfutters

Die Herstellung des Kunstfutters für die Raupenkultur erfolgt nach folgendem Rezept [Shorey and Hale, 1965; Bowling, 1967; Dimetry, 1970]:

150 g weiße Bohnen (*Phaseolus vulgaris*, [Fabaceae]) werden 24 h in 460 ml Wasser gequollen, in einem Mixer zerkleinert und anschließend mit folgenden Ingredientien vermengt:

- 30.0 g Bäckerhefe
- 3.0 g L-(+)-Ascorbinsäure, Merck
- 180.0 mg Gentamycinsulfat (p.a.), Serva
- 3.0 g Nipagin A (p-Hydroxybenzoesäureethylester z. Konserv.), Sigma
- 1.0 ml Formaldehydlösung (min. 37 %, p.a.), Merck

10.0 g Agar-Agar (Merck) werden in 315 ml Wasser durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung im Wasserbad auf ca. 50° C mit der Bohnenmasse im Mixer

homogenisiert. Beim weiteren Abkühlen wird die Masse dann fest und kann direkt verfüttert bzw. ein bis zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Das Kunstfutter für die Biotests mit *Spodoptera littoralis* wird weitestgehend analog hergestellt. Lediglich auf die Zugabe von Gentamycin und Agar-Agar-Lösung wird verzichtet. Die Futtermasse wird stattdessen eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Futter wird dann gemahlen und in der Gefriertruhe aufbewahrt. Dieses Pulver wird für den Biotest eingewogen, mit einer definierten Menge Extrakt bzw. Reinsubstanz versetzt und mit Gentamycin-Lösung und Agar-Agar-Lösung zu einem Futterstück verarbeitet. (→ 2.5.5.1.)

#### **2.2.1.4. Fraßversuche mit *Spodoptera littoralis***

Die Extrakte der Pilz- und Bakterien-Anzuchten für das Screening wurden mittels Fraßversuchen auf Ihre insektizide Aktivität getestet. 2.5 und 5.0 mg des Rohextraktes wurden in ein künstliches Futterstück mit einer Masse von 3.75 g eingearbeitet. Das entspricht einer Konzentration von ca. 650 bzw. 1300 ppm.

Um die insektizide Aktivität der isolierten Reinsubstanzen zu charakterisieren, wurden ebenfalls Fraßversuche durchgeführt. Hierzu wurden definierte Mengen einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Reinsubstanz in das Kunstfutter eingearbeitet.

Auf das Futterstück wurden in einer kleinen Plastikschaale 20 frischgeschlüpfte Raupen (*neonates*) gesetzt, die noch keine Nahrung zu sich genommen hatten. Die Inkubationszeit bei diesem Test betrug bei 26° C im Dunkeln 6 Tage. Nach diesem Zeitraum wurden die überlebenden Raupen gezählt und gewogen.

##### **a) Versuchsdurchführung**

Die Futterstücke (Frischgewicht 3.75 g) für den Fraßversuch wurden aus dem gemahlenden, gefriergetrockneten Futterpulver hergestellt. In einem 30 ml-Becherglas wurden 0.735 g dieses Pulvers pro Portion eingewogen. Der/Die zu untersuchende Extrakt/Substanz wurde in verschiedenen Konzentrationen in 2 ml Methanol gelöst und unter das Futter gerührt. Parallel wurde eine Kontrollportion mit 2 ml 100 % Methanol hergestellt. Über Nacht wurde die Mischung erneut zum Pulver eingetrocknet.

Am nächsten Morgen wurden die getrockneten Portionen zermörsert und jeweils mit den folgenden Zutaten in nachstehender Reihenfolge unter Rühren versetzt:

- 0.75 mg Gentamycinsulfat (p.a., Serva) in 1.41 ml Wasser
- 78 mg Agar-Agar (Merck) in 2.2 ml Wasser

Nach dem Erkalten (mindestens 15 min.) wurden die Futterstücke aus den Bechergläsern herausgelöst und in separate Plastikbecher überführt. Nachdem in jeden Becher 20 *neonates* eingezählt worden waren, wurden diese mit einem Stückchen Stoff verschlossen und in Gruppen von 6 Stück (5 Proben und 1 Kontrolle) in eine Plastikschaale (20 x 20 x 10 cm) gestellt. Die Plastikschaale wurde mit einem luftdurchlässigen Deckel verschlossen, zur Hälfte mit befeuchteten Tüchern abgedeckt und in den Kulturschrank gestellt [Srivastava und Proksch, 1991].

## **b) Auswertung**

Nach 6 Tagen wurde der Fraßversuch ausgewertet. Hierfür wurden die überlebenden Raupen gezählt und gewogen. Aus der Anzahl und dem Gesamtgewicht der überlebenden Raupen wurden die Überlebensrate und die Wachstumsrate relativ zu den jeweiligen Kontrollen berechnet [Abbott, 1925].

$$\text{Überlebensrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl der überlebenden Versuchstiere}}{\text{Anzahl der überlebenden Kontrolltiere}} \times 100 \%$$

$$\text{Wachstumsrate (\%)} = \frac{\text{Durchschnittsgewicht der überlebenden Versuchstiere}}{\text{Durchschnittsgewicht der Kontrolltiere}} \times 100 \%$$

## **2.2.2. Testung auf allgemeine Toxizität (*brine shrimp assay* mit *Artemia salina*)**

### **2.2.2.1. Der Testorganismus *Artemia salina* LEACH**

Bei *Artemia salina* LEACH handelt es sich um einen sehr kleinen Vertreter der Crustaceen, der in natürlichen und künstlichen Salzseen zu finden ist. Die Eier der Artemien sind auch im trockenen Zustand noch nach Jahren keimfähig und können über den Aquaristik-Handel bezogen werden.

*A. salina* wird als Testorganismus in verschiedenen Bereichen eingesetzt, u.a. als Indikator für Pestizid-Rückstände, Mycotoxine, Narkotika, Dinoflagellentoxine, morphinverwandte Substanzen und Phorbolster. Aufgrund der stets für die Anzucht verfügbaren Eier und der geringen Anschaffungskosten ist dieser Organismus ein beliebtes Testsystem bei der Suche nach biologisch aktiven Verbindungen, wobei sich die Aktivität in der toxischen Wirkung auf die frischgeschlüpften Nauplien äußert [Meyer *et al.*, 1982].

### **2.2.2.2. Versuchsdurchführung**

Die Proben wurden im geeigneten organischen Lösungsmittel in 10-ml Schnappdeckelgläschen überführt, getrocknet und anschließend mit 40 µl DMSO als Lösungsvermittler angelöst. Diese Lösung wurde mit künstlichem Meerwasser zunächst auf 2 ml aufgefüllt.

Die Eier von *A. salina* wurden zuvor in einen belüfteten, mit künstlichem Meerwasser (33 g Meersalz ad 1 l demineralisiertes Wasser) gefüllten Inkubator gebracht und zwei Tage lang ausgebrütet. Nach 48 h wurden 20 positiv phototaktische, geschlüpfte Nauplien für die Versuche mit einer Pasteurpipette entnommen und in die Probengläschen transferiert. Anschließend wurde mit künstlichem Meerwasser auf 5 ml aufgefüllt. Die Kontrollansätze enthielten nur Meerwasser plus DMSO [Meyer *et al.*, 1982].

Nach 24 Stunden wird zur Auswertung die Überlebensrate der Artemien bestimmt und die LC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

Die Eier und der Inkubator stammten von der Fa. Dohse und das Meersalz von Sera. Beides wurde über die Aquaristik GmbH in Bonn bezogen.

## 2.2.3. Testung auf antimikrobielle Wirkung (Agarplatten-Diffusionstest)

### 2.2.3.1. Testorganismen

Die antimikrobielle Wirkung der Extrakte der marinen Pilz- und Bakterien-Isolate wurde (noch in Würzburg) gegen folgende Mikroorganismenstämme im Agarplatten-Diffusionstest untersucht: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *E. coli* (Var. HB101) und *Candida albicans*.

Für die Testung der Reinsubstanzen wurden (in Düsseldorf) *B. subtilis*, *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt.

### 2.2.3.2. Vorbereitungen

Der Agarplatten-Diffusionstest wurde nach Bauer und Kirby für Bakterien (DIN 58940, Bauer *et al.*, 1966) und nach Drouhet und Dupont [Drouhet and Dupont, 1978] für *Candida albicans* durchgeführt.

Kolonien der zu testenden Bakterien wurden zunächst bis zur stationären Phase angezogen und abends in 4 ml Tryptose-Soja-Medium (Fa. Sigma) überführt und über Nacht bei 37° C im Schüttler bebrütet. Die entstandene Bakterien-Suspension wurde am nächsten Morgen, sobald sie eine OD<sub>600nm</sub> von 1 erreicht hatte, verdünnt (1:200). Von dieser Lösung wurden 100-200µl auf Müller-Hinton-Agarplatten (Fa. Difco, USA) ausplattiert.

*Candida albicans* wurde mit einer Impfnadel in 10 ml steriles destilliertes Wasser eingebracht. 6 – 8 Tropfen dieser Suspension wurden wiederum mit 10 ml sterilem destilliertem Wasser verdünnt. Diese Suspension entspricht einer Konzentration von 10<sup>3</sup> – 10<sup>4</sup> Keimen/ml. 3 – 4 ml dieser Suspension wurden auf "Yeast Morphology Agar"-Platten (Fa. Difco, USA) aufgebracht. Nach 5 – 10 min. Einwirkdauer wurde die überschüssige Flüssigkeit durch Absaugen mit einer Pipette entfernt, und die Platten wurden für ½ Stunde bei 37° C im Brutschrank getrocknet.

### **2.2.3.3. Versuchsdurchführung**

Die zu untersuchenden Extrakte wurden in Methanol bzw. Hexan (2.5 mg ad 200 µl) gelöst. Hiervon wurden 10 µl bzw. 20 µl jeweils auf eine sterile Filterpapier-Scheibe (d=5mm, Oxoid Ltd.) aufgetragen. Das entspricht Dosen von 125 bzw. 250 µg. Als Kontrolle wurden die reinen Lösungsmittel aufgetragen.

Nach dem Trocknen wurden die Filterpapier-Scheiben auf die beimpften Agarplatten aufgelegt und die Platten 24 Stunden bei 37° C im Kulturschrank inkubiert.

Zur Auswertung wurden die Hemmhöfe um die Filterpapier-Scheiben ausgemessen.

Die Versuche wurden am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

### **2.2.4. Testung auf zytotoxische Wirkung**

#### **(XTT- bzw. MTT-Proliferations-/Zytotoxizitätstest)**

In diesem Testsystem wird der Einfluß von Substanzen auf das Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien untersucht bzw. es wird das zytotoxische Potential der Testsubstanzen erfaßt.

Die Anzahl der vitalen Zellen wird dabei über deren mitochondriale Aktivität (Dehydrogenierung eines Tetrazolium-Salzes zu einem Formazan-Farbstoff) bestimmt.

#### **2.2.4.1. Der XTT-Test für das Screening im High-Throughput-Verfahren**

##### **a) Eingesetzte Zelllinien**

- I) KB: Zelllinie, aus epidermalen Karzinom der Mundhöhle (adhärent).
- II) L1210: Zellen einer lymphatischen Leukämie der Maus (Suspensionskultur).
- III) SK-OV-3: Ovarialkarzinomzellen (adhärent).
- IV) MCF-7: Humane Mamma-Adenokarzinom-Zellen (adhärent).

## **b) Versuchsdurchführung**

Für das Primärscreening der Extrakte wurde die Vitalität der Zellen anhand ihrer Kapazität bei der Dehydrogenierung des gelben XTT-Salzes zu einem orangen Formazan-Farbstoff bestimmt [Scudiero *et al.*, 1988].

Die Tumorzellen wurden in einer definierten Zahl in Mikrotiterplatten (100µl) eingesät und bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Von den Testsubstanzen wurden Stammlösungen in DMSO angesetzt (333-fach konzentriert gegenüber der höchsten Endkonzentration). Jeweils 50 µl der Lösungen in ihrer Endkonzentration wurden auf die Zellkulturen pipettiert. Dabei betrug die höchste Konzentration der logarithmischen Verdünnungsreihe mit fünf Messpunkten 3.16 µg/ml.

Nach der Applikation der Testlösungen wurden die Zellkulturen weitere 45 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde jede Kultur mit 75 µl XTT versetzt und für drei Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachfolgend wurden die Extinktionen der einzelnen Zellkulturen bei 450 nm gemessen und die Werte mit denen der unbehandelten Kontroll-Kulturen verglichen.

Diese Versuche wurden mit einem Laborroboter (Biomek 2000, Fa. Beckman) bei der Firma Zentaris AG (vormals ASTA Medica AG) in Frankfurt/Main durchgeführt.

### **2.2.4.2. Der MTT-Test für die Charakterisierung der Reinsubstanzen**

#### **a) Eingesetzte Zelllinien**

- I) NALM-6: Zellen des prä-B-Typs der humanen Leukämie
- II) BV-173: Zellen des prä-B-Typs der humanen Leukämie
- III) SUP-B15: Zellen des prä-B-Typs der humanen Leukämie
- IV) SIG-M5: Zellen der humanen monocytären Leukämie
- V) HL-60: Zellen der humanen myeloischen Leukämie
- VI) JURKAT: Zellen der humanen T-Zellen-Leukämie
- VII) U-937: Zellen der humanen monocytären Leukämie
- VIII) MV4-11: Zellen der humanen monocytären Leukämie
- IX) DEL: Zellen eines humanen malignen Lungenkarzinoms
- X) NB-4: Zellen der humanen myeloischen Leukämie
- XI) BL-41: Zellen des Burkitt's Lymphom

Alle eingesetzten Zelllinien sind in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig hinterlegt. Die verwendeten Nährmedien und Informationen zu den Kulturen finden sich im DSMZ-Katalog [Drexler *et al.*, 1999].

## **b) Versuchsdurchführung**

Bei diesem Test wird die Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen anhand der Umsetzung des gelben MTT-Salzes zu einem blau-violetten Formazan-Farbstoff bestimmt.

Die zu testenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und mit dem Kulturmedium der entsprechenden Targetzellen verdünnt (Endkonzentration DMSO = max. 1 %). 90 µl Zellsuspension ( $10^4$  –  $10^5$  Zellen pro ml) wurden in 96-Lochplatten (Flachboden) mit 10 µl Testlösung versetzt (bei der Kontrolle wurde mit reinem DMSO versetztes Medium zugegeben) und 44 Stunden bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 10µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) weitere 4 Stunden inkubiert.

Mit Hilfe von 120 µl 5%iger Ameisensäure in Isopropylalkohol wurden die Zellen lysiert und das Formazan, das durch die Öffnung des Tetrazoliumrings durch die anwesenden Dehydrogenasen präzipitiert war, wieder in Lösung gebracht. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories), wobei die Extinktion bei 550 und 690 nm bestimmt wurde [Steube *et al.*, 1998]. Die Endkonzentrationen der Testsubstanzen lagen in einem Bereich von 10 – 10000 ng/ml.

Sämtliche unter 2.2.4.2. berichteten Versuche wurden von Herrn Dr. Steube am DSMZ in Braunschweig durchgeführt.

### **2.2.4.3. [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau zur Charakterisierung der Reinsubstanzen**

Die DNA-Synthesekapazität der untersuchten Zellen in Gegenwart der Testsubstanzen wurde mit Hilfe des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus getestet. Die inkorporierte Radioaktivität in Form des exogen zugeführten und in die Nukleinsäuren eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidins wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.



### **a) Eingesetzte Zelllinien**

Für die Untersuchung des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus wurden die unter 2.2.4.2.a) genannten Zelllinien SUP-B15, SIG-M5, Mono-Mac-6 und HL-60 verwendet.

### **b) Versuchsdurchführung**

Die Zellen wurden in 96-Lochplatten ausgesät und mit den zu untersuchenden Verbindungen inkubiert. Eine [Methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin-Stammlösung (Amersham-Buchler, Braunschweig; spezifische Aktivität = 0.25 mCi/μmol) wurde 1:10 mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Nach 45 Stunden wurden jeweils 10 μl dieser Lösung zugesetzt, und es wurde weitere drei Stunden inkubiert, wobei das Radionukleotid entsprechend der DNA-Syntheserate eingebaut wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Cell-Harvester (No. 1295-001, LKB Wallace) geerntet und die zellgebundene Radioaktivität auf Filterpapier fixiert. Nach der Trocknung wurden die Filterplättchen in Szintillationsröhrchen gelegt und mit 5 ml Szintillationscocktail versetzt. Die Radioaktivität wurde dann mit einem β-Szintillationszähler (1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallace) gemessen.

Sämtliche unter 2.2.4.3. berichteten Versuche wurden von Herrn Dr. Steube am DSMZ in Braunschweig durchgeführt.

## **2.3. Isolierung von (biologisch aktiven) Pilzmetaboliten**

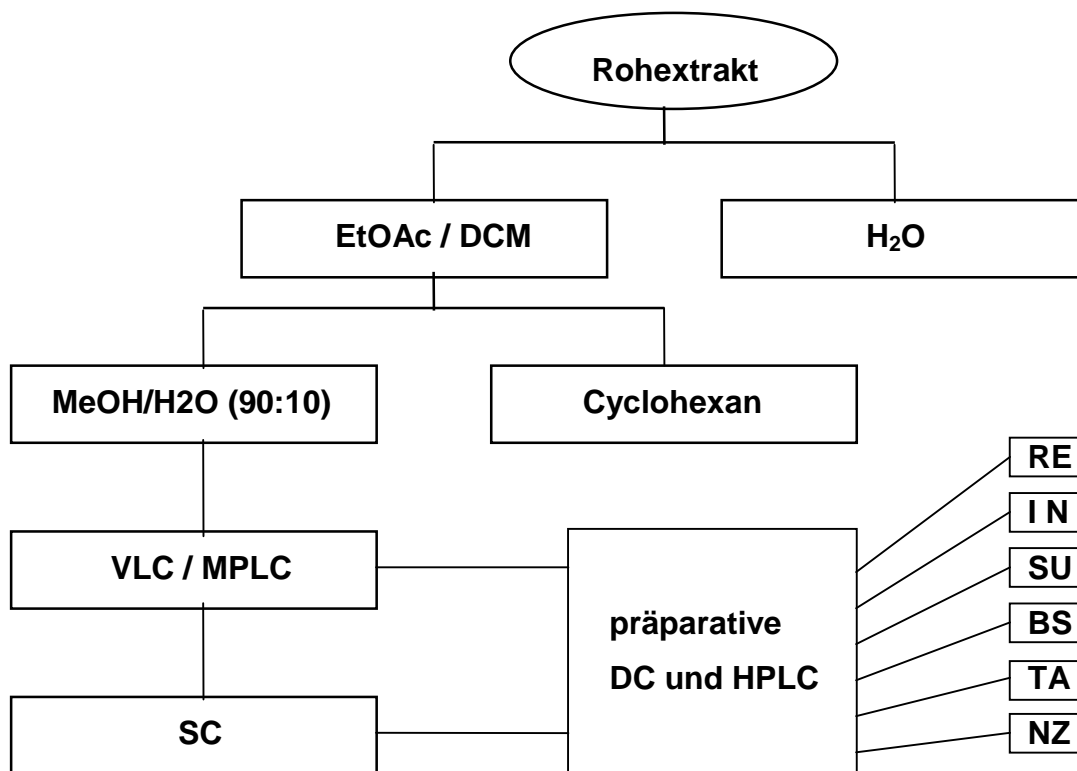
Die wie unter 2.1.3.2. beschrieben hergestellten Extrakte wurden wie folgt aufgearbeitet:

Die Vortrennung des Rohextrakts wurde durch Flüssig-Flüssig-Verteilung vorgenommen. Der Ethylacetat- bzw. Dichlormethan-Rohextrakt wurde zunächst gegen eine geringe Menge Wasser ausgeschüttelt, um das im Medium reichlich vorhandene Salz aus dem Extrakt zu entfernen. Anschließend wurde die organische Phase in eine wässrige Methanol-Phase (Methanol - Wasser = 90:10) überführt und dreimal gegen Cyclohexan ausgeschüttelt. Hierbei wurden die stark lipophilen Strukturen abgetrennt. Die Wässrige-Methanol-Phase wurde eingengt und im

weiteren Verlauf in der Regel mit Vakuum-Liquid-Chromatographie bzw. Mitteldruck-Flüssigchromatographie, Säulenchromatographie und präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie bzw. präparativer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und aufgereinigt.

Jede Fraktion wurde per DC und per HPLC hinsichtlich Komplexität und chemischer Diversität untersucht. Zur Ermittlung der bioaktiven Fraktionen auf dem Wege der Isolierung der wirksamen Strukturen sowie später zur Charakterisierung der biologischen Aktivität der isolierten Reinsubstanzen wurde in der Regel das *brine shrimp* assay eingesetzt, da es die höchste Empfindlichkeit besitzt, relativ unspezifisch ist und mit geringem Zeitaufwand und äußerst zeitnah durchführbar ist (24 Stunden).

Bei der Testung der Fraktionen des Extrakts wurde proportional zur Aufkonzentrierung der aktiven Strukturen in den Fraktionen während der jeweiligen Trennschritte jeweils weniger für den Aktivitätstest eingesetzt (im Extremfall maximale Aufkonzentrierung im Falle einer Reinsubstanz).



**Abb. M6:** Die Isolierung von Reinsubstanzen aus den Extrakten von Kulturen mariner Pilz-Isolate. Die einzelnen Fraktionen wurden im *brine shrimp* assay auf Bioaktivität getestet sowie HPLC-chromatographisch (Dioden-Array-Detektor) analysiert.

### 2.3.1. Flüssig-Flüssig-Verteilung

Die Flüssig-Flüssig-Verteilung wurde im Erlenmeyerkolben unter Verwendung eines Ultraturrax zur Homogenisierung der Phasen durchgeführt. Die eingesetzten Volumina richteten sich nach der Rohextraktmenge.

In der Regel erfolgte eine dreimalige Ausschüttelung für jeweils 5 Minuten. Die Phasentrennung wurde im Scheidetrichter erreicht.

### 2.3.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Mit Hilfe der analytischen Dünnschichtchromatographie wurde die qualitative Zusammensetzung des Rohextrakt sowie der ausgeschüttelten Phasen und der säulenchromatographisch getrennten Fraktionen ermittelt. Ferner diente die DC im Vorversuch der Säulenchromatographie zur Optimierung des geeigneten Fließmittelgemisches für die jeweilige stationäre Phase. Verwendet wurden hierfür DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F<sub>254</sub>, DC-Fertigplatten Diol und HPTLC-Fertigplatten RP-18.

Für die Auswertung der säulenchromatographischen Trennung wurden Kieselgelplatten verwendet. Das Fließmittelgemisch bestand in diesem Falle in der Regel aus Dichlormethan:Methanol (z.B. 90:10). Um eine bessere Trennung im mittleren Polaritätsbereich zu erzielen, wurde Methanol gegebenenfalls durch Isopropanol ersetzt, da der Polaritätsindex des Isopropanols niedriger ist als der des Methanols [Gertz, 1989].

Eine Alternative zum genannten Fließmittelgemisch waren Mischungen von Hexan:Ethylacetat (z.B.: 30:70). Dieses Fließmittel zeigte bei den Verbindungsgemischen einiger Fraktionen eine bessere Trennleistung.

Bei der Dünnschichtchromatographie an der Umkehrphase RP-18 (RP=reversed phase) wurde stets ein Methanol-Wasser-Gemisch (z.B.: 65:35) verwendet. Je nach Trennproblem wurde das Verhältnis variiert.

| Materialien für die Dünnschichtchromatographie                                  | Bezugsquelle |
|---|--------------|
| DC-Fertigplatte (Alufolie) , Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 0.2mm Schichtdicke | Merck        |
| DC-Fertigplatte (Glas) , Diol , 0.2mm Schichtdicke                              | Merck        |
| HPTLC-Fertigplatte (Glas), RP-18 F <sub>254</sub> S. 0.25mm Schichtdicke        | Merck        |

Alle DC-Platten wurden bei Kammersättigung über eine Laufstrecke von ca. 8 cm entwickelt. Die Auswertung der Platten erfolgte zunächst visuell durch Detektion im UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) sowie bei 366 nm (Eigenfluoreszenz). Anschließend wurde nach dem Besprühen der Platten mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 110° C für 3 min. ergänzend ausgewertet. Zur Herstellung des Anisaldehyd-Sprühreagenz wurden diese Chemikalien in folgender Reihenfolge miteinander versetzt:

- 2.5 ml 4-Methoxybenzaldehyd, Merck
- 50 ml Essigsäure (100 %), Merck
- 425 ml Methanol (destilliert)
- 25 ml Schwefelsäure (conc.), Merck

### 2.3.3. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)

Bei der VLC wurde die stark konzentrierte Probe (in diesem Fall die eingeeengte Ethylacetat-Phase des Rohextrakts) mit der stationären Phase (Kieselgel 60, Korngröße 15 - 40 µm, Merck) verrieben. Diese Verreibung wurde auf den Säulenkopf aufgebracht. Als Säule diente ein mit Kieselgel beschicktes, oben offenes Glasrohr, das unten mit einer Fritte abschließt. Unterhalb der Fritte befand sich der Abfluß und seitlich neben dem Abfluß ein Vakuumansaugstutzen.

Zur Durchführung der VLC wurde vakuumbeschleunigt mit einem Lösungsmittelgradienten steigender Polarität eluiert. Hierfür wurden folgende Lösungsmittel in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander kombiniert: Dichlormethan und Isopropanol bzw. Methanol (**Tab. M2**).

Die VLC ist eine sehr effektive und zeitsparende Methode zur Vortrennung, bei der mit einem Mal bis zu 30 g Trockenextrakt aufgetragen werden können [Coll and Bowden, 1986].

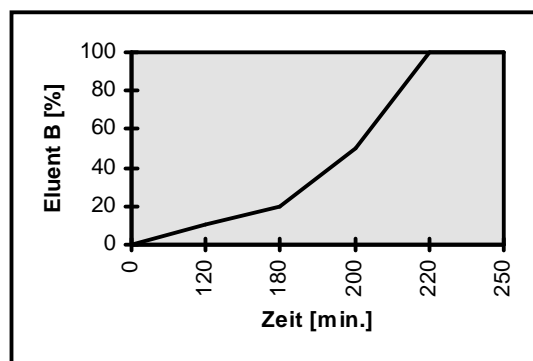
| Lösungsmittel [%]            |                            |             |
|------------------------------|----------------------------|-------------|
| Dichlormethan                | Isopropanol                | Volumen     |
| 100 – 95 (in 0.5%-Schritten) | 0 - 5 (in 0.5%-Schritten)  | 10 x 500 ml |
| 95 – 90 (in 1%-Schritten)    | 5 – 10 (in 1%-Schritten)   | 5 x 500 ml  |
| 90 – 80 (in 2%-Schritten)    | 10 – 20 (in 2%-Schritten)  | 5 x 500 ml  |
| 80 – 50 (in 10%-Schritten)   | 20 – 50 (in 10%-Schritten) | 4 x 500 ml  |

**Tab. M2:** Eluotrope Reihe für die VLC. Nach dem letzten Elutionsgemisch wurde mit 1000 ml 100 % MeOH gespült.

### 2.3.4. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Als eine Alternative zur Vakuumflüssigchromatographie wurde die Mitteldruckflüssigchromatographie eingesetzt. Hierzu wurde Kieselgel als stationäre Phase mit Partikeldurchmessern um 25 µm verwendet. Der Druckbereich lag zwischen 5 und 40 MPa. Die Probe wurde auf grobkörnige stationäre Phase aufgezogen und über die Vorsäule appliziert. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten, wie er in Tabelle **M3** und Abbildung **M7** dargestellt ist. Die Fraktionierung per Zeiteinheit erfolgte über einen automatischen Fraktionssammler.

| Zeit [min.] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|-------------|--------------|--------------|
| 0           | 100          | 0            |
| 120         | 90           | 10           |
| 180         | 80           | 20           |
| 200         | 50           | 50           |
| 220         | 0            | 100          |
| 250         | 0            | 100          |



**Tab. M3 und Abb. M7:** Standardgradient für die MPLC-Elution von Pilz-Extrakten (Eluent A = Dichlormethan / Eluent B = Isopropanol). Im Anschluß an den Gradienten wurde mit 100 % MeOH gespült)

- Gerät:**
- Gradientenformer : B-687 , Büchi
  - Pumpe : B-688, Büchi
  - Fraktionensammler : B-684, Büchi
  - Säule : 45 x 5 cm, Büchi

### 2.3.5. Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie schließt sich an die Vortrennungsschritte Flüssig-Flüssig-Verteilung und VLC an. Hierbei nimmt die universelle Trennung in der Gelpermeationschromatographie mit Sephadex eine Übergangsstellung zur gezielten Aufreinigung ein. Verwendet wurde hierbei Sephadex LH-20, bei dem neben der Größenausschlußchromatographie auch Adsorptionseffekte an der Trennung beteiligt sind. Als Fließmittel dienten reines Methanol, sowie Gemische aus Methanol und Dichlormethan bzw. Aceton.

Für die gezielte Aufreinigung nach vorangestellter Fließmitteloptimierung mittels DC wurden in der Adsorptionschromatographie folgende Sorbentien verwendet: Kieselgel 60, RP-18 und Diol. Die Feintrennung wurde auf vorgefertigten Lobarsäulen der Firma Merck durchgeführt (LiChroprep Si 60, RP-18 bzw. Diol).

Folgende säulenchromatographische Trennsysteme wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

| stationäre Phase | mobile Phase   |
|------------------|--|
| Sephadex LH-20   | 100 % MeOH, MeOH:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50:50)           |
| Kieselgel 60     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH od. Isopr. (85:15 bis 95:5) |
| Kieselgel 60     | Hexan : EtOAc (30:70 bis 70:30)                                    |
| RP-18            | MeOH : H <sub>2</sub> O (60:40 bis 80:20)                          |
| Diol             | Hexan : EtOAc (30:70 bzw. 60:40)                                   |

**Tab. M4:** Säulenchromatographische Trennsysteme in der SC

Alle Fließmittel für die Feintrennung auf Lobar-Säulen wurden vor der Verwendung für ca. 15 min. im Ultraschallbad entgast, um Bläschenbildung auf der Säule und daraus folgende Trennfehler zu vermeiden.

Die aufzutrennenden Substanzgemische wurden als konzentrierte Lösungen jeweils in dem verwendeten Fließmittel auf den Säulenkopf aufgetragen. Die Flußrate wurde je nach Trennproblem variiert. In der Regel wurde die Tropfgeschwindigkeit zwischen 3 und 8 Sekunden pro Tropfen gehalten, um eine optimale Gleichgewichtseinstellung gemäß dem Nernst'schen Verteilungsprinzip zu erhalten, ohne jedoch Diffusion im Falle einer zu geringen Flußrate zu ermöglichen. Die zeitliche Fraktionierung erfolgte

mit Hilfe eines Fraktionensammlers. Nach der dünnschichtchromatographischen Auswertung der Trennung auf Kieselgelplatten wurden die Fraktionen anschließend entsprechend vereinigt.

| <u>Materialien für die Säulenchromatographie</u>                          | <u>Bezugsquelle</u> |
|---|---------------------|
| Kieselgel 60, 40 - 63 µm Korngröße  | Merck               |
| Sephadex LH-20, 25 - 100 µm Korngröße                                     | Sigma               |
| Kieselgel RP-18, 40 - 63 µm Korngröße                                     | Merck               |
| Lobarsäule LiChroprep, Diol, 40 - 63 µm Korngröße,<br>Größe B (310 - 25)  | Merck               |
| Lobarsäule LiChroprep, Si 60, 40 - 63 µm Korngröße,<br>Größe B (310 - 25) | Merck               |
| Lobarsäule LiChroprep, RP-18, 40 - 63 µm Korngröße,<br>Größe B (310 - 25) | Merck               |

### **2.3.6. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)**

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography) ist eine Methode zur Substanztrennung im analytischen und präparativen Maßstab mit sehr hoher Auflösung. Die hohe Trennleistung erklärt sich durch die sehr kleine Korngröße der stationären Phase. Das Elutionsmittel wird mit Hilfe von Pumpen unter Druck durch die Säule gepreßt [Marston and Hostettmann, 1991].

Mit Hilfe der HPLC wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen analytisch gearbeitet, zum anderen wurde im präparativen Maßstab mit dieser Methode die Endreinigung fast aller Reinsubstanzen durchgeführt, um für die Strukturaufklärung sowie für die Bestimmung der insektiziden Aktivität einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen.

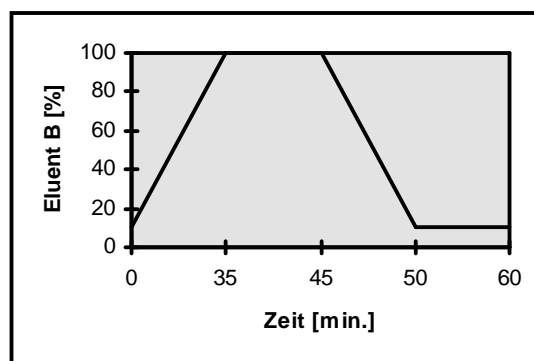
#### **2.3.6.1. HPLC-DAD**

Um eine optimale Auftrennung der z.T. sehr komplexen Substanzgemische zu erzielen, war eine Gradientenelution erforderlich. Mit einem binären Gradienten konnte in relativ kurzer Zeit in der Regel eine zufriedenstellende Trennung der

untersuchten Substanzgemische erreicht werden. Für die analytische Trennung wurde im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten aus dem Institut ein Standardgradient gefahren (**Tab. M6** und **Abb. M8**).

Die stationäre Phase bestand aus RP-18-Material. Die Elutionsmittel waren 0.15%ige Phosphorsäure, pH 2.0 (A) und 100%iges Methanol (B).

| Zeit [min.] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|-------------|--------------|--------------|
| 0           | 90           | 10           |
| 35          | 0            | 100          |
| 45          | 0            | 100          |
| 50          | 90           | 10           |
| 60          | 90           | 10           |



**Tab. M6 und Abb. M8:** Standardgradient für die analytische HPLC-Analyse von Extrakten von Schwämmen, Bakterien- und Pilzkulturen und der daraus hervorgehenden Fraktionen (Eluent A = 0.15%ige Phosphorsäure, pH 2.0 / Eluent B = 100 % HPLC-Methanol).

**analytische HPLC-Anlage:**

- Pumpe : P 580, Dionex
- Probengeber : ASI-100, Dionex (Injektionsvolumen = 20 µl)
- Detektor : UVD 340S, Dionex (Photodioden-Array-Detektor)
- Steuerung : Chromeleon 6.30
- Säulenofen : STH 585
- Säule : Eurospher 100-C18, [ 5 µm; 125 mm x 4 mm], Knauer

**HPLC-Fließmittel:**

- HPLC-Methanol (Mikrosolv) Merck
- Phosphorsäurelösung 0.15 %, pH=2.0, hergestellt aus:
  - ortho-Phosphorsäure 85 % p.a. Merck
  - Wasser aus NANOpur-Anlage Barnstead

**I) Analyse von Extrakten und Fraktionen:**

Bei der analytischen Trennung wurde ein Proben-Volumen von 20 µl injiziert (Konzentration ca. 1 mg / ml). Die Flußrate durch die in einem Säulenofen mit 20° C konstant temperierte Säule betrug 1 ml / min.. Detektiert wurde mit einem UV-



Detektor des Photodioden-Array-Typs bei 210 nm, 235 nm, 254 nm und 366 nm. Dieser Detektor zeichnet online das UV-Spektrum jeder bei einer der angegebenen Wellenlängen detektierten Substanz auf. Mit Hilfe dieser Spektren kann durch Vergleich mit der software-integrierten Spektrenbibliothek bzw. mit Literaturdaten eine erste Charakterisierung der ermittelten Komponenten, z.B. eines Rohextrakts, vorgenommen werden. Bei den über 250 gespeicherten Reinsubstanzen der Spektrenbibliothek handelt es sich um Verbindungen, die in der Arbeitsgruppe Proksch bisher aus Pflanzen (120), marinen Invertebraten sowie aus Mikroorganismen (150) isoliert wurden. Durch den Vergleich von Chromatogrammen können zudem Unterschiede im Inhaltsstoffmuster verschiedener Extrakte (z.B. Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakt bzw. Mycel-Extrakt und Medien-Extrakt) ermittelt werden.

Auf diese Weise wurden vom Rohextrakt an alle Trennschritte mit den daraus hervorgegangenen Fraktionen analysiert. Somit dient die Aufzeichnung der UV-Spektren (neben dem Bioassay) der Selektion der für weitere Untersuchungen in Frage kommenden Extrakte bzw. Fraktionen.

Der Standardgradient wurde je nach Anforderungen und Komplexität der Proben modifiziert.

## II) Co-Chromatographie:

Um Reinsubstanzen mit bereits isolierten Substanzen ähnlicher Retentionszeit vergleichen zu können, bedient man sich der Co-Chromatographie (Co-Elution).

Hierzu werden zunächst in direkt aufeinanderfolgenden getrennten Läufen die Retentionszeiten von Probe und Referenz verglichen. Stimmen die Retentionszeiten im Rahmen der üblichen Verschiebung überein, erstellt man eine Mischung aus Probe und Referenz, wobei beachtet werden muß, daß beide Lösungen im selben Konzentrationsbereich liegen. Andernfalls findet eine Überlagerung der Peaks statt, die eventuelle Unterschiede in den Retentionszeiten überdeckt.

Die Auswertung der so co-eluierten Proben erfolgt einmal anhand der Peaksymmetrie und zum anderen mittels UV-Spektren-Vergleich von Peakschultern und Peakmaximum. Wenn der Peak des Gemischs symmetrisch ist und nur eine deutliche Spitze aufweist und wenn auch die UV-Spektren sich decken, so handelt es sich bei den beiden untersuchten Proben um die gleiche Verbindung.

### III) Reinheitskontrolle der isolierten Substanzen

Letztendlich diene die HPLC zusätzlich der Kontrolle der Reinheit der vermeintlichen Reinsubstanzen. Vor allem die Kopplung mit dem Photodioden-Array-Detektor ermöglicht die Ermittlung der Peakreinheit durch UV-Spektrenvergleich von Peakschultern und Peakmaximum. Da aber nicht alle Substanzen bei den eingestellten Wellenlängen detektiert werden können, wurde in Zweifelsfällen mittels Kieselgel-DC die Reinheit ergänzend überprüft.

#### **2.3.6.2. HPLC-MS<sup>n</sup>**

Die HPLC-MS ermöglicht durch die Kopplung eines chromatographischen Verfahrens mit dem Massenspektrometer als Detektor die Identifikation von Molekülen anhand ihrer Ionen auch aus Substanzgemischen. Als Ionisierungsmethode wurde standardmäßig das ESI-Verfahren gewählt (siehe auch 2.4.1.1.). Die Aufnahme der ESI-Massenspektren wurde an einer HPLC-MS-Anlage des Typs Finnigan LCQ<sup>Deca</sup> der Firma Thermoquest durchgeführt, das mit einer Ionenfalle ausgerüstet ist und so die Durchführung von theoretisch unendlich vielen MS/MS-Experimenten ermöglicht.

#### **HPLC-MS:**

|              |   |
|--------------|---|
| analyt. HPLC | : Agilent HP1100 (Photodioden-Array-Detektor)       |
| MS           | : Finnigan LCQ <sup>Deca</sup> , Thermoquest        |
| Ionenquelle  | : APCI und ESI, Thermoquest                         |
| Vakuumpumpe  | : Edwards 30, BOC                                   |
| Säule        | : Polaris C-18A, [5 µm; 250 x 2 mm], MetaChem/Ansys |

#### **Fließmittel für HPLC-MS:**

|   |           |
|---|-----------|
| Acetonitril, für HPLC                       | Merck     |
| 0.1%ige Ameisensäure-Lösung hergestellt aus |           |
| ■ Ameisensäure, p.a.                        | Merck     |
| ■ Wasser aus NANOPur-Anlage                 | Barnstead |

Die zu vermessenden Proben waren in 100 % Methanol bzw. Wasser - Methanol (50:50) gelöst. Als Fließmittel dienten Acetonitril und eine 0.1%ige Ameisensäure-Lösung. Vermessen wurden sowohl die positiven als auch die negativen Ionen. Standardmäßig wurde vom signalintensivsten Ion ein MS/MS-Tochterspektrum aufgezeichnet.

Auf diese Art wurden Rohextrakte auf nicht per UV detektierbare Komponenten hin untersucht sowie nach Molekülonen bereits bekannter Verbindungen durchsucht. Durch die Ausgabe der Signale eines bestimmten Massenbereich-Kanals kann gezielt nach Ionen in Extrakten und Fraktionen gesucht werden sowie der Erfolg von Derivatisierungsreaktionen kontrolliert werden.

Desweiteren können über den Direkteinlaß Reinsubstanzen appliziert werden, um deren Molekülmasse zu bestimmen sowie anhand der Fragment-Ion-Tochterspektren unterstützende Daten für die Strukturaufklärung zu generieren.

### **2.3.6.3. Semi-präparative HPLC**

Die präparative HPLC wurde gezielt für die Endreinigung der Reinsubstanzen eingesetzt (i.d.R. unterhalb einer Fraktionsstärke von 25 mg). Gemäß der größeren Säule erhöhen sich sowohl Injektionsvolumen (bis 1 ml bei einer Konzentration von 2 - 3 mg / ml) als auch Flußrate (5 ml / min.). Die Detektion erfolgte auch hier mittels UV-Detektor, allerdings ohne Online-UV-Spektren-Aufzeichnung der detektierten Substanzen. Die Fraktionssammlung erfolgte manuell unter Berücksichtigung des aktuell geschriebenen Spektrums.

#### **Semipräparative HPLC-Anlage:**

|           |  |
|-----------|--|
| Pumpe     | : L-7100, Merck/Hitachi  |
| Detektor  | : UV-Detektor, L-7400, Merck/Hitachi   |
| Schreiber | : Chromato-Integrator D-2000, Merck/Hitachi<br>Flatbed-Recorder, Kipp & Zonen                            |
| Säulen    | : Eurospher 100-C18, [ 7 µm; 300 mm x 8 mm], Knauer<br>Eurospher 100-C18, [10 µm; 300 mm x 8 mm], Knauer |
| Vorsäule  | : Eurospher 100-C18, [10 µm; 30 mm x 8 m], Knauer  |

Das Packungsmaterial der präparativen Säule war wie bei der analytischen Anlage RP-18. In der Regel wurde auch hier ein binärer Stufengradient gefahren. Elutionsmittel waren je nach Trennproblem NANOpur-Wasser (A) und Methanol bzw. Acetonitril (B). Beim Wechsel von Methanol zu Acetonitril sind zu beachten: 1. die deutlich höhere Elutionskraft des Acetonitril, 2. die höhere Toxizität (cancerogen) und 3. als positive Erscheinung die deutlich bessere Trennschärfe. Speziell aufgrund des an zweiter Stelle genannten Punktes wurde mit Acetonitril ausschließlich dann gearbeitet, wenn mit einem Wasser/Methanol-Gradienten keine Trennung erreicht werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Trennleistung des Systems ist das Anreichern des wässrigen Anteils mit Protonen mittels Trifluoressigsäure (TFA). In der Regel wurde eine maximal 0.1%ige Lösung verwendet. TFA ist flüchtig und kann am Rotationsverdampfer entfernt werden. Allerdings konzentriert sich die Säure zunächst sehr stark auf und es können pH Werte bis 1 erreicht werden (Vorsicht mit säurelabilen Substanzen).

## **2.4. Identifizierung und Strukturaufklärung**

Die Identifizierung bzw. Strukturaufklärung der isolierten Substanzen lief in der Regel nach folgendem Schema ab. Zunächst wurden die mittels HPLC ermittelten Daten (Retentionszeit bei gegebenem Gradienten, UV-Spektren) mit der Spektrenbibliothek verglichen sowie ein LC-MS-Lauf durchgeführt und ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Substanz aufgenommen. Mit den vorliegenden Informationen (UV, Masse, Substrukturen) wurden Datenbankrecherchen [MarinLit, 2002; Antibase, 2002; Chapman and Hall, 2002] durchgeführt. Konnte eine Verbindung weder über die Spektrenbibliothek noch über die Datenbankrecherche und den Vergleich mit Literaturdaten eindeutig identifiziert werden, wurden sukzessive weitere NMR-Experimente durchgeführt. In den meisten Fällen wurde dabei folgende Reihenfolge eingehalten: H,H-COSY, HMBC, HMQC (oder DEPT). In den meisten Fällen konnten mit diesen Methoden bekannte Verbindungen identifiziert werden bzw. die Strukturen neuer Naturstoffe aufgeklärt werden.

Falls erforderlich wurden zusätzlich TOCSY-Spektren oder nOe-Daten gemessen. Weitere eingesetzte Methoden zur Strukturaufklärung waren die IR- und CD-Spektroskopie sowie Derivatisierungen. Von neuen Naturstoffen wurden in der Regel Kohlenstoffspektren gemessen sowie die Feinmasse bestimmt.

#### **2.4.1. Massenspektrometrie**

Mit einem Massenspektrometer kann man mit sehr geringen Substanzmengen (bei Direkteinlaß 0.001 - 0.1 mg) die relative Molekülmasse einer Verbindung bestimmen. Zudem können anhand des Fragmentierungsmusters der Verbindung erste Aussagen über ihre Struktur gemacht werden [Hesse *et al.*, 1987].

##### **2.4.1.1. ESI-(Electro-Spray-Ionisation)-Massenspektrometrie**

Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Probenlösung bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von mehreren Kilovolt durch eine Kapillare in den stufenweise evakuierten Einlaß des Massenspektrometers gesprüht. Dabei werden die einzelnen Tropfen elektrostatisch aufgeladen und das Lösungsmittel verdampft. Die elektrische Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche verstärkt sich bis zu einem kritischen Punkt, an dem sich die Tropfen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung wiederholt teilen. Man erhält sehr kleine mit Ladungen gesättigte Ionenmoleküle, die in die Gasphase geschleudert und dann im Analysatorteil detektiert werden können [McLafferty, 1995].

Die Aufnahme der ESI-Massenspektren wurde an einer HPLC-MS-Anlage des Typs Finnigan LCQ<sup>Deca</sup> der Firma Thermoquest durchgeführt. Die Proben waren in 100 % Methanol gelöst. Als Fließmittel dienten Acetonitril und eine 0.1%ige Ameisensäure-Lösung. Vermessen wurden sowohl die positiven als auch die negativen Ionen. Standardmäßig wurde vom signalintensivsten Ion ein MS/MS-Tochterspektrum aufgezeichnet.

#### **2.4.1.2. EI-(Electron-Impact)-Massenspektrometrie**

Für die Elektronenstoßionisation wird die ungelöste Probe durch Erhitzen auf 200 - 360° C verdampft. Die verdampfte Probe wird dann durch einen Direkteinlaß ins Hochvakuum überführt, wo die zunächst neutralen Moleküle mit einem Elektronenstrahl von 70 eV ionisiert und dann in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Ein angelegtes Magnetfeld lenkt die beschleunigten Ionen auf eine Kreisbahn, deren Radius vom Quotienten Masse / Ladung der Teilchen und von der angelegten Feldstärke abhängig ist. Durch ein kontinuierliches Verändern der Feldstärke gelangen die Ionen nach ihrer Masse getrennt durch einen Kollektorspalt und werden dann im Analysatorteil detektiert [Hesse, 1987].

Bei der Elektronenstoßionisation tritt eine stärkere Fragmentierung der Ionen auf als bei der Electro-Spray-Ionisation. Damit läßt diese Methode mehr Rückschlüsse auf die Molekülstruktur zu.

Die Aufnahme der EI-MS-Spektren wurden von Herrn Dr. Helmut Keck und Herrn Dr. Peter Tommes vom Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem Massenspektrometer des Typs Finnegan MAT 8200 durchgeführt.

#### **2.4.1.3. FAB-(Fast-Atom-Bombardment)-Massenspektrometrie**

In der FAB-Massenspektrometrie wird die zu vermessende Substanz in dem gering flüchtigen Glycerin aufgenommen und mit einem Strahl schneller Edelgasatome beschossen. Hierdurch werden Proben-Ionen gebildet, die durch die übliche Geräteoptik beschleunigt, fokussiert und detektiert werden. FAB-Massenspektren sind v.a. für polare Moleküle gut geeignet [Hesse, 1987]. Die Aufnahme der FAB-MS-Spektren wurde ebenfalls am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt (siehe 2.4.1.2.).

#### **2.4.1.4. Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)**

Mit Hilfe der exakten Masse wird die Elementarzusammensetzung und damit die Summenformel einer Verbindung genau bestimmt. Da die Atomgewichte der einzelnen Isotope nicht ganzzahlig sind und jedes Isotop eines Elements einen

einmaligen, charakteristischen „Massendefekt“ hat, der aufgrund des unterschiedlichen natürlichen Vorkommens der verschiedenen Isotope im Molekül repräsentiert ist, kann man aus der Ionenmasse, die den Gesamtmassendefekt anzeigt, die Isotopen- und Elementarzusammensetzung des betreffenden Ions ermitteln [McLafferty und Turecek, 1993]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Feinmassen der neuen Naturstoffe mit HR-ESI und HR-EI-Massenspektrometern gemessen. Dies geschah bei Herrn Dr. Victor Wray (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abteilung Molekulare Strukturforschung, Braunschweig) sowie Herrn Dr. Albrecht Berg (Abteilung für Biostrukturchemie, Hans-Knöll-Institut, Jena).

#### **2.4.2. NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektren wurden zum einen am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem DRX-500-Spektrometer der Firma Bruker, zum anderen von Herrn Dr. V. Wray (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abteilung Molekulare Strukturforschung, Braunschweig) mit Spektrometern der Firma Bruker (AM-300, ARX-400 bzw. DMX-600) sowie von Prof. Cui am National Key Laboratory for Natural and Biomimetic Drugs, Peking University Health Science Center, Beijing (Varian, 500 MHz) aufgezeichnet. Als deuterierte Lösungsmittel dienten u.a. Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), Dimethylsulfoxid ( $\text{DMSO-d}_6$ ) und Aceton- $\text{d}_6$ . Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit Win-NMR, der entsprechenden Software der Firma Bruker. Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (TMS), die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) angegeben. Durch Vergleich der chemischen Verschiebungen, der Integration der Signale und der Kopplungskonstanten mit Literaturdaten konnten die Strukturen der isolierten Verbindungen aufgeklärt werden.

Neben eindimensionalen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden auch DEPT-Spektren sowie zweidimensionale H,H-COSY- bzw. H,C-Korrelationsspektren (HMQC, HMBC) gemessen sowie TOCSY-, nOe-Differenz-, NOESY- und ROESY-Experimente durchgeführt.

#### 2.4.2.1. DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfers*)

Die natürliche Häufigkeit und Empfindlichkeit von  $^{13}\text{C}$ -Isotopen ist relativ gering. Mit der DEPT-Methode wird die größere Populationsdichte eines empfindlichen Kerns wie  $^1\text{H}$  auf eine im Molekül vorhandene, seltene Kernsorte wie  $^{13}\text{C}$  übertragen. Durch diesen Polarisationstransfer werden die Übergänge des unempfindlichen Kerns und folglich auch das Signal verstärkt.

Die DEPT-Technik ermöglicht es, die Multiplizität von Kohlenstoffatomen (Singulett = C, Dublett = CH, Triplett =  $\text{CH}_2$  und Quartett =  $\text{CH}_3$ ) festzustellen [Hesse, 1987].

#### 2.4.2.2. COSY (*correlation spectroscopy*)

Das zweidimensionale (2D-) NMR-Spektrum kann aus zwei gleichen (H,H-COSY) bzw. zwei verschiedenen (H,C-COSY) Frequenzachsen bestehen. Die Signalintensitäten entsprechen der dritten Dimension.

Die 2D-Protonenkorrelation liefert Information über die H,H-Kopplungen eines Moleküls. Im H,H-COSY-Diagramm wird auf beiden Achsen das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Substanz aufgetragen. Die auf einer Diagonalen liegenden Signale stehen für jeweils gleiche Signale der beiden Spektren. Außerhalb der Diagonalen liegen die Kreuzsignale, die jeweils zwei verschiedenen Kernen entsprechen. Zwei Kerne koppeln miteinander, wenn ihre Diagonal- und Kreuzsignale ein Quadrat bilden [Rücker, 1988].

Im TOCSY-Experiment weisen alle Protonen, die zu einem Spinsystem gehören wechselseitig Korrelationen auf. Auf diese Art und Weise erhält man eine Vielzahl von Kreuzsignalen, die es möglich machen, die einzelnen Spinsysteme in großen Molekülen schnell zu identifizieren und voneinander abzugrenzen.

Werden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren miteinander korreliert, handelt es sich um 2D-H,C-COSY-Spektren. Kennt man z.B. die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen, dann liefert die Shift-Korrelation die  $^{13}\text{C}$ -Zuordnung und umgekehrt [Hesse, 1987]. Bei HMQC-Spektren (*hetero multinuclear quantum coherence*) können Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Protonen über eine Bindung hin sichtbar gemacht werden (CH-direkt-Kopplung). Dagegen werden bei HMBC (*hetero multinuclear bond coherence*) Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Protonen detektierbar, die über zwei oder drei Bindungen reichen (*long-range* Kopplungen).



#### **2.4.2.3. nOe-(nuclear-Overhauser-effect)-Experimente**

Der „nuclear Overhauser effect“ verstärkt bzw. vermindert die Intensität von Signalen in Abhängigkeit von Dipol-Dipol-Interaktionen benachbarter Kerne. Die Einstrahlung auf der Frequenz eines bestimmten Protons beeinflusst die Signalintensitäten der benachbarten Protonen. Bei der nOe-Differenz-Spektroskopie (nOeDS) werden Spektren ohne und mit Einstrahlung aufgezeichnet und voneinander subtrahiert. Die jeweiligen nOe-Effekte werden durch positive bzw. negative Peaks dargestellt.

Als zweidimensionale Anwendungen des homonuclearen nOe-Effekts wurden NOESY- und ROESY-Experimente durchgeführt.

#### **2.4.3. IR-Spektroskopie**

Die im mittleren Infrarot ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) auftretenden Linien entsprechen den Übergängen zwischen verschiedenen Schwingungsniveaus im Molekül. Die Signale im IR-Spektrum können mit einzelnen Strukturelementen (z.B. Keto-, Säuregruppe, Ester) korreliert werden [Crews *et al.*, 1998].

Die IR-Spektren der Reinsubstanzen wurden von Frau Christoph am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf mit einem IR-Spektrometer 1600 FTIR der Firma Perkin Elmer gemessen. Die Substanzen wurden als Feststoffe in Form eines Preßlings im Gemisch mit Kaliumbromid vermessen.

#### **2.4.4. Optische Drehung**

Chirale Moleküle können die Ebene des linear polarisierten Lichts drehen. Die optische Aktivität der Reinsubstanzen wurde mit einem Polarimeter 341 LC der Firma Perkin Elmer bei der Natrium-D-Linie von 589 nm bestimmt. Die auf 20° C temperierte (Ultra Thermostat NB5, Colora) Küvette hatte eine Schichtdicke von 10 cm. Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurde in der Regel in zwei Konzentrationen gemessen. Als Lösungsmittel wurden jeweils geeignete organische Lösungsmittel für die Spektroskopie verwendet.

### **2.4.5. CD-(Circular-Dichroismus)-Spektroskopie**

Mit Hilfe der Messung der CD-Spektren wurde die optische Aktivität des Biscumarins überprüft. Gemessen wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg (AK Prof. Bringmann) mit einem Yvon Dichrograph CD 6. Hierzu wurden die Proben in DMSO gelöst und die differentiellen Absorptionskoeffizienten  $\Delta\epsilon$  ( $\text{cm}^2/\text{mol}$ ) bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  ermittelt.

Wird eine enantiomerenreine Probe mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, so wird die Ebene des austretenden Lichts um den Winkel  $\alpha$  gedreht, wenn zwischen dem eingestrahlenen Photon und den Probenmolekülen nur elastische Stöße auftreten. Strahlt man im Bereich einer UV-Absorptionsbande ein, tritt zusätzlich eine unterschiedliche Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht auf (Cotton-Effekt), [Snatzke, 1981].

## **2.5. Derivatisierungen**

### **2.5.1. Marfey-Methode zur Aufklärung der absoluten Konfiguration der Aminosäuren im Cycloaspeptid**

Bei der Marfey-Methode werden Aminosäuren mit den Marfeyreagenzien FDAA bzw. FDLA derivatisiert. Diese Derivatisierung überführt die Enantiomeren L-Aminosäure und D-Aminosäure in die Diastereomere Marfeyreagenz-L-Aminosäure und Marfeyreagenz-D-Aminosäure, die dann über klassische feste Phasen in der HPLC getrennt werden können [Marfey, 1984]. Zur Analyse der absoluten Konfiguration der Aminosäuren im Cycloaspeptid wurden zunächst die im Peptid vertretenen Aminosäuren als Referenzen käuflich erworben. Von jeder Aminosäure wurde die L-Form gekauft sowie das Racemat. 50  $\mu\text{l}$  einer 50 mM Lösung dieser Aminosäuren in Wasser wurden in 2 ml Eppendorf-Caps mit 100  $\mu\text{l}$  einer 1%igen Lösung des Marfeyreagenz in Aceton versetzt. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NaHCO}_3$  wurde 1 Stunde bei 30 - 40° C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Mit 10  $\mu\text{l}$  2M HCl wurde die Reaktion abgestoppt und anschließend die Probe in der

Vakuumzentrifuge getrocknet. Die in 1 ml HPLC-Methanol:Nanopur-Wasser (1:1) gelöste Probe wurde per HPLC-DAD und LC-MS analysiert.

Zur Analyse der peptidischen Aminosäuren wurde das Cycloaspeptid zunächst mit 6N HCl für 24 Stunden bei 110° C hydrolysiert und das resultierende Aminosäurengemisch analog der oben stehenden Vorschrift derivatisiert.

Über den Vergleich der Retentionszeiten von Referenzen und Probe erfolgte die Bestimmung der vorliegenden absoluten Konfiguration der jeweiligen Aminosäuren im Peptid.

| <u>Chemikalien für die Marfey-Methode</u>          | <u>Hersteller .</u> |
|--|---------------------|
| FDAA (1-Fluoro-dinitrophenyl-5-L-alanin)           | TCI                 |
| FDLA (1-Fluoro-dinitrophenyl-5-L-leucin)           | TCI                 |
| L-Alanin, D,L-Alanin                               | ICN                 |
| L-Leucin, D,L-Leucin                               | ICN                 |
| L-N-Methyl-tyrosin, D,L-N-Methyl-tyrosin           | Bachem              |
| L-N-Methyl-phenylalanin, D,L-N-Methyl-phenylalanin | Bachem              |
| Natriumhydrogencarbonat                            | Merck               |
| HCl  | Merck               |

## 2.5.2. Methylierung

### 2.5.2.1. Methylierung mit Diazomethan

Diazomethan wird in der Regel jeweils frisch und nur in erforderlicher Menge aus N-Nitroso-N-Methylharnstoff dargestellt. Für die Methylierung von 2 mg des Biscumarins wurde 0.3 ml 40%ige KOH auf Eis mit 1.0 ml wasserfreiem Diethylether (getrocknet über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) überschichtet. Nach Zugabe von 4 Spatelspitzen N-Nitroso-N-Methylharnstoff färbt sich die organische Phase aufgrund des entstandenen Diazomethans gelb. Die etherische Diazomethanlösung wurde vollständig zur Probe in getrocknetem Methanol gegeben und anschließend über Nacht im Abzug geschüttelt. Lösungsmittel und eventuell verbliebenes Reagenz können am Rotationsverdampfer entfernt werden. Die Kontrolle auf erfolgte Methylierung wurde per LC-MS durchgeführt.

| <u>Chemikalien für die Methylierung mit Diazomethan</u> | <u>Hersteller .</u> |
|---|---------------------|
| Diethylether  | Merck               |
| Kaliumhydroxid-Plättchen                                | Roth                |
| N-Nitroso-N-Methylharnstoff                             | Sigma               |
| Natriumsulfat   | Roth                |

### 2.5.2.2. Methylierung mit Methyljodid

Zur Methylierung von 10 mg des Biscumarins wurde die Probe zunächst in 2.5 ml DMSO angelöst und anschließend mit 7.5 ml Aceton aufgefüllt. Nach Zugabe von 800 mg  $K_2CO_3$  wurde zum Trocknen der Probe mehrmals aufgeschüttelt. Anschließend wurde 200  $\mu$ l Methyljodid (toxisch, leicht flüchtig) zugegeben und der Ansatz 4 Stunden lang auf dem Wasserbad bei 40° C im Abzug unter mehrmaligem Aufschütteln stengelassen. Zum Abtrennen des  $K_2CO_3$  wurde zentrifugiert, und unter Stickstoff wurden Aceton und verbliebenes Methyljodid verdampft. Zur Entfernung des DMSO wurde im Folgenden die Probe gefriergetrocknet. Die Kontrolle auf erfolgte Methylierung wurde per LC-MS durchgeführt.

| <u>Chemikalien für die Methylierung mit Methyljodid</u> | <u>Hersteller .</u> |
|---|---------------------|
| $K_2CO_3$   | Baker               |
| Methyljodid   | Merck               |

## 2.6. Chemikalien, Reagenzien und Chromatographiezubehör

Nicht alle Chemikalien und Reagenzien und nicht jedes Chromatographiezubehör werden an dieser Stelle explizit aufgeführt. In der Regel wurde dies bereits in den einzelnen Methoden-Paragrafen getan. Folgende Chemikalien wurden von den Chemischen Instituten der Universitäten Würzburg bzw. Düsseldorf in technischer Qualität bezogen: Aceton, Cyclohexan, Dichlormethan, Chloroform, Ethanol, Ethylacetat, Hexan, Isopropanol, Methanol (diese Lösungsmittel wurden jeweils vor Gebrauch destilliert).

Das verwendete DMSO stammte von Merck (p.a.) bzw. Acros (zur Spektroskopie).

## 2.7. Geräte

Geräte und Instrumente, die hier nicht explizit erwähnt werden, finden sich in den Paragraphen der jeweiligen Methoden, bei denen sie eingesetzt werden.

Eine Liste der übrigen Geräte, die keiner einzelnen Methode zugeordnet werden können, findet sich im Anschluß:

| Gerät                                      | Hersteller |
|--|------------|
| Standard-Rührwerk RZR 2021                 | Roth       |
| Ultraturrax T18 Basic                      | Ika        |
| Analysenwaage AT200                        | Mettler    |
| Mikrowaage MC-1                            | Sartorius  |
| pH-Meter 420A+, pH-Elektrode Triode        | Orion      |
| Exsikkator                                 | Desaga     |
| Fraktionensammler                          |            |
| ■ LKB RediFrac                             | Pharmacia  |
| ■ Retriever II                             | ISCO       |
| Gefriertrockner Lyovac GT2                 | Steris     |
| (Vakuumpumpe Trivag DIOE)                  | Leybold    |
| Vakuumzentrifuge SPD 111V                  | Savant     |
| (Kühlfalle RVT 400                         | Savant     |
| Vakuumpumpe VLP 80)                        | Savant     |
| Heizplatte                                 | Camag      |
| Injektionsspritzen                         | Hamilton   |
| Labormixer, Commercial Blendor             | Waring     |
| Minishaker MS2                             | IKA        |
| Magnetrührer                               | Cenco      |
| Autoklav - Varioklav                       | H + P      |
| Cleanbench, HeraSafe                       | Heraeus    |
| Trockenschrank ET6130                      | Heraeus    |
| Ultraschallbad Sonorex RK 510S             | Bandelin   |
| UV-Lampen (254 nm und 366 nm)              | Camag      |
| Vakuum-Rotationsverdampfer Rotavapor R 200 | Büchi      |
| Heizbad B-490                              | Büchi      |

## Material und Methoden

| Gerät                                     | Hersteller |
|---|------------|
| Membranvakuumpumpe MZ 2C                  | Vacuubrand |
| Controller CVC 2 II                       | Vacuubrand |
| Labor- (Pico) und Tischzentrifuge (Primo) | Heraeus    |
| Stickstoffgenerator UHPN 3001             | Nitrox     |

### 3. Ergebnisse

Auf der Suche nach neuen – möglichst biologisch aktiven – Verbindungen wurden marine Pilz- und Bakterienisolate hinsichtlich der von ihnen produzierten Sekundärmetabolite untersucht. Als Quelle für diese mikrobiellen Isolate dienten Schwämme des Mittelmeeres, die während zweier Sammel-Exkursionen in den Gewässern um die Insel Elba in Italien gesammelt wurden. Das Schwammmaterial selbst wurde ebenfalls extrahiert und einem biologischen und chemischen Screening unterzogen sowie elektronenmikroskopisch analysiert.

#### 3.1. Ergebnisse der Bearbeitung des Schwammmaterials

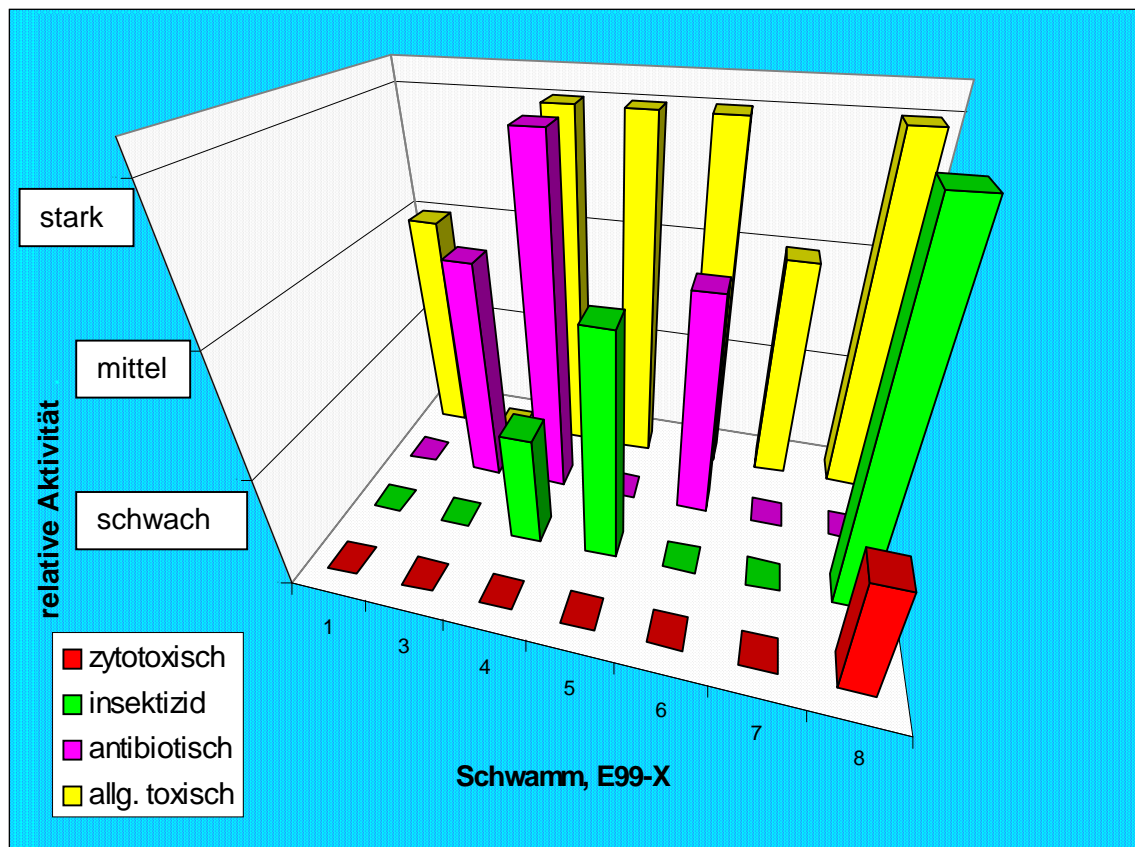
Von 15 gesammelten mediterranen Schwammarten wurde im Rahmen dieser Arbeit das Material von sieben Arten weitergehend untersucht: *Ircinia fasciculata*, *Axinella damicornis*, *Agelas oroides*, *Acanthella acuta*, *Spongia officinalis*, *Hamigera hamigera*, *Petrosia ficiformis*.

##### 3.1.1. Biologisches und chemisches Screening

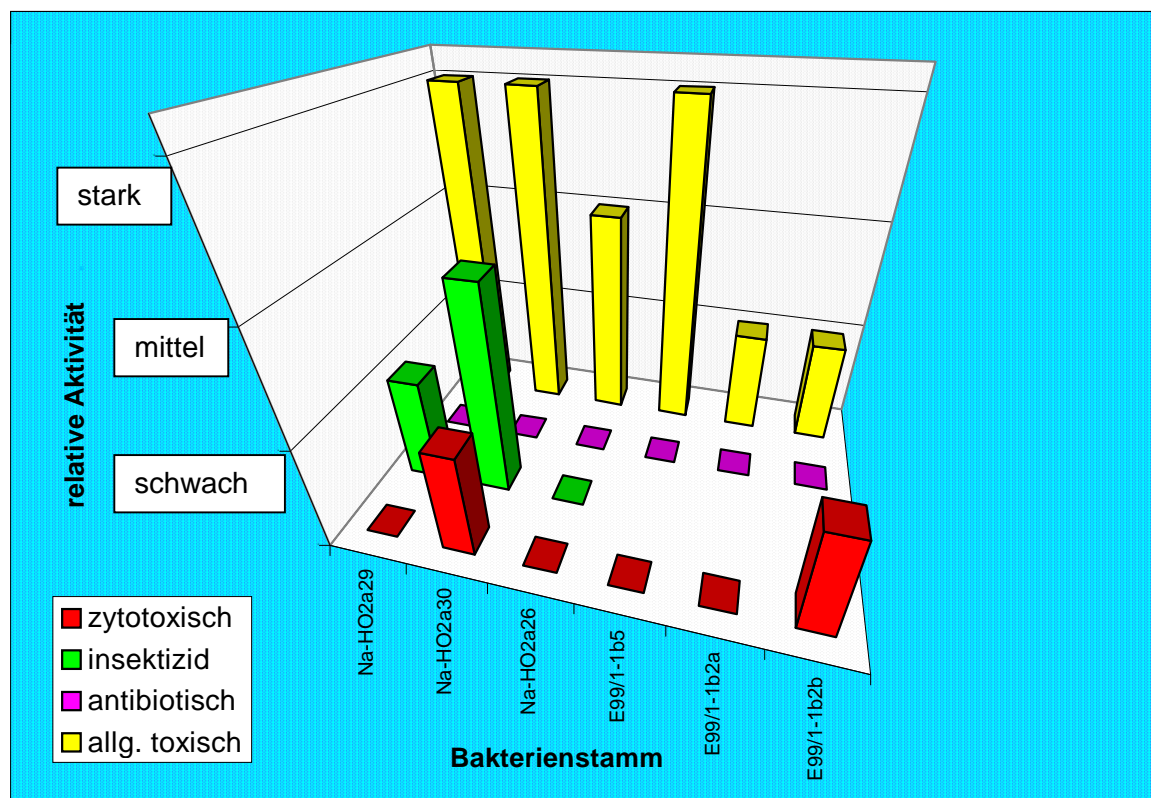
Die Ethylacetat-Extrakte der bearbeiteten Schwämme sowie die daraus hervorgegangenen Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung wurden mit den zur Verfügung stehenden vier Bioassays getestet und gemäß den Angaben in **Abb. M5** (siehe 2.2.) ausgewertet. Die Ergebnisse sind in **Abb. E1** graphisch dargestellt. Bei der Bewertung der Aktivität eines Extrakts wurde dem Zytotoxizitäts-Test die höchste Priorität eingeräumt. Die anderen Biotests wurden gemäß der folgenden Reihenfolge eingestuft: Fraßversuch mit *Spodoptera littoralis*, Agarplattendiffusionstest und *brine shrimp assay*.

Jeder der untersuchten Schwammextrakte zeigte mittlere bis starke Aktivität in einem oder mehreren Testsystemen. Aktiv im Assay der höchsten Priorität war lediglich der Extrakt von *P. ficiformis*. Allerdings sind laut MarinLit [MarinLit, 2002] in 43 Publikationen über 40 Inhaltsstoffe aus dieser Spezies bereits beschrieben, u.a. auch die stark zytotoxischen Petroformyne (Polyacetylene). Aufgrund dieses Befundes

## Ergebnisse



**Abb. E1:** Biologische Aktivität der Extrakte der Schwämme E99-1 bis E99-8 (Tab.M1)



**Abb. E2:** Bakterienstämme, die aus *Halichondria panicea* (Na-HO) bzw. *Ircinia fasciculata* (E99/1) isoliert wurden (Tab. M1 und Kapitel 2.1.1.4.) und deren Extrakte biologisch aktiv waren.

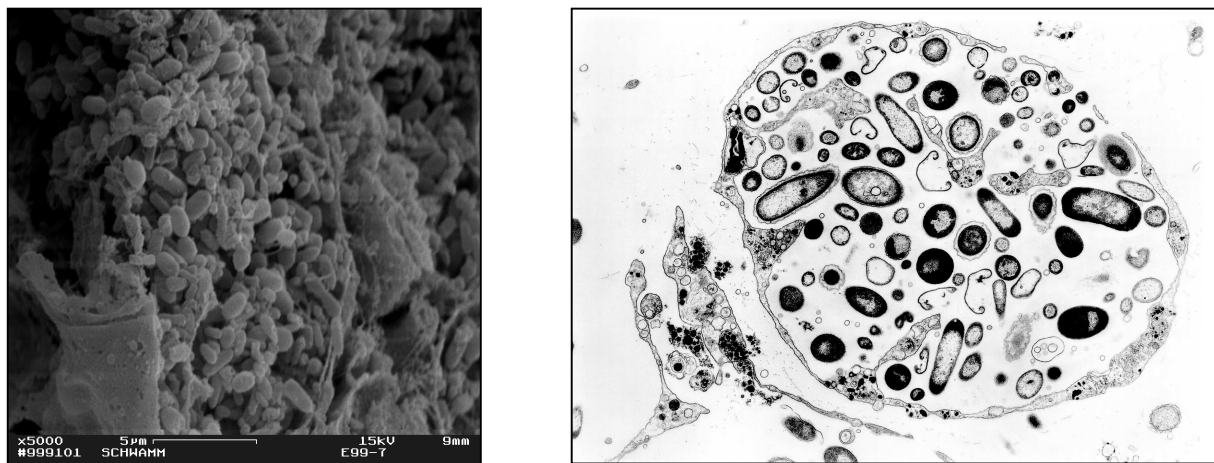


wurde eine weitere Untersuchung des Extrakts nicht in Betracht gezogen. Über Inhaltsstoffe aus *S. officinalis* existieren ebenfalls bereits über 40 Publikationen (81 beschriebene Inhaltsstoffe), und auch hier wurde von der weiteren Bearbeitung dieser Arten abgesehen. Von *A. damicornis* und *A. acuta* war mit weniger als 100 g Biomasse nicht genügend Material für die Aufarbeitung vorhanden und die biologische Aktivität von Extrakten von *A. oroides* ist bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen hinlänglich untersucht worden und viele wirksame Verbindungen aus diesem Schwamm sind schon bekannt (13 Verbindungen in 18 Publikationen), [MarinLit, 2002]. *I. fasciculata* und *H. hamigera* wurden aufgrund der Screening-Ergebnisse von einer weiteren Bearbeitung ausgeschlossen, da die mittlere Aktivität im *brine shrimp assay* (geringste Priorität) als nicht hinreichend eingestuft wurde. Aus den oben genannten Gründen wurde das gesammelte Schwammmaterial im folgenden nicht weiter bearbeitet, sondern die Suche nach neuen Naturstoffen konzentrierte sich auf die Extrakte der aus diesen Schwammarten gewonnenen Mikroorganismen.

### 3.1.2. Elektronenmikroskopie

Parallel zur Anzucht der ersten Kulturen von schwamm-assoziierten Mikroorganismen wurde das Schwammgewebe der verschiedenen Arten mittels Elektronenmikroskopie hinsichtlich der Besiedlung durch Pilze und/ oder Bakterien untersucht. Mit Hilfe des im Raster- bzw. Transmissionselektronenmikroskops wurde festgestellt, daß sechs von acht Spezies von Bakterien in unterschiedlich großer Zahl und Dichte besiedelt waren (**Abb. E3**).

Besonders viele Bakterien konnten in den badeschwamm-artigen *I. fasciculata* und *S. officinalis* sowie in *P. ficiformis* nachgewiesen werden. In den Präparaten von *C. reniformis*, *A. oroides*, *A. acuta* und *H. hamigera* konnten z.T. nur vereinzelte bis einige wenige Bakterien entdeckt werden. In *A. damicornis* wurden keine Bakterienzellen gefunden. Trotz intensiver Suche konnten in keinem der Präparate Hinweise auf die Besiedlung durch Pilze (z.B. Vorhandensein von Hyphen) gefunden werden. Dennoch konnten aus dem Gewebe der verschiedenen gesammelten Schwämme über 400 Pilzstämme isoliert werden.



**Abb. E3:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Petrosia ficiformis* (E99-8): REM eines Gewebebruchstücks (links) und TEM von Bakterien in einer Kragengeißelzellokammer (rechts).

## 3.2. Ergebnisse der Bearbeitung von Kulturen mariner Bakterien

### 3.2.1. Biologisches und chemisches Screening

Insgesamt wurden die Extrakte von 64 Bakterienstämmen in das biologische und chemische Screening integriert. Hierbei wurden nach erfolgter Flüssig-Flüssig-Verteilung sowohl die Methanol-Wasser-Phase als auch die Cyclohexanphase der einzelnen Extrakte untersucht.

In allen vier biologischen Testsystemen wurden die Extrakte von 24 Stämmen getestet. Die Extrakte der 40 restlichen Stämme wurden lediglich auf Zytotoxizität getestet. Von diesen Proben war keine im XTT-Test aktiv.

Von den Extrakten der 24 bakteriellen Isolate, die in allen Testsystemen analysiert worden waren zeigten sechs eine schwache bis starke allgemeine Toxizität (**Abb. E2**). Zwei dieser Stämme waren zusätzlich aktiv im Fraßversuch mit *Spodoptera littoralis* und zwei zeigten auch zytotoxische Aktivität im XTT-Test. Der Extrakt einer unbeimpften Mediumskontrolle zeigte in keinem der vier Bioassays eine Aktivität.

Die Chromatogramme der wenigen aktiven Extrakte waren z.T. sehr komplex bei gleichzeitig äußerst geringen Extraktmengen pro angesetzttem Kulturvolumen und wurden daher nicht für eine Nachzucht zwecks Isolierung von Naturstoffen in Betracht gezogen.

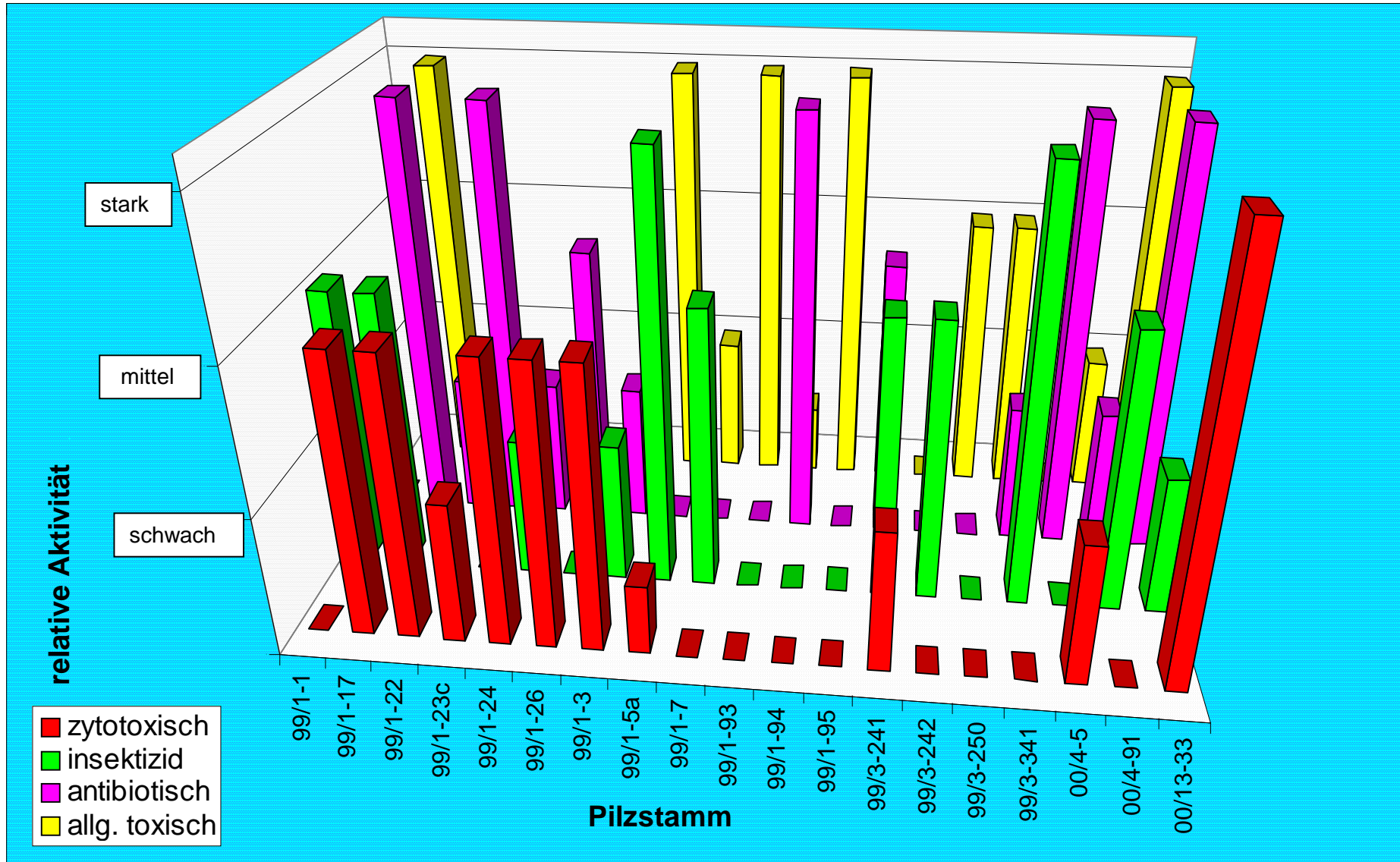
### 3.3. Ergebnisse der Bearbeitung von Kulturen mariner Pilzisolat

#### 3.3.1. Biologisches und chemisches Screening

Aus den gesammelten Schwammspezies wurden über 400 Pilzstämme isoliert. Unter den isolierten Pilzen befinden sich u.a. Vertreter der Gattungen *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Verticillium*. Für die Berücksichtigung für die Anzucht zwecks Screening wurden diejenigen Pilzstämme bevorzugt, die bereits bei der Anzucht dadurch aufgefallen waren, daß sie nicht von anderen Mycelien der Mischkultur überwachsen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Extrakte von 39 für das Primärscreening angezogenen Pilzstämmen bearbeitet. Hierbei wurden sowohl die Methanol-Wasser-Phase als auch die Cyclohexanphase untersucht. Nach der Analyse der Extrakte mittels HPLC und LC-MS wurden sieben Duplikate anhand ihrer chromatographischen Eigenschaften identifiziert und vom weiteren Screening ausgeschlossen. Von den für das Screening verbliebenen 32 Anzuchten zeigten die Extrakte von 26 Stämmen eine schwache bis starke Aktivität in einem der Tests (**Abb. E4**). 19 dieser Extrakte waren sogar in zwei oder mehr der eingesetzten Testsysteme aktiv. Die Aktivität befand sich in allen Fällen ausschließlich in der Methanol-Wasser-Phase. Zudem stellte sich heraus, daß entsprechend der HPLC-Chromatogramme die chemische Zusammensetzung der Cyclohexan-Phasen offensichtlich sehr ähnlich war.

Die Aktivitäten der Extrakte verteilten sich auf die verschiedenen Assays in der folgenden Weise: bei neun dieser Extrakte war die Aktivität im Zytotoxizitätstest zu finden. Die Extrakte von elf Stämmen waren aktiv im Fraßversuch mit *S. littoralis*.

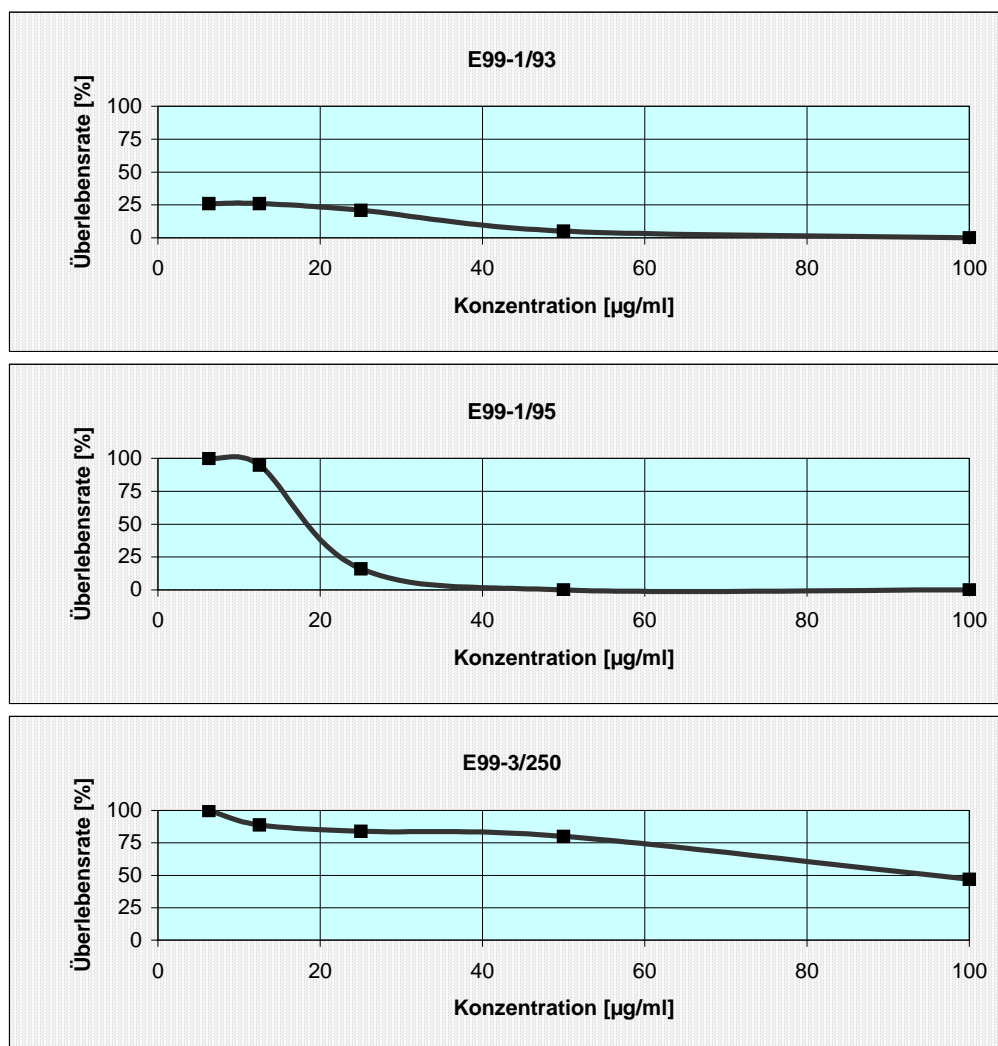


**Abb. E4:** Pilzstämme, die aus den 1999 (99) und 2000 (00) gesammelten Schwämmen (**Tab. M1**) isoliert wurden und deren Extrakte biologisch aktiv waren.

## Ergebnisse

Ebenfalls elf Extrakte fielen auf durch ihre antibiotische Aktivität im Agarplattendiffusionstest und weitere elf Extrakte zeigten Aktivität im *brine shrimp* assay. Der Extrakte des Pilz-Isolats E00-13/33 fiel besonders auf durch seine Aktivität in allen vier Testsystemen.

Der Extrakt einer unbeimpften Mediumskontrolle zeigte in keinem der vier Bioassays eine Aktivität. Da zu Beginn des BMBF-Verbundprojektes „Bioaktive Naturstoffe: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“, FKZ 03F0239A die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Tests noch nicht vorlagen, wurden unter den im *brine shrimp* assay aktiven Proben die aktivsten in Dosis-Wirkungsexperimenten ermittelt (z.B. E99/1-95, **Abb. E5**) bzw. die Proben gewählt, die mittlere bis starke insektizide Aktivität hatten (E99/1-7, E99/3-341, E00/13-33).



**Abb. E5:** Ergebnisse der Dosis-Wirkungsexperimente mit Pilzextrakten im *brine shrimp* assay. Getestet wurde in fünf Konzentrationen [6.25, 12.5, 25, 50 und 100 µg/ml]. Nach 24 Stunden wurde die Überlebensrate der Nauplien bestimmt.

Die Chromatogramme der vier ausgewählten Stämme wurden zusätzlich per HPLC analysiert. Hierbei wurden die UV-Spektren der einzelnen Komponenten der Extrakte zunächst untereinander verglichen. Der Extrakt von E99/1-95 bestand aus lediglich zwei Hauptpeaks mit unterschiedlichen UV-Spektren. Die anderen Extrakte bestanden aus 5 - 7 Hauptpeaks und mehr oder weniger vielen Nebenkomponten. Die Extrakte zeigten alle ein hohes Maß an Diversität der UV-Spektren ihrer Bestandteile.

Zusätzlich wurde eine Datenbank-Recherche durchgeführt, bei der die UV-Spektren der Extraktkomponenten mit den UV-Spektren der im Arbeitskreis etablierten Spektrenbibliothek gespeicherten Reinsubstanzen verglichen wurden (vgl. 2.3.6.1.).

Da in keinem der Extrakte UV-Spektren mittels der Spektrenbibliothek identifiziert werden konnten, wurden schließlich E99/1-95, E99/1-7, E99/3-341 und E00/13-33 für eine Anzucht in großem Maßstab (2 - 12 Liter) ausgewählt.

### **3.3.2. Isolierung, Identifizierung und Strukturaufklärung von Pilzmetaboliten**

Auf der Basis der Daten aus dem biologischen und chemischen Screening der Extrakte mariner Pilz-Isolate wurden vier Stämme als Kandidaten für eine Anzucht in größerem Volumen zwecks Isolierung der in ihren Extrakten enthaltenen Sekundärmetaboliten ausgewählt.

In Vorversuchen wurde exemplarisch am Beispiel von E99/1-95 die Extraktionsmethode auf der Basis der Standardextraktionsmethode für das Screening von Pilzkulturen (vgl. 2.1.3.2.) optimiert. Hierfür wurden 600 ml der Kultur drei mal mit Ethylacetat extrahiert (Verhältnis von Lösungsmittel zu Kulturvolumen = a) 1:2, b) und c) 1:4). Der Anteil der hieraus hervorgegangenen Teilextrakte am Gesamtextrakt (454 mg) betrug a) 77%, b) 17% und c) 6%. Daraus wurde abgeleitet, daß drei Extraktionsschritte bei einem Gesamtverhältnis von 1:1 für Lösungsmittel:Kulturvolumen unter Berücksichtigung des Arbeitsaufwands das optimale Ergebnis liefern. Analog wurde bei der Optimierung des Entfettungsschritts verfahren. Der in eine wässrige Methanol-Phase überführte Extrakt wurde drei mal mit Cyclohexan (1:1, 1:2, 1:3) ausgeschüttelt. Dabei wurden insgesamt 204 mg stark lipophile Verbindungen abgetrennt (1. 75%, 2. 18%, 3. 6%). Der Anteil dieser

lipophilen Phase am Gesamtextrakt lag bei allen bearbeiteten Pilzkulturextrakten zwischen 30 und 50 %. Da die Cyclohexan-Phase in allen untersuchten Fällen weder biologisch aktiv war noch chemisch variierte, stellte sich die Abtrennung dieses Extraktteils in drei Stufen als eine sinnvolle Anreicherung der aktiven Komponenten des Extrakts heraus.

Bei der Extraktion von 600 ml unbeimpftem Kontrollmedium nach dem Standardextraktionsverfahren wurde festgestellt, daß beim Waschen des Ethylacetatextrakts mit demineralisiertem Wasser 120 mg wasserlösliche Bestandteile entfernt wurde. Dabei dürfte es sich zum weitaus größten Teil um Natriumchlorid und andere Salze handeln, die dem Meerwasser-Medium entstammten. Dieser Reinigungsschritt wurde bei allen Extrakten von Großkulturen durchgeführt.

Die in den Strukturdatenblättern der isolierten Naturstoffe angegebenen Retentionszeiten gelten für die HPLC-DAD unter Verwendung des Standardgradienten. Die UV-Spektren der Verbindungen stammen aus den HPLC-DAD-Läufen der Reinsubstanzen.

Die  $R_f$ -Werte wurden mit DC-Fertigplatten (Kieselgel 60  $F_{254}$ ) bei einem Fließmittelgemisch von Dichlormethan und Methanol (90:10, + 0.1% TFA) ermittelt. Nach der Entwicklung der Platte wurde unter der UV-Lampe bei 254 (Fluoreszenzlöschung) und 366 nm (Eigenfluoreszenz) ausgewertet und anschließend mit Anisaldehyd-Schwefelsäure- bzw. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz besprüht und erneut ausgewertet.

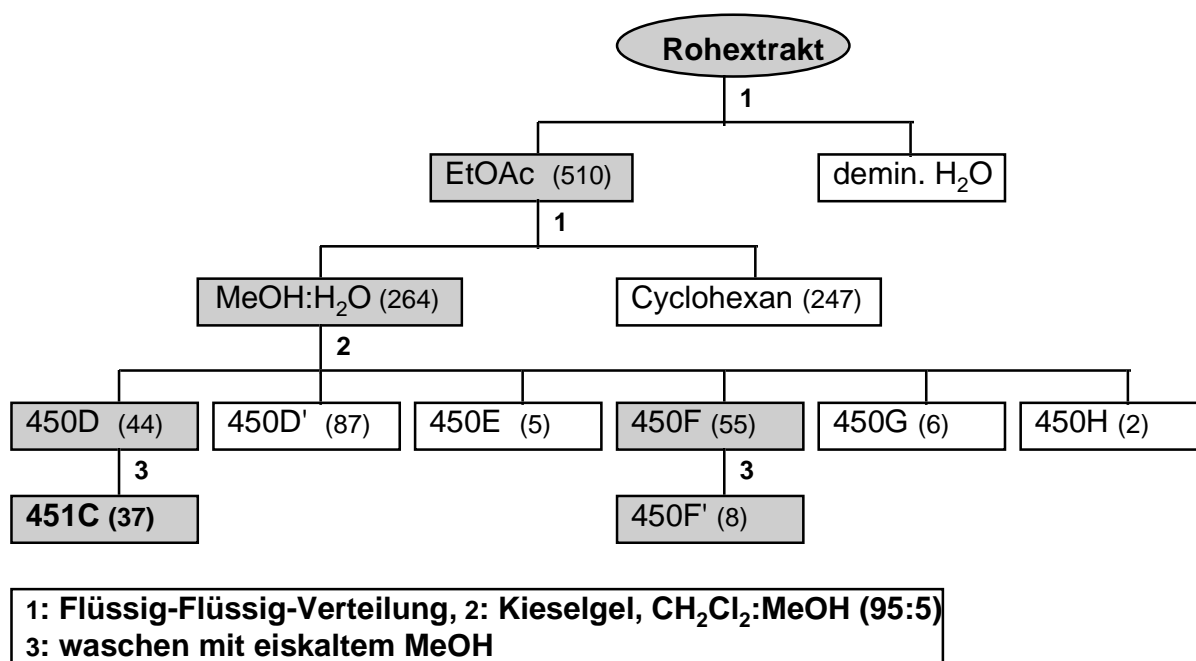
### 3.3.2.1. Cycloaspeptid aus *Penicillium* sp. (E99/1-95)

Im biologischen Screening war der Extrakt von E99/1-95 zunächst durch eine starke Aktivität im *brine shrimp* assay aufgefallen. Da zum damaligen Zeitpunkt noch keine Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung vorlagen wurden Dosis-Wirkungsexperimente mit dem Extrakt im *brine shrimp* assay durchgeführt. Getestet wurde in sechs Konzentrationen und der auf diese Weise graphisch ermittelte  $LC_{50}$ -Wert betrug 15 - 25  $\mu\text{g/ml}$  (vgl. **Abb. E5**). Die Kurve wies den erwarteten sigmoiden Verlauf auf. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Entscheidung für diesen Extrakt durch Daten aus dem MTT-Assay bestätigt. Hier wurde bei einer Konzentration von 3.16  $\mu\text{g/ml}$

eine schwache zytotoxische Aktivität (50 - 75 % Hemmung) des Extrakts gegenüber KB-, SF-268 und NCI-H460-Zellen festgestellt.

Das Chromatogramm von E99/1-95 wurde dominiert von zwei Hauptpeaks mit unterschiedlichen UV-Spektren. Da hier eine schnelle Auftrennung des Extrakts absehbar war, wurde dieser Stamm als einer der Kandidaten für eine Großanzucht festgelegt. Das Kulturvolumen wurde hier aufgrund der geringen Komplexität des Extrakts (bei einer „Extraktmenge“ von 125 mg (Methanol-Phase) pro 600 ml Kulturvolumen) auf zwei Liter festgelegt.

Beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Extrakte der Screening-Kultur und der Großanzucht per HPLC konnten keine Unterschiede ausgemacht werden.



**Abb. E6:** Trennschema für den Rohextrakt (JH0436I) der Kultur von *Penicillium* E99/1-95: in Klammern = Ausbeute in Milligramm, grau unterlegt = aktive Fraktionen im *brine shrimp* assay, fettgedruckt = Reinsubstanzen.

In den gemäß 2.1.3.2. durchgeführten Extraktionsexperimenten stellte sich heraus, daß die beiden Hauptkomponenten in den Chromatogrammen des Methanol-Extrakts des Mycels sowie des Ethylacetat-Extrakts des Mediums vertreten waren. 92% der Gesamtextraktmenge waren im Methanol-Extrakt des Mycels zu finden. Der Quotient aus der Summe aller Peakflächen eines Chromatogramms pro Menge des eingesetzten Extrakts (bei 20 µl Extrakt auf 400 µl Lösungsmittel der HPLC-Probe) drückt die „Reinheit“ eines Extraktes aus. Mit 0.23 lag dieser Wert für den Methanol-Extrakt des Mycels um ca. den Faktor 20 niedriger als der des Ethylacetat-Extrakts



des Mediums (5.57). Verwendete man diese Werte als Korrekturfaktoren für die Extrakte, so erhielt man für den Methanol-Extrakt des Mycels  $783 \text{ mg} \times 0.23 = 180 \text{ mg}$  und für den Ethylacetat-Extrakt des Mediums  $58 \text{ mg} \times 5.57 = 323 \text{ mg}$ . Die relative Menge an UV-absorbierenden Bestandteilen, die in der Regel auch Träger der biologischen Aktivität sind, war also im Ethylacetat-Extrakt des Mediums fast doppelt so hoch. Aus diesem Grund wurde von der 2-Liter-Kultur von E99/1-95 lediglich der Mediumsanteil mit Ethylacetat erschöpfend extrahiert.

Nach dem in **Abb. E6** präsentierten bioassay-gestützten Isolierschema wurde aus E99/1-95 eine Verbindung (JH0451C) isoliert, die in eiskaltem Methanol ausfiel und in Dichlormethan bzw. Chloroform wieder gelöst werden konnte. Auf diese Art und Weise konnte die Verbindung bis zur nahezu vollständigen Reinheit mehrmals mit eiskaltem Methanol gewaschen werden. In einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (z.B. 90:10) kann die Verbindung innerhalb weniger Tage in Form kleiner Kristallnadeln auskristallisiert werden.

Bei der isolierten Verbindung handelt es sich um ein cyclisches Pentapeptid, das Cycloaspeptid (Strukturdaten, Strukturaufklärung und biologische Aktivität: siehe unten). Die zweite Hauptkomponente des Extrakts konnte ebenfalls isoliert werden (JH0450F'). Diese Komponente war ebenfalls biologisch aktiv im *brine shrimp assay*. Aufgrund ihrer Instabilität war die Strukturaufklärung dieser Verbindung jedoch leider nicht möglich.

### **Cycloaspeptid A**

Die Hauptkomponente des Extrakts von E99-1/95 war JH0451C' und zeigte im EI-Massenspektrum ein Molekülion-Signal mit ungerader Masse (641 amu). Dies deutete auf die Anwesenheit einer ungeradzahligem Anzahl von Stickstoffatomen in der Verbindung hin. Das Vorhandensein von vier Signalen im für  $\alpha$ -Protonen in Peptiden charakteristischen Bereich des  $^1\text{H}$ -Spektrums (ca. 4 - 6 ppm) und die mindestens vier Signale für sauerstoffgebundene Kohlenstoffatome im tiefen Feld des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums ließen vermuten, daß es sich um ein Peptid aus mindestens vier Aminosäuren handeln könnte.

Auffällige Signale des  $^1\text{H}$ -Spektrums waren des weiteren ein Dublett für eine Methylgruppe im extrem hohen Feld bei 0.41 ppm, zwei weitere Dubletts für aliphatische Methylgruppen, die bei 1.00 ppm zusammenfielen und zwei Singuletts für N-Methylgruppen bei 2.69 und 2.86 ppm. Zwischen 1 und 4 ppm lagen sechs Multipletts für insgesamt sieben aliphatische Protonen, im aromatischen Bereich zwischen 6.5 und 7.5 ppm lagen die Signale von 16 Protonen und zusätzlich gab es noch zwei tiefer liegende Signale bei 8.90 (d) und 12.00 (s) ppm.

Das außergewöhnlich hohe Methylgruppensignal bei 0.41 ppm koppelte mit einem der  $\alpha$ -Protonen bei 4.41 ppm mit einer Kopplungskonstante von 6.6 Hz, wie es auch charakteristisch für Alanin ist. Die zwei weiteren aliphatischen Methylgruppenprotonen koppelten wie im COSY-Spektrum zu erkennen war mit einem gemeinsamen, benachbarten Proton im hohen Feld bei 1.65 ppm (m). Die Kopplungskonstante betrug hier 6.7 Hz. Damit ergab sich eine  $\text{R-CH}(\text{CH}_3)_2$ -Substruktur, wie sie in den Aminosäuren Valin oder Leucin auftritt. Im COSY-Spektrum war eine weitere Kopplung des einzelnen Protons bei 1.65 ppm mit zwei Protonen bei 1.35 und 1.85 ppm zu erkennen. Letztere koppelten miteinander mit einer für geminale Protonen typischen Kopplungskonstante von 13 Hz und wiesen ihrerseits Kreuzsignale mit einem  $\alpha$ -Proton bei 4.70 ppm auf. Damit war auch die zweite Aminosäure des Peptids identifiziert: es handelt sich um Leucin.

Die Signale im aromatischen Bereich deuteten auf mindestens drei aromatische Systeme hin, von denen eines als AA'BB'-System erschien (2 Dubletts für jeweils 2 Protonen bei 6.75 und 7.00 ppm mit einer Kopplungskonstante von 8.5 Hz und Kreuzsignalen im COSY-Spektrum). Dies war ein Hinweis darauf, daß es sich bei einer der aromatischen Aminosäuren um Tyrosin handeln könnte. Um die zum Tyrosin gehörigen  $\text{CH}_2$ -Protonen zu identifizieren, mußten die Informationen aus den HMQC- und dem HMBC-Spektren herangezogen werden. Das HMQC-Spektrum ergab, daß die Protonen bei 7.00 ppm mit den Kohlenstoffatomen bei 130.0 ppm verknüpft sind. Aufgrund der Symmetrie des 1,4-disubstituierten Benzolringes fallen die Signale für die Positionen Tyr-5 und -9 sowie Tyr-6 und -8 des Tyrosins jeweils zusammen. Eine diastereotope Methylengruppe ( $\delta\text{H}_a = 3.50$ ,  $\delta\text{H}_b = 3.35$ ,  $^2\text{J}_{ab} = 14$  Hz,  $\delta\text{C} = 32.1$ ) zeigte im HMBC-Spektrum eine *long-range* Korrelation zu dem Kohlenstoffsignal von Tyr-5/-9 sowie im COSY-Spektrum eine Kopplung zu einem  $\alpha$ -Proton bei 3.80 ppm. Somit ergab sich eindeutig, daß es sich bei der dritten Aminosäure um Tyrosin handelt.

**Cycloaspeptid A**

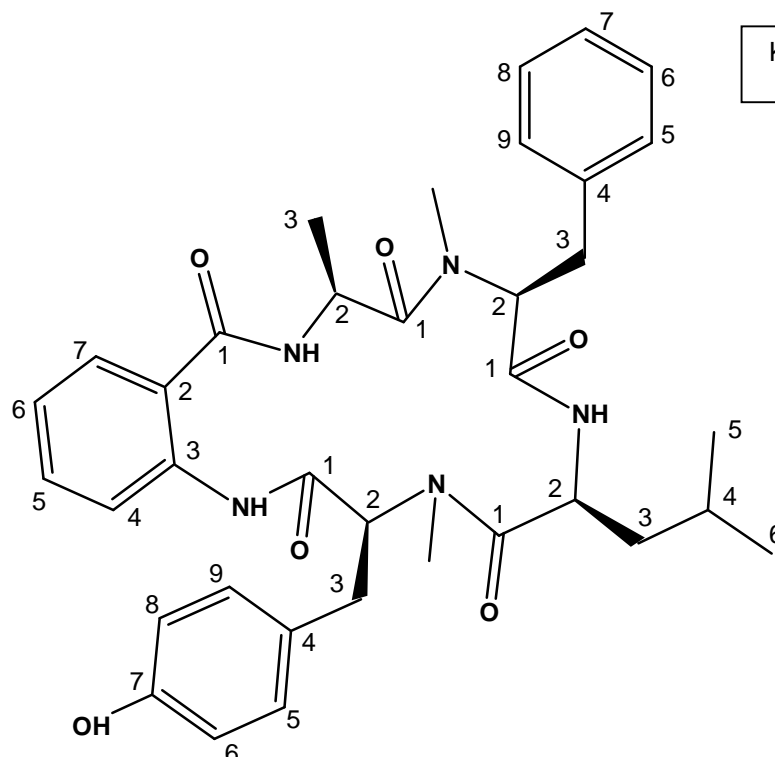
Systemat. Name : Cyclo(L-alanyl-N-methyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-N-methyl-L-tyrosyl-2-aminobenzoyl)

Beschreibung : farblose Kristallnadeln

Probencode : JH0451C'      Substanzmenge : 35.3 mg

Summenformel : C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>      Molekulargewicht : 641 g/mol

Quellorganismus : *Penicillium* sp. aus *Ircinia fasciculata* (E99/1-95)



Kobayashi *et al.*,  
1986

Retentionszeit : 28.1 min.

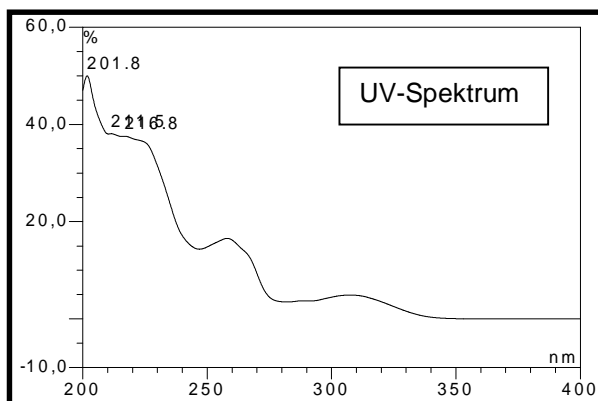
R<sub>f</sub>-Wert : 0.66

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : blau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : gelb

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : gelb



Spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  : exp. = - 234° ( $c = 1.01$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit. = - 228° ( $c = 1.01$ , CHCl<sub>3</sub>)

ESI-MS ( $m/z$ ): 642.3 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 640.6 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)

EI-MS ( $m/z$ , rel. Int.): 641 [M]<sup>+</sup> (30), 497 (55), 421 (18), 352 (17), 266 (28), 189 (31), 150 (40), 147 (47), 134 (100), 120 (41), 107 (29), 91 (23), 55 (23), 44 (37)

**NMR-Daten von Cycloaspeptid A in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz), Teil I**

| Pos.          | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)                       | COSY* (H→H)                                 | TOCSY (H→H)                          | NOESY* (H→H)                                       | HMQC (H→C) | HMBC (H→C)       |
|---------------|-------------------------|--|---|--------------------------------------|--|------------|------------------|
| <b>ABA-1</b>  | 169.6 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-2</b>     | 114.8 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-3</b>     | 141.4 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-4</b>     | 120.8 (d)               | 8.90 (1H, dd, 1.0, 8.5)  | ABA-5                                       | ABA-5, -6, -7                        | ABA-5  | ABA-4      | ABA-2, -6        |
| <b>-5</b>     | 134.4 (d)               | 7.45 (1H, „dt“, 1.5, 8.5)                                      | ABA-4, -6                                   | ABA-4, -6, -7                        | ABA-4, -6  | ABA-5      | ABA-3, -7        |
| <b>-7</b>     | 126.9 (d)               | 7.40 (1H, dd, 1.5, 8.5)  | ABA-6                                       | ABA-4, -5, -6                        | ABA-6  | ABA-7      | ABA-1, -3, -5    |
| <b>-NH</b>    |                         | 12.00 (1H, s, NH)  |   |                                      | Tyr-2, -NMe  |            | ABA-2, -4, Tyr-1 |
| <b>Ala -1</b> | 174.2 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-2</b>     | 44.4 (d)                | 4.41 (1H, m, 6.9)  | Ala-3, -NH                                  | Ala-3, -NH                           | Ala-3, Phe-2                                       | Ala-2      |                  |
| <b>-3</b>     | 16.1 (q)                | 0.41 (3H, d, 6.6, CH <sub>3</sub> )                            | Ala-2                                       | Ala-2, -NH                           | Ala-2  | Ala-3      | Ala-1, -2        |
| <b>-NH</b>    |                         | 7.22 (1H, bs)  |   | Ala-2, -3                            |  |            |                  |
| <b>Phe -1</b> | 168.3 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-2</b>     | 63.4 (d)                | 5.20 (1H, dd, 3.0, 11.8)                                       | Phe-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>A</sub> , -NMe | Phe-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> | Phe-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -5/9, Ala-2 | Phe-2      | Phe-1, -NMe      |
| <b>-3</b>     | 34.1 (t)                | 3.50 (1H, m, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe)              | Phe-2, -3 <sub>B</sub>                      | Phe-2, -3 <sub>B</sub>               | Phe-2, -3 <sub>B</sub> , -5/9                      | Phe-3      | Phe-4, -5/9      |
|               |                         | 2.95 (1H, dd, 12.0, 14.5, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe) | Phe-2, -3 <sub>A</sub>                      | Phe-2, -3 <sub>A</sub>               | Phe-2, -3 <sub>A</sub> , -5/9                      | Phe-3      | Phe-2, -4, -5/9  |
| <b>-4</b>     | 137.5 (s)               |  |   |                                      |  |            |                  |
| <b>-5/9</b>   | 129.4 (2d)              | 7.20 (2H, d, 7.5)  | Phe-6/8                                     | Phe-6/8, -7                          | Phe-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -6/8    | Phe-5/9    | Phe-3, -6/8      |
| <b>-6/8</b>   | 129.2 (2d)              | 7.30 (2H, „t“)   | Phe-5/9                                     | Phe-5/9, -7                          | Phe-5/9  | Phe-6/8    | Phe-4, -5/9      |
| <b>-7</b>     | 127.3 (d)               | 7.25 (1H, d, 7.5)  |   | Phe-5/9, -6/8                        |  | Phe-7      | Phe-5/9          |
| <b>-NMe</b>   | 30.1 (q)                | 2.86 (3H, s, NCH <sub>3</sub> )                                | Phe-2                                       |                                      | Phe-2  |            | Phe-2, Ala-1     |

**NMR-Daten von Cycloaspeptid A in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz), Teil II**

| Pos.          | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)                          | COSY* (H→H)                                   | TOCSY (H→H)  | NOESY* (H→H)  | HMQC (H→C) | HMBC (H→C)    |
|---------------|-------------------------|---|---|--|---|------------|---------------|
| <b>Leu -1</b> | 169.6 (s)               |   |   |  |   |            |               |
| <b>-2</b>     | 49.0 (d)                | 4.70 (1H, ddd, 5.5, 8.5, 8.5)                                     | Leu-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub>          | Leu-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -4, -5, -6, -NH | Leu-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -5, -6, -NH, Tyr-NMe | Leu-2      |               |
| <b>-3</b>     | 41.2 (t)                | 1.85 (1H, ddd, 5.5, 8.5, 13.0, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> OH) | Leu-2, -3 <sub>B</sub> , -4                   | Leu-2, -3 <sub>B</sub> , -4, -5, -6, -NH               | Leu-2, -3 <sub>B</sub> , -5, -6                             | Leu-3      |               |
|               |                         | 1.35 (1H, ddd, 5.5, 8.5, 13.0, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> OH) | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -4, -NH              | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -4, -5, -6, -NH               | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -5, -6                             | Leu-3      |               |
| <b>-4</b>     | 24.9 (d)                | 1.65 (1H, m)  | Leu-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -5, -6 | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -5, -6, -NH |   | Leu-4      |               |
| <b>-5</b>     | 23.4 (q)                | 1.00 (3H, d, 6.7, CH <sub>3</sub> )                               | Leu-4   | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -4, -6, -NH | Leu-2   | Leu-5      | Leu-3, -4     |
| <b>-6</b>     | 21.9 (q)                | 1.00 (3H, d, 6.7, CH <sub>3</sub> )                               | Leu-4   | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -4, -5, -NH | Leu-2   | Leu-6      | Leu-3, -4     |
| <b>-NH</b>    |                         | 7.40 (1H, bs, NH)   |   | Leu-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -4, -5, -6  | Leu-2   |            |               |
| <b>Tyr -1</b> | 168.1 (s)               |   |   |  |   |            |               |
| <b>-2</b>     | 70.0 (d)                | 3.80 (1H, dd, 4.5, 11.0)  | Tyr-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub>          | Tyr-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub>                   | Tyr-3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , -5/9, -NMe, ABA-NH   | Tyr-2      |               |
| <b>-3</b>     | 32.1 (t)                | 3.50 (1H, m, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe)                 | Tyr-2, -3 <sub>B</sub>                        | Tyr-2, -3 <sub>B</sub>                                 | Tyr-2, -3 <sub>B</sub> , -5/9, -NMe                         | Tyr-3      | Tyr-5/9       |
|               |                         | 3.35 (1H, dd, 11.0, 14.0, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe)    | Tyr-2, -3 <sub>A</sub>                        | Tyr-2, 3 <sub>A</sub>                                  | Tyr-2, -3 <sub>A</sub> , -5/9, -NMe                         | Tyr-3      | Tyr-2, -5/9   |
| <b>-4</b>     | 130.0 (s)               |   |   |  |   |            |               |
| <b>-5,9</b>   | 130.2 (2d)              | 7.00 (2H, d, 8.5)   | Tyr-6/8                                       | Tyr-6/8  | Tyr-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub>                    | Tyr-5/9    | Tyr-3, -4, -7 |
| <b>-6,8</b>   | 115.7 (2d)              | 6.75 (2H, d, 8.5)   | Tyr-5/9                                       | Tyr-5/9  |   | Tyr-6/8    | Tyr-5/9, -7   |
| <b>-7</b>     | 155.0 (s)               |   |   |  |   |            |               |
| <b>-NMe</b>   | 39.1 (q)                | 2.69 (3H, s, NCH <sub>3</sub> )                                   |   |  | Tyr-2, -3 <sub>A</sub> , -3 <sub>B</sub> , Leu-2, ABA-NH    |            | Tyr-2, Leu-1  |

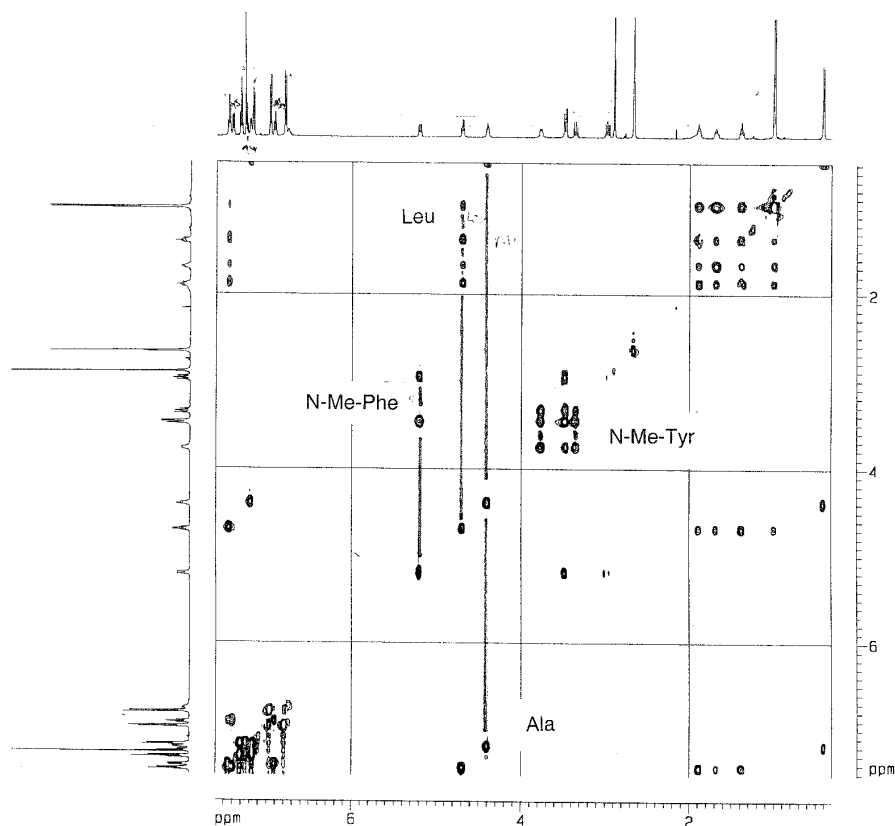
Die weiteren aromatischen Signale im  $^1\text{H}$ -Spektrum waren aufgrund von Signal-Überlagerungen nur mit Hilfe des TOCSY-Spektrums voneinander zu trennen. Hier war gut zu erkennen, daß die Signale bei 7.20 und 7.30 ppm (jeweils 2 Protonen) und das Signal bei 7.25 ppm zu einem Spin-System (A) gehörten, während die vier Signale bei 6.80, 7.40, 7.45 und 8.90 ein zweites Spin-System (B) bildeten (**Abb. E7**).

Spinsystem A wies mit insgesamt fünf aromatischen Protonen das typische Muster eines monosubstituierten Aromaten auf. Innerhalb der proteinogenen Aminosäuren tritt eine solcher Substituent nur bei Phenylalanin auf. Eine Interpretation des  $^1\text{H}$ -Spektrums wäre ohne eine exakte Computeranalyse nicht möglich gewesen, da es sich um ein Spektrum höherer Ordnung handelt. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum hingegen erschienen die aus Symmetriegründen zu erwartenden vier Signale für Phe-4, Phe-5/-9, Phe-6/-8 und Phe-7. Analog zum Tyrosin konnten auch hier die dazu gehörigen  $\text{CH}_2$ -Protonen mit Hilfe von CH-direkt- und *long-range*-Kreuzsignalen ausgemacht werden. Diese koppelten ihrerseits ebenfalls mit einem der  $\alpha$ -Protonen und somit waren alle Signale für die vierte Aminosäure, Phenylalanin, identifiziert.

Das verbliebene Spinsystem B war vom Typ ABCD und war mit je zwei Protonen, die wie Triplets erschienen, und zwei Protonen, die als Dubletts erschienen typisch für einen 1,2-disubstituierten Phenylring. Mittels HMQC-Spektrum wurden zunächst die Protonen den jeweiligen direkt verknüpften Kohlenstoffatomen zugeordnet. Die HMBC-Signale aus dem aromatischen Teil zu einer Carbonylgruppe bei 169.6 ppm sowie zu einem NH-Proton bei 12.00 ppm sowie die Tatsache, daß zwei quartäre C-Atome im Aromaten vorlagen, deren Signale bei 114.8 und 141.4 ppm zu finden waren, deuteten darauf hin, daß es sich bei der letzten verbliebenen Substruktur um Anthranilsäure handelt.

Die vorliegenden Substrukturen waren offensichtlich die Bausteine eines Pentapeptids, das mit Hilfe des Molekulargewichts und der Substrukturensuche im „Dictionary of Natural Products“ [Chapman and Hall, 2002] schnell identifiziert werden konnte. Es handelt sich um das cyclische Pentapeptid Cycloaspeptid A, das von Kobayashi *et al.* 1986 zum ersten Mal aus einem *Aspergillus*-Stamms isoliert worden war. Die Pilzkultur stammte seinerzeit von einer Bodenprobe aus dem westlichen Nepal [Kobayashi *et al.*, 1986].

## Ergebnisse

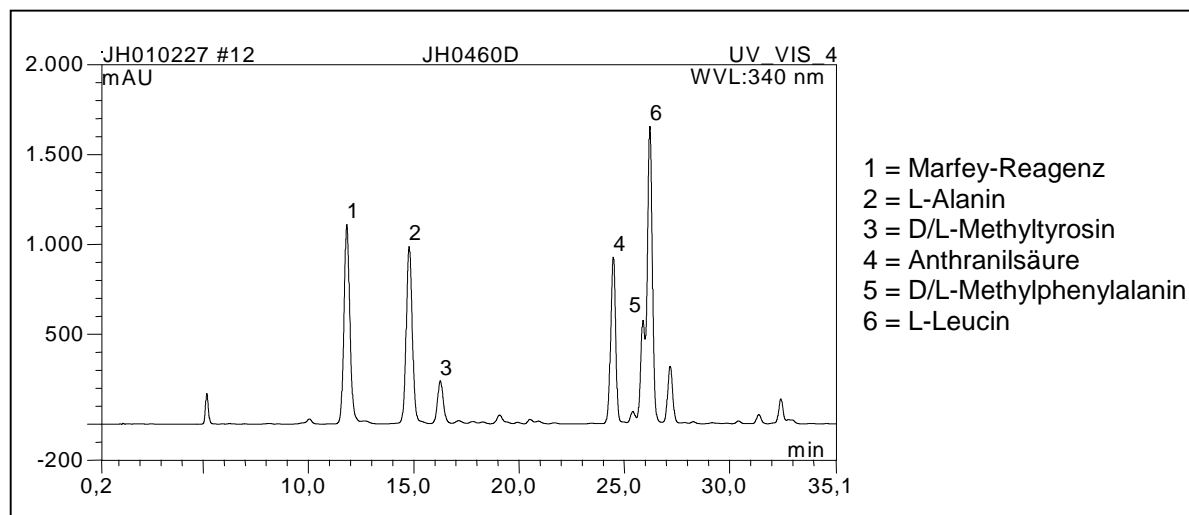


**Abb. E7:** TOCSY-Spektrum von Cycloaspeptid A

Mit Hilfe von HMBC- und nOe-Daten wurde die Verknüpfung der Aminosäuren untereinander im Vergleich mit den Literaturdaten überprüft. Ebenso wurden die Positionen der N-Methylgruppen (N-Me-Tyr, und N-Me-Phe) kontrolliert. Die Konstitution der aus E99-1/95 isolierten Verbindung war identisch mit der des Cycloaspeptids A.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Aminosäuren-Bausteine (L oder D) des Cycloaspeptids wurde nach der sauren Hydrolyse die Derivatisierung nach Marfey durchgeführt (vgl. **2.5.1.**). Mit dieser Methode konnten die absolute Konfiguration des Alanins und des Leucins ermittelt werden (**Abb. E8**). Beide Aminosäuren lagen in der L-Form vor. Die FDAA- und FDLA-Derivate des N-methylierten Phenylalanins und Tyrosins ließen sich per HPLC leider nicht trennen (eingesetzte Fließmittelgemische: MeOH und H<sub>2</sub>O / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2 bzw. ACN und H<sub>2</sub>O / Ammoniumacetat (0.1M) / TFA, pH 3-7). Durch die Bestimmung der optischen Drehung der Verbindung konnte schließlich nachgewiesen werden, daß auch die absolute Konfiguration der anderen Aminosäuren mit sehr großer Wahrscheinlichkeit identisch ist mit den Aminosäuren des Cycloaspeptid A ( $[\alpha]_D^{20}$ : exp. = - 234° (c = 1.01, CHCl<sub>3</sub>), Lit. = - 228° (c = 1.01, CHCl<sub>3</sub>), [Kobayashi *et al.*, 1986]).

## Ergebnisse



**Abb. E8:** HPLC-DAD-Chromatogramm des hydrolysierten und nach der Marfey-Methode derivatisierten Cycloaspeptids.

### 3.3.2.2. Inhaltsstoffe aus *Penicillium sp.* (E99/1-7)

Von E99/1-7 wurden zehn Liter Kulturvolumen angezogen. Die Methanol-Phase ergab eine Extraktmenge von 25 mg pro 300 ml Kulturvolumen. Das Chromatogramm der Screening-Kultur war relativ komplex mit sieben Hauptpeaks, von denen zwei Peaks zusammen mit vielen weiteren Verbindungen sich im Retentionsbereich zwischen 25 und 28 Minuten anhäuften (siehe Anhang). Die UV-Spektren der einzelnen Verbindungen deuteten auf eine hohe chemische Varianz der Einzelkomponenten hin.

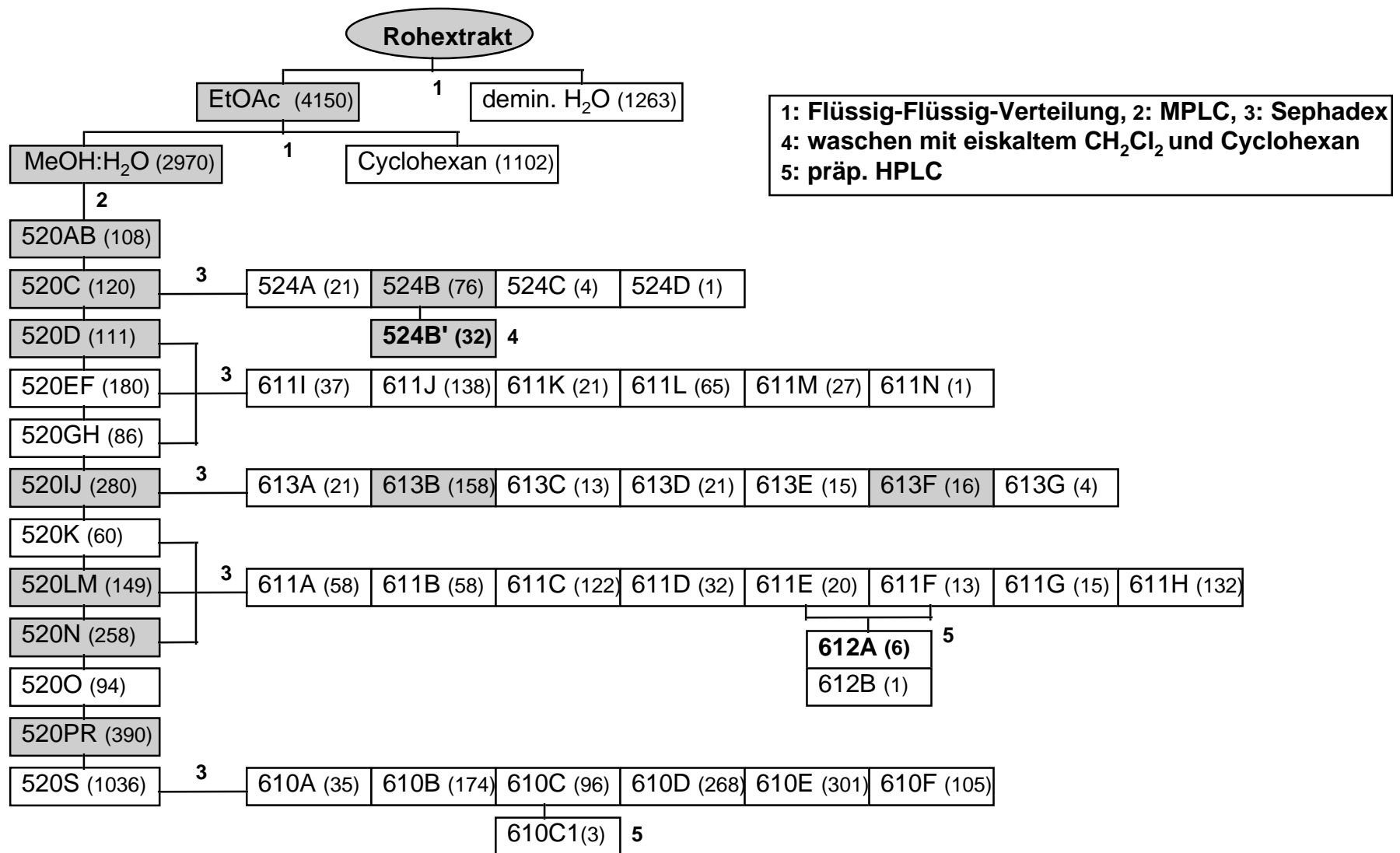
Im Fraßversuch mit *S. littoralis* zeigte der Extrakt von E99/1-7 mittlere Aktivität. Bei 1300 ppm lag die Überlebensrate bei 50%. Die relative Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle lag in dieser Konzentration bei 12%. Bei Halbierung der Konzentration überlebten alle Versuchstiere bei leicht vermindertem Wachstum im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im *brine shrimp assay* war der Extrakt nur schwach aktiv (Überlebensrate = 85% bei 100µg/ml) Dafür wiesen die Nauplien eine stark eingeschränkte Mobilität auf.

In den gemäß 2.1.3.2. durchgeführten Extraktionsexperimenten stellte sich heraus, daß die Hauptkomponente in den Chromatogrammen des Methanol-Extrakts des Mycels sowie des Ethylacetat-Extrakts und des Dichlormethan-Extrakts des Mediums



vertreten war. Im Methanol-Extrakt des Mycels sowie im Ethylacetat-Extrakt des Mediums waren zusätzlich einige NebenkompONENTEN zu finden. 88% der Gesamtextraktmenge waren im Methanol-Extrakt des Mycels zu finden. Der Reinheitsfaktor (siehe 3.3.2.1.) des Methanol-Extrakts des Mycels lag mit 0.29 um ca. den Faktor 30 niedriger als der des Ethylacetat-Extrakts des Mediums (10.37). Verwendet man diese Werte als Korrekturfaktoren für die Extrakte, so erhält man für den Methanol-Extrakt des Mycels  $399 \text{ mg} \times 0.29 = 115 \text{ mg}$  und für den Ethylacetat-Extrakt des Mediums  $34 \text{ mg} \times 10.37 = 352 \text{ mg}$ . Die relative Menge an UV-absorbierenden Bestandteilen, die in der Regel auch Träger der biologischen Aktivität sind, war also im Ethylacetat-Extrakt des Mediums mehr als doppelt so hoch. Auf Grund dieser Daten wurde von der 10-Liter-Kultur von E99/1-7 ein Ethylacetat-Extrakt des Mediums hergestellt. Beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Extrakte der Screening-Kultur und der Großanzucht per HPLC mußte leider festgestellt werden, daß in der Großkultur nur noch eine Hauptkomponente zu finden war. Die Verbindungen, die in der Screening-Kultur noch mit hohen Anteilen am Gesamtextrakt vertreten waren, waren im Extrakt der Großkultur nur noch in sehr niedrigen Konzentrationen nachzuweisen (siehe Anhang).

Nach dem in **Abb. E9** präsentierten bioassay-gestützten Isolierungsschema wurde aus E99/1-7 die Hauptverbindung (JH0524B') isoliert, die sich in Methanol sehr gut löste. Mit Cyclohexan und eiskaltem Dichlormethan konnte die Verbindung bis zur nahezu vollständigen Reinheit mehrmals gewaschen werden. In der Trockne bildete die Substanz gelb-rote bis rot-braune Kristallnadeln an den Gefäßwänden der Probengläser aus. Bei der isolierten Verbindung handelte es sich um das Polyketid Citrinin (Strukturdaten, Strukturaufklärung und biologische Aktivität: siehe unten). Aus den weiteren Fraktionen wurde lediglich eine der NebenkompONENTEN (JH0612A) isoliert. Alle weiteren biologisch aktiven Fraktionen bestanden entweder zu über 60% aus Citrinin (JH0520AB, JH0520PQR, JH0613B und JH0613F), oder die ohnehin schwache biologische Aktivität der MPLC-Fraktionen ging nach der Passage über die Sephadexsäule verloren (JH0520D und JH0520LMN).



**Abb. E9:** Trennschema für den Rohextrakt (JH0454D) der Kultur von *Penicillium* E99/1-7: in Klammern = Ausbeute in Milligramm, grau unterlegt = aktive Fraktionen im *brine shrimp* assay, fettgedruckt = Reinsubstanzen.

JH0520S wurde ebenfalls aufgetrennt, da eine der Hauptkomponenten dieser Fraktion sich scheinbar für eine nicht aufwendige Isolierung anbot. Leider konnte trotz umfangreicher Trennansätze per präparativer HPLC (u.a. unter Einsatz von TFA und Acetonitrilgradienten) die Substanz nicht in hinreichender Reinheit isoliert werden.

Die NMR-Daten sprachen dafür, daß ein Gemisch von Isomeren vorlag, die entweder nicht voneinander zu trennen waren bzw. leicht und schnell ineinander übergehen konnten. Auch nach Zugabe von deuterierter HCl waren die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren nicht zu interpretieren.

Als Nebenprodukt der Fraktionierung von JH0520K, L, M und N wurde das biologisch nicht aktive Phenyllessigsäureamid-Derivat JH0612A isoliert.

### **a) Citrinin**

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von JH0524B' waren acht Signale zu erkennen, von denen je drei auf Methylgruppen, zwei auf aliphatische Protonen, eines auf ein aromatisches Proton und zwei auf an Heteroatome gebundene Protonen hinwiesen. Zwei der Methylgruppen (1.11 und 1.25 ppm) erschienen als Dubletts und koppelten mit je einem der aliphatischen Protonen (3.19 und 4.97 ppm), die beide wiederum jeweils als breite Quartetts erschienen (Kopplungskonstanten jeweils um 7 Hz). Mit Hilfe zusätzlicher Informationen aus dem COSY-Spektrum konnten diese Signale als Teile eines gemeinsamen Spinsystems ( $\text{H}_3\text{-9}$ ,  $\text{H-4}$ ,  $\text{H-3}$ ,  $\text{H}_3\text{-10}$ ) identifiziert werden.

Die beiden breiten Signale zwischen 15 und 17 ppm lagen weit im tiefen Feld und sprachen für über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierte Hydroxyprotonen. Das aromatische Proton erschien als Singulett bei 8.59 ppm und zeigte im HMQC-Spektrum eine CH-direkt-Korrelation mit einem Kohlenstoffsignal bei 162 ppm.

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum fanden sich 13 Signale, von denen vier so weit ins tiefe Feld verschoben waren, daß es sich nur um die Signale von sauerstofftragenden  $\text{sp}^2$ -hybridisierten C-Atomen handeln konnte. Zusammen mit den zwei Hydroxygruppen mußten somit mindestens vier Sauerstoffatome im Molekül vorhanden sein.

Um die genaue Zahl der Sauerstoffatome und der anderen Heteroatome im Molekül zu ermitteln, wurde die Multiplizität der  $^{13}\text{C}$ -Signale mit Hilfe des HMQC-Spektrums

**Citrinin**

Systemat. Name : (3R,4S)-8-Hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-4,6-dihydro-3H-  
isochromen-7-carbonsäure

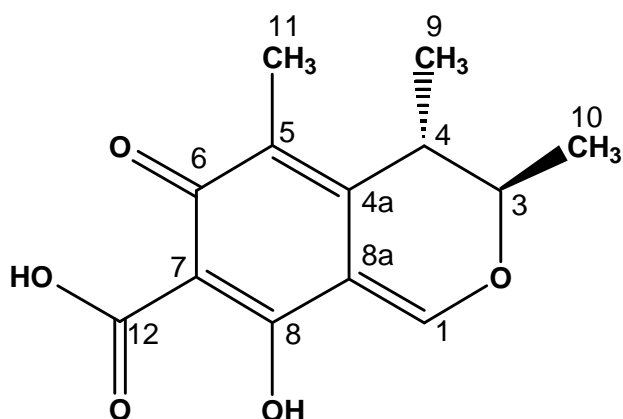
Beschreibung : rötli.-braune Nadeln

Probencode : JH0524B'      Substanzmenge : 32.4 mg

Summenformel : C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>      Molekulargewicht : 250 g/mol

Quellorganismus : *Penicillium* sp. aus *Ircinia fasciculata* (E99/1-7)

Wyllie *et al.*, 1946



Retentionszeit : 19.7 min.

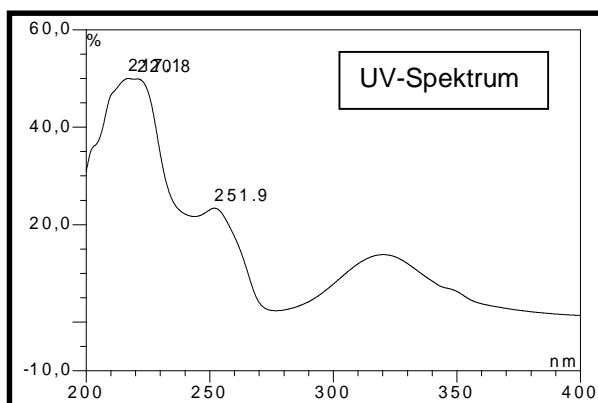
R<sub>f</sub>-Wert : 0.55

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : hellgelb

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : \_ braun



Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>18</sup> : exp. = - 38.2° (c = 0.125, Ethanol),

lit. = - 37.4° (Ethanol)

ESI-MS (m/z): 251.1 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 249.6 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)

EI-MS (m/z, rel. Int.): 250 [M]<sup>+</sup> (35), 232 (28), 232 (28), 232 (28), 190 (36), 177 (39),  
163 (61), 152 (33), 148 (31), 135 (22), 95 (26), 85 (44), 79 (100), 64 (78), 45 (27)

|  |
|--|
| <b>NMR-Daten von Citrinin in DMSO-d<sub>6</sub> bzw. *CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)</b> |
|--|

| Pos   | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm),<br>mult., (J in Hz) | <sup>1</sup> H δ* (ppm),<br>mult., (J in Hz) | COSY*<br>(H→H) | HMQC<br>(H→C) | HMBC<br>(H→C)          |
|-------|-------------------------|---|--|----------------|---------------|------------------------|
| 1     | 162.9 (d)               | 8.59 (1H, s)                                | 8.23 (1H, s)                                 |                | C-1           | C-3, -4a, -8, -8a      |
| 3     | 81.7 (d)                | 4.97 (1H, q, 6.0)                           | 4.76 (1H, q, 6.6)                            | 10-H           | C-3           | C-1, -4, -4a, -9, -10  |
| 4     | 34.5 (d)                | 3.19 (1H, q, 6.5)                           | 2.96 (1H, q, 7.3)                            | 9-H            | C-4           | C-4a, -5, -8a, -9, -10 |
| 4a    | 139.1 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 5     | 123.0 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 6     | 183.7 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 7     | 100.2 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 8     | 174.5 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 8a    | 107.3 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 9     | 18.4 (q)                | 1.11 (3H, d, 7.0, CH <sub>3</sub> )         | 1.21 (3H, d, 7.3, CH <sub>3</sub> )          | 4-H            | C-9           | C-3, -4, -4a           |
| 10    | 18.2 (q)                | 1.25 (3H, d, 6.5, CH <sub>3</sub> )         | 1.33 (3H, d, 6.6, CH <sub>3</sub> )          | 3-H            | C-10          | C-3, -4                |
| 11    | 9.4 (q)                 | 1.94 (3H, s, CH <sub>3</sub> )              | 2.00 (3H, s, CH <sub>3</sub> )               |                | C-11          | C-4a, -5, -6, -8a      |
| 12    | 176.4 (s)               |   |  |                |               |                        |
| 8-OH  |                         | 15.37 (1H, s, OH)                           | 15.11 (1H, s, OH)                            |                |               |                        |
| 12-OH |                         | 16.26 (1H, s, OH)                           | 15.89 (1H, s, OH)                            |                |               |                        |

ermittelt und mit den Informationen des <sup>1</sup>H-Spektrums (14 Protonen) und dem sich aus den EI- und ESI-Massenspektren ergebendem Molekulargewicht von M = 250 abgeglichen. Auf diese Art und Weise konnte die vermutete Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> der Verbindung berechnet werden (**Abb. E10**). Zudem konnte anhand der Massenspektren abgesichert werden, daß keine Halogene im Molekül enthalten waren.

Mit Hilfe der postulierten Summenformel und den formulierten Strukturelementen konnte über eine Substrukturen-Suche im „Dictionary of Natural Products“ [Chapman and Hall, 2002] die Verbindung eindeutig als das Polyketid Citrinin identifiziert

werden. Das Citrinin ist ein 1946 erstmals beschriebenes Polyketid, das von verschiedenen Pilzen gebildet werden kann, darunter *Penicillium citrinum* sowie verschiedene *Penicillium*-, *Aspergillus*-, *Candida*- und *Monascus*-Arten [Wyllie *et al.*, 1946 und Chapman and Hall, 2002].

| Multiplizität | Anzahl C  | Anzahl H  | Berechnung für M = 250 :                          |
|---------------|-----------|-----------|---|
| s             | 7         | 0         | $C_{13}H_{12} = 168$                              |
| d             | 3         | 3         | + 2 OH: $C_{13}H_{14} = 170$                      |
| t             | 0         | 0         | + 2 OH: $C_{13}H_{14}O_2 = 202$                   |
| q             | 3         | 9         | + 3 O: $C_{13}H_{14}O_5 = 250$                    |
| <b>Gesamt</b> | <b>13</b> | <b>12</b> | <b>Summenformel: <math>C_{13}H_{14}O_5</math></b> |

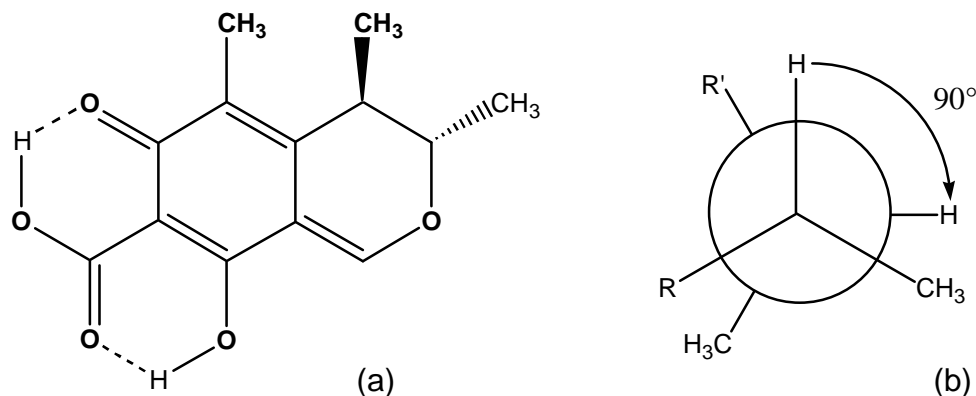
**Abb. E10:** Berechnungen zur Ermittlung der Summenformel der Reinsubstanz JH0524B'.

Die zunächst in DMSO- $d_6$  aufgezeichneten NMR-Daten wurden zum besseren Vergleich mit Literatur-Daten [Barber, *et al.*, 1987] ein weiteres Mal in deuteriertem Chloroform gemessen. Das auf diese Weise gemessene  $^1H$ -Spektrum entsprach exakt den Angaben in der oben genannten Veröffentlichung.

Die auch in deuteriertem Chloroform „sichtbaren“, sehr weit ins tiefe Feld verschobenen Hydroxyprotonen wurden über Wasserstoffbrückenbindungen zu den jeweils benachbarten Oxofunktionen coplanar in Pseudo-Sechsringen stabilisiert und tauchten daher als scharfe Singulets auf (**Abb. E11a**).

Die Übereinstimmung der relativen Konfiguration der isolierten Verbindung mit der des in der Literatur beschriebenen Citrinins wurde wie folgt nachgewiesen. Die *trans*-Stellung der Protonen in den Positionen 3 und 4 ergab sich dadurch, daß weder im  $^1H$ -Spektrum eine Aufspaltung der Signale in Folge einer wechselseitigen Kopplung zu erkennen war, noch daß im COSY ein Kreuzsignal für diese beiden Protonen auftrat. Laut 3D-Modell der Verbindung in der Strukturformel-Software Chem-3D beträgt der Winkel zwischen den beiden Protonen  $90^\circ$ , wenn diese in *trans*-Position zueinander stehen. Da für einen Winkel  $\Phi$  von  $80 - 100^\circ$  die Kopplungskonstante gemäß der Karplus-Gleichung nahezu Null ist, kann (3R,4S)-Citrinin keine Kopplung beobachtet werden (**Abb. E11b**).

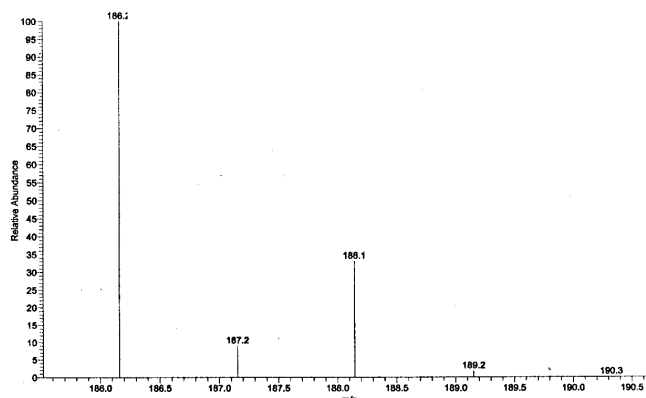
Zur Absicherung der absoluten Konfiguration des isolierten Citrinins wurde der Drehwert bestimmt. Die experimentell ermittelte optische Drehung  $[\alpha]_D^{18} - 38.2^\circ$  stimmte mit der in der Literatur angegebenen optischen Drehung  $[\alpha]_D^{18} - 37.4^\circ$  überein.



**Abb. E11:** Wasserstoffbrückenbindungen im Citrinin (a). Newman-Projektion der Positionen 3 und 4 des Citrinins zur Darstellung des Winkels zwischen 3-H und 4-H (b).

### **b) meta-Chloro-para-hydroxy-phenyl-essigsäureamid**

Bereits die Massenspektren von JH0612A gaben einen ersten Aufschluß über strukturelle Bausteine der Verbindung. Das Moleküllion dieser Reinsubstanz zeigte ein Isotopencluster, wie es für monochlorierte Verbindungen typisch ist (**Abb. E12**). Die relative Intensität des Signals für das Molekül mit dem <sup>37</sup>Cl-Isotop im Bezug auf die Intensität des Moleküls mit dem <sup>35</sup>Cl-Isotop lag gemäß den natürlichen Vorkommen der Chlorisotope bei 30%. Die ungerade Molekülmasse von 185 amu war ein Indiz für die Anwesenheit eines oder einer ungeraden Anzahl Stickstoffatome im Molekül.

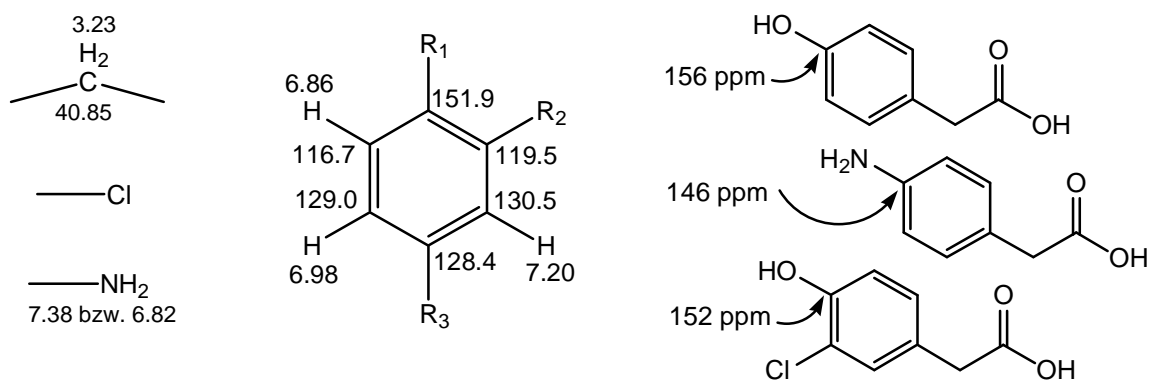


**Abb. E12:** Moleküllion-Cluster der chlorierten Verbindung JH0612A (LC-MS, ESI-positiv): 186.2  $\rightarrow$  C<sub>8</sub>H<sub>8</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>, 187.1  $\rightarrow$  <sup>13</sup>C<sub>8</sub>H<sub>8</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>, 188.2  $\rightarrow$  C<sub>8</sub>H<sub>8</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup> etc.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung erschien unter anderem ein Singulett bei 3.23 ppm, das laut Integration zwei Protonen repräsentierte. Die chemische Verschiebung sprach für das Vorliegen einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe in direkter Nachbarschaft zu einem elektronegativen Substituenten. Laut den Daten aus dem HMQC-Spektrum lag bei 40.9 ppm das Triplett des Kohlenstoffatoms dieser  $\text{CH}_2$ -Gruppe.

Bei 6.82, 7.38 und 10.01 ppm fanden sich drei breite Singulett von heteroatomgebundenen Protonen (bestätigt durch fehlende CH-direkt-Korrelationen im HMQC). Die Signale 6.82 und 7.38 wiesen Kreuzsignale im COSY auf und waren somit entweder den Protonen einer Amino- oder einer Amidgruppe zuzuordnen. Die Aufspaltung in zwei Signale sprach für das Vorliegen einer Amidgruppe.

Im aromatischen Bereich lagen die Signale eines *ortho*-koppelnden Protons (6.86 ppm, 8.2 Hz), eines *meta*-koppelnden Protons (7.20 ppm, 1.9 Hz) und eines Dubletts vom Dublett (6.98 ppm, 1.9 und 8.2 Hz). Dieses Kopplungsmuster ist charakteristisch für eine 1,2,4-trisubstituierte aromatische Verbindung. Aus den bisherigen Informationen konnten bereits erste Substrukturen und Strukturelemente der Verbindungen formuliert werden (**Abb. E13**).



**Abb. E13:** Strukturelemente von JH0612A aus den Informationen der Massenspektren sowie des Protonen- und COSY-Spektrums (links). Referenzverbindungen mit  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (in  $\text{DMSO-d}_6$  aus "Sigma Aldrich Library of  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR" (rechts).

Zusätzlich konnten folgende Informationen aus dem  $^{13}\text{C}$ - und dem HMQC-Spektrum gezogen werden. Insgesamt sechs Signale fanden sich im aromatischen Bereich. Wie erwartet, handelte es sich hierbei um die Signale von drei Singulett und drei Dubletts. Eines der Signale war mit 151.9 ppm sehr weit ins tiefe Feld verschoben. Das zu diesem Signal gehörige Kohlenstoffatom mußte folglich mit einer stark entschirmenden Gruppe substituiert sein.



**meta-Chloro-para-hydroxy-phenyl-essigsäureamid**

Systemat. Name : 2-(3-Chloro-4-hydroxy-phenyl)-acetamid

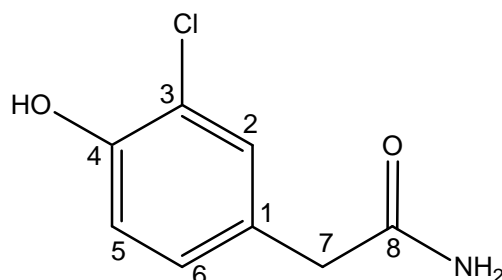
Beschreibung : weißes Pulver

Probencode : JH0612A

Substanzmenge : 6.0 mg

Summenformel : C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>2</sub>

Molekulargewicht : 185 g/mol

Quellorganismus : *Penicillium* sp. aus *Ircinia fasciculata* (E99/1-7)

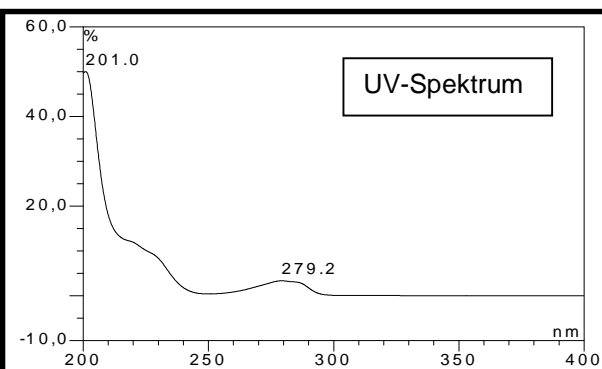
neuer Naturstoff !

Retentionszeit : 8.6 min.

R<sub>f</sub>-Wert : 0.34

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : -

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -

UV-Spektrum

ESI-MS (*m/z*): 186.2 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 184.5 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)EI-MS (*m/z*, rel. Int.): 187 (12), 185 [M]<sup>+</sup> (35), 143 (33), 142 (21), 141 (100), 107 (23),  
77 (28), 51 (19), 44 (14)Hochauflösende EI-MS: für *m/z* = 185: experimentell = 185.0241 amu,berechnet = 185.0244 amu (für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>2</sub>)

Noch tiefer lag das Signal eines sauerstoffgebundenen sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoffs bei 172.6 ppm. Um die Anordnung der Substituenten zu ermitteln, war die eingehende Analyse der *long-range*-Korrelationen im HMBC-Spektrum erforderlich. Das Kohlenstoffatom der CH<sub>2</sub>-Gruppe korrelierte mit den *meta*-koppelnden aromatischen Protonen, sowie umgekehrt die Kohlenstoffatome in den Positionen der *meta*-koppelnden Protonen mit den Wasserstoffatomen der CH<sub>2</sub>-Gruppe. Der aliphatische Rest befand sich somit zwischen den beiden *meta*-koppelnden Protonen. Des weiteren korrelierten die Methylenprotonen mit einem

## Ergebnisse

quartären Kohlenstoff bei 128.4 ppm, über den der aliphatische Rest mit dem Aromaten verknüpft ist und mit dem sauerstoffgebundenen sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoff bei 172.6 ppm. Dieses C-Atom konnte damit nur noch Teil einer Keto- oder Carbonylgruppe des aliphatischen Rests sein.

| <b>NMR-Daten von <i>meta</i>-Chloro-<i>para</i>-hydroxy-phenyllessigsäureamid<br/>in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)</b> |                                       |  |                   |               |                    |
|---|---------------------------------------|--|-------------------|---------------|--------------------|
| Pos.  | <sup>13</sup> C <sub>q</sub><br>(ppm) | <sup>1</sup> H <sub>q</sub> * (ppm),<br>mult., (J in Hz) | COSY*<br>(H→H)    | HMQC<br>(H→C) | HMBC<br>(H→C)      |
| 1   | 128.4 (s)                             |  |                   |               |                    |
| 2   | 130.5 (d)                             | 7.20 (1H, d, 1.89)                                       | 5-H, 6-H, 7-H     | C-2           | C-3, C-4, C-6, C-7 |
| 3   | 119.5 (s)                             |  |                   |               |                    |
| 4   | 151.9 (s)                             |  |                   |               |                    |
| 5   | 116.7 (d)                             | 6.86 (1H, d, 8.20)                                       | 2-H, 6-H, 7-H     | C-5           | C-1, C-3, C-4      |
| 6   | 129.0 (d)                             | 6.98 (1H, dd,<br>1.89, 8.20)                             | 2-H, 5-H, 7-H     | C-6           | C-4, C-7           |
| 7   | 40.9 (t)                              | 3.23 (2H, s, CH <sub>2</sub> )                           | 2-H, 6-H          | C-7           | C-1, C-2, C-6, C-8 |
| 8   | 172.6 (s)                             |  |                   |               |                    |
| 4-OH  |                                       | 10.01 (1H, s, OH)  |                   |               |                    |
| 8-NH <sub>2</sub>   |                                       | 6.82 (1H, bs, NH <sub>A</sub> )                          | 8-NH <sub>B</sub> |               |                    |
|   |                                       | 7.38 (1H, bs, NH <sub>B</sub> )                          | 8-NH <sub>A</sub> |               |                    |

Die Frage war nun, ob eine Carboxylgruppe oder eine Carboxamidfunktion vorlag. Die jeweilige chemische Verschiebung des Carbonyls wäre kein signifikantes Unterscheidungsmerkmal gewesen. Hilfreich waren in dieser Situation die chemische Verschiebung der beiden verbliebenen aromatischen Kohlenstoffatome. Das Signal bei 119.5 ppm entsprach einem mit Chlor substituierten aromatischen C-Atom. Das Signal bei 151.9 ppm war charakteristisch für ein durch eine Hydroxygruppe entschirmtes aromatisches Kohlenstoffatom. Würde man die Hydroxygruppe gegen die ebenfalls noch nicht zugeordnete Aminogruppe austauschen, würde das Signal des C-Atoms in dieser Position weiter im hohen Feld liegen (**Abb. E13**).

Um die genaue Position des Chlors und der Hydroxygruppe zu bestimmen, wurden Argumente aus den HMBC-Spektren herangezogen. Während das <sup>13</sup>C-Signal der phenolischen Hydroxygruppe mit allen Protonen korrelierte, gab es von dem Signal

des mit Chlor substituierten Kohlenstoffs nur Kreuzsignale mit den  $^1\text{H}$ -Signalen bei 6.98 und 7.20 ppm. Daraus konnte gefolgert werden, daß der Phenylring in Position 3 chloriert und in Position 4 hydroxyliert war.

Damit war die Struktur von JH0612A aufgeklärt: es handelt sich um *meta*-Chloro-*para*-hydroxy-phenylelessigsäureamid mit einer Summenformel von  $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClNO}_2$ . Die Summenformel konnte durch die Ergebnisse der hochauflösenden EI-Massenspektrometrie bestätigt werden ( $m/z = 185$ : experimentell = 185.0241 amu, berechnet = 185.0244 amu).

### 3.3.2.3. Inhaltsstoffe aus *Aspergillus niger* van Tieghem (E99/3-341)

Im biologischen Screening war der Extrakt von E99/3-341 aufgefallen durch seine starke Aktivität im Fraßversuch mit *S. littoralis*. Bei einer Konzentration von 1300 ppm überlebte keines der Versuchstiere. Bei 650 ppm lag die Überlebensrate bei 50%. Die relative Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle betrug bei dieser Konzentration 9%. Darüber hinaus wirkte der Extrakt mittelstark im *brine shrimp assay* (Überlebensrate = 45% bei 100  $\mu\text{g/ml}$ ) und schwach antibiotisch gegen *B. subtilis* im Agarplattendiffusionstest (9 mm Hemmhofdurchmesser bei 250  $\mu\text{g/disc}$ ).

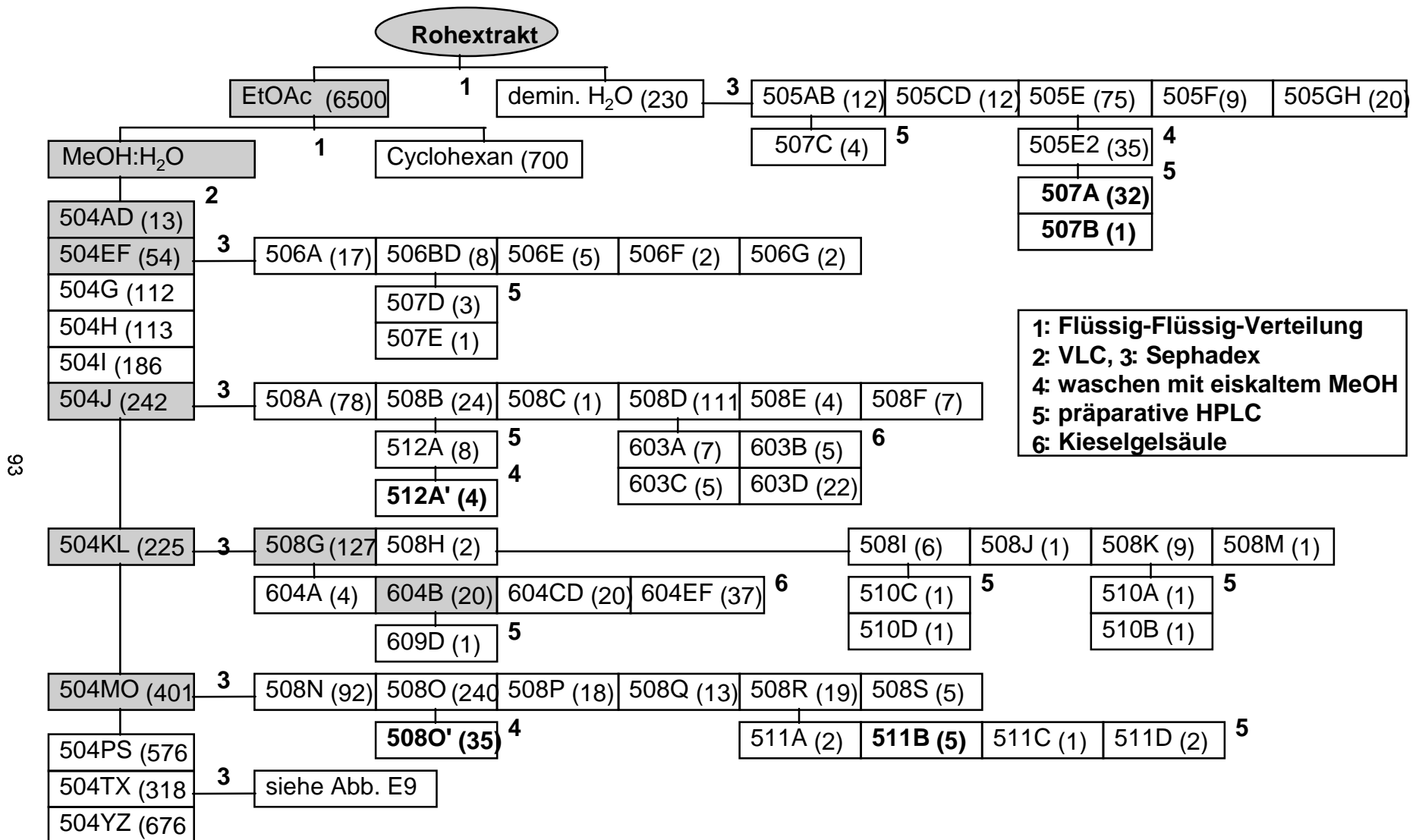
Das Chromatogramm von E99/3-341 war sehr komplex und bestand unter anderem aus jeweils sechs Haupt- und NebenkompONENTEN. Drei der kleineren Peaks bildeten zusammen mit einigen weiteren Peaks im Retentionsbereich zwischen 23 und 26 Minuten einen Signalberg. Darüber hinaus fanden sich zwischen den großen und mittleren Peaks eine Reihe von kleineren Peaks (siehe Anhang). Die UV-Spektren der einzelnen Verbindungen deuteten auf eine hohe chemische Varianz der Einzelkomponenten hin. Das Kulturvolumen wurde aufgrund der sehr hohen Komplexität des Extrakts (bei einer Extraktmenge Methanol-Phase von 94 mg pro 300 ml Kulturvolumen) auf zehn Liter festgelegt. Die Extrakte der Screening-Kultur und der Großanzucht zeigten in der HPLC qualitativ sehr ähnliche Muster. Einzig und allein Konzentrationsunterschiede waren feststellbar.

Die Chromatogramme des Methanol-Extrakts des Mycels sowie des Ethylacetat-Extrakts des Mediums waren laut der Extraktionsexperimente (siehe 2.1.3.2.) qualitativ fast identisch. Die jeweiligen Dichlormethan-Extrakte wiesen darüber hinaus keine zusätzlichen Signale auf. Aufgrund der sehr hohen Komplexität der chemischen Zusammensetzung der Extrakte wurden im Falle von E99/3-341 Mycel und Medium der Großanzucht nicht getrennt aufgearbeitet, sondern in einem Ansatz mit Ethylacetat extrahiert, um eine möglichst hohe Ausbeute an Extrakt zu erzielen. Der Extrakt wurde zunächst zwischen verschiedenen Phasen ausgeschüttelt und anschließend wurde die Wasserphase mit einer Sephadex-Säule weiter aufgetrennt, während mit der Methanolphase eine VLC-Trennung durchgeführt wurde.

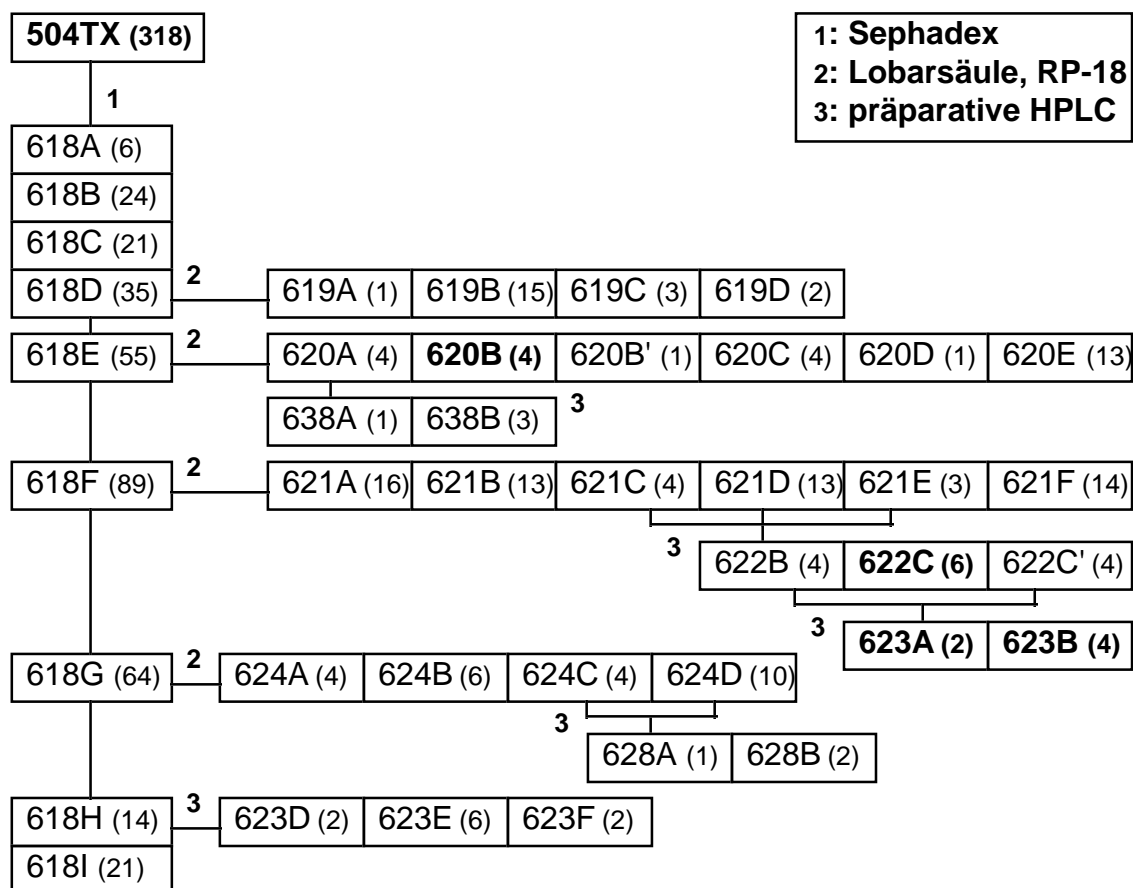
Obwohl die Wasserphase keine biologische Aktivität im *brine shrimp* assay trug, wurde sie aufgearbeitet, da einer der Hauptpeaks aus dem Chromatogramm des Rohextrakts fast 100 % der UV-absorbierenden Verbindungen dieser Phase ausmachte. Aus dem Niederschlag der Sephadex-Fraktion JH0505E in eiskaltem Methanol wurden per präparativer HPLC (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) mit JH0507A und B zwei Pyranopyrrole isoliert, die sich später als neue Naturstoffe herausstellten.

Zwei weitere, ebenfalls neue Pyranopyrrole (JH0623A und B) konnten aus VLC-Fractionen der Methanolphase isoliert werden. Auch hier wurde beim letzten Isolierungsschritt die präparative HPLC (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) eingesetzt. Bei JH0512A' handelt es sich um dasselbe Pyranopyrrol wie bei JH0623B. Auf der Suche nach weiteren Fraktionen mit Pyranopyrrolen wurden als Nebenprodukte zwei Benzylpyridin-Derivate isoliert. Während JH0620B bereits rein von einer RP-Lobarsäule kam war JH0622C das Produkt einer Trennung in der präparativen HPLC (ohne Zusatz von Säure).

Auf der Suche nach dem wirksamen Prinzip des Extrakts ging in vier Fällen bei der Auftrennung der VLC-Fractionen mit Sephadexsäulen die Aktivität im *brine shrimp* assay verloren. Nur die Aktivität der VLC-Fraktion JH0504KL war in der aus ihr hervorgehenden Sephadex-Fraktion JH0508G noch nachweisbar. Nach der Passage dieser Fraktion über eine Kieselgelsäule konnte die Aktivität in JH0604B wiedergefunden werden. Im Zuge der anschließenden präparativen HPLC ging neben großer Menge an Substanz leider auch die biologische Aktivität verloren.



**Abb. E14:** Trennschema für den Rohextrakt (JH0454T) der Kultur von *Aspergillus niger* E99/3-341: in Klammern = Ausbeute in Milligramm, grau unterlegt = aktive Fraktionen im *brine shrimp* assay, fettgedruckt = Reinsubstanzen. (Fortsetzung **Abb. E15**).



**Abb. E15:** Trennschema für den Rohextrakt (JH0454T) der Kultur von *Aspergillus niger* E99/3-341 (Fortsetzung von **Abb. E14**): in Klammern = Ausbeute in Milligramm, grau unterlegt = aktive Fraktionen im *brine shrimp* assay, fettgedruckt = Reinsubstanzen.

Möglicherweise ist dies durch den Wechsel von der analytischen Anlage (Gradientenoptimierung) auf die präparative Anlage zu begründen (unterschiedliche Konzentration der Probe, Lösungsmittelgemisch, in dem die Probe aufgenommen wird und Fließmittel: TFA statt Phosphorsäure). Unter diesen Umständen kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Verbindung zersetzt hat oder daß sie polymerisiert und auf der Vorsäule ausgefallen ist.

Aus den Sephadex-Fractionen der VLC-Fraktion JH0504MO gingen zwei weitere Verbindungen hervor. JH0508O' war der weiße amorphe Niederschlag der in Methanol angelösten Fraktion JH0508O. Nach mehrmaligem Waschen mit eiskaltem Methanol wurde diese Verbindung als ein bisher nicht bekanntes Biscumarin-Derivat identifiziert. JH0511B ging nach präparativer HPLC aus JH0508R hervor (H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA). Bei dieser Verbindung handelte es sich um das bereits bekannte Pilzpigment Cycloleucomelon.

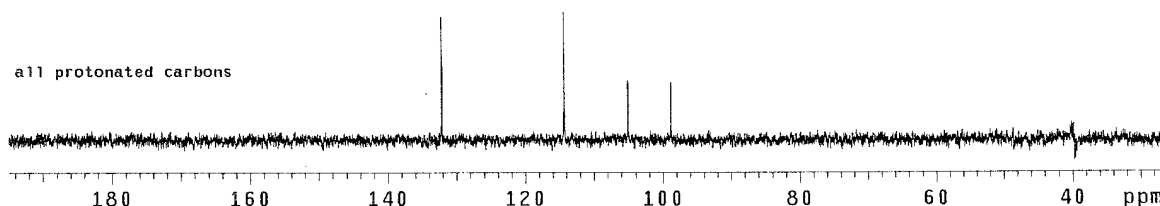
**a) Cycloleucomelon**

JH0511B wurde als braunes, pigmentartiges Pulver isoliert, das in saurer Lösung (z.B. bei der Isolierung mit der semipräparativen HPLC unter Verwendung von TFA) braun, in neutraler bis schwach alkalischer Lösung dunkelgrün gefärbt ist.

Im EI-Massenspektrum erschien das Molekülion der Verbindung als starkes Signal bei 338 amu.

Mit vier Signalen im aromatischen Bereich (zwei Dubletts, zwei Singulets) und vier Signalen für heteroatomgebundene Protonen (drei scharfe und ein breites Singulett) war das  $^1\text{H}$ -Spektrum relativ übersichtlich. Zwei der Signale im aromatischen Bereich erschienen als Dubletts *ortho*-koppelnder Protonen (6.76 und 7.16 ppm). Beide Signale repräsentierten laut ihren Integralen jeweils zwei Protonen und standen damit für ein AA'BB'-System eines *para*-disubstituierten Phenylrings.

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum fanden sich insgesamt 16 Signale. Die beiden Signale der C-Atome des AA'BB'-Systems (C-3'/-5' bei 114.4 und C-2'/-6' bei 132.2 ppm) wurden mit Hilfe des DEPT-Spektrums identifiziert, ebenso wie die zwei weiteren tertiären Kohlenstoffatome bei 98.8 und 105.1 ppm (**Abb. E16**). Vier der zwölf Singulets lagen im aromatischen Bereich zwischen 100 und 140 ppm, sechs lagen im Bereich für heteroatomgebundene,  $\text{sp}^2$ -hybridisierte Kohlenstoffatome und zwei lagen mit 176.5 und 179.5 ppm im Bereich der chemischen Verschiebung für Carbonyl-Kohlenstoffatome.

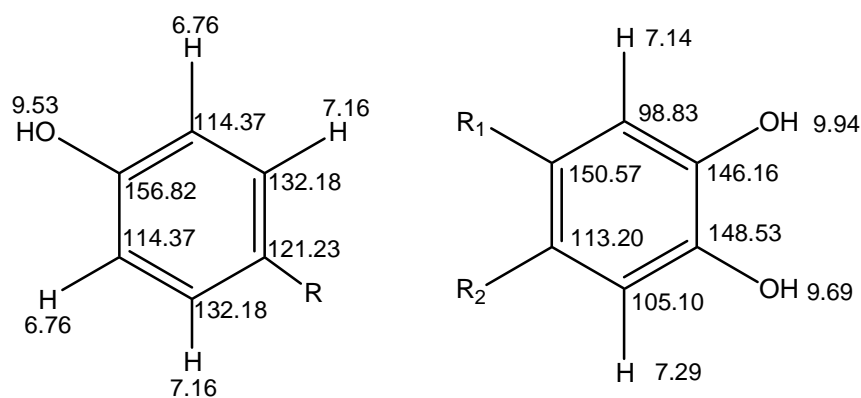


**Abb. E16:** DEPT-Spektrum von Cycloleucomelon (JH0511B) in  $\text{DMSO-d}_6$ .

Durch Zusammenzählen aller Signale in den eindimensionalen Spektren ergab sich eine vorläufige Summenformel von  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}$  und damit ein Molekulargewicht von  $M = 226$ . Die Differenz zur in der Massenspektrometrie ermittelten Molekülmasse von  $M = 338$  betrug 112 amu. Das hätte acht Stickstoff- bzw. sieben Sauerstoffatomen entsprochen. Kombinationen von Stickstoff und Sauerstoff ergaben mit Rücksicht auf

die bereits angestellten Strukturüberlegungen rechnerisch keinen Sinn. Da zwei sauerstoffgebundene Kohlenstoffatome das Vorhandensein von Sauerstoff anzeigen, ergab sich für die untersuchte Verbindung eine Summenformel von  $C_{18}H_{10}O_7$ .

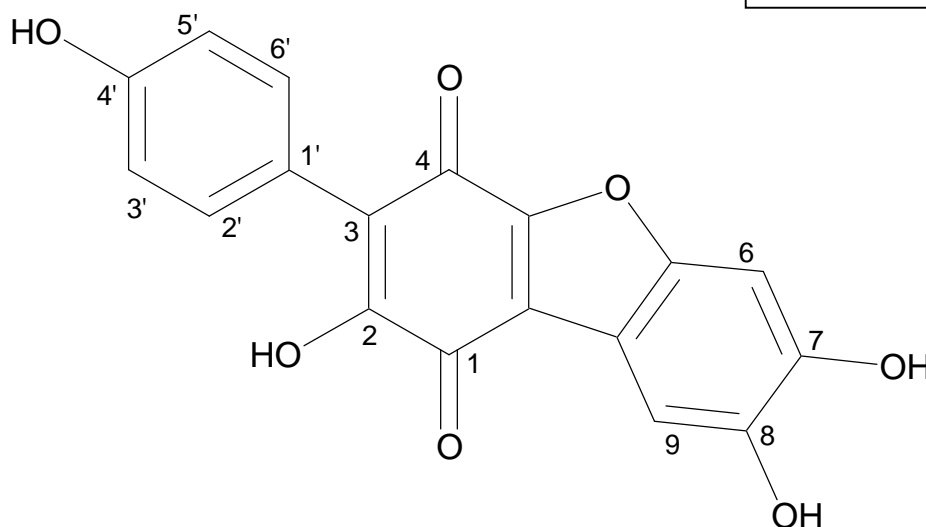
Aus den obigen Informationen und unter Zuhilfenahme der *CH-long-range*-Korrelationen konnten im folgenden zwei Substrukturen formuliert werden. Eines der heteroatomgebundenen Protonen (9.53 ppm) wies eine Korrelation zu einem Kohlenstoffsignal bei 156.8 ppm auf. Die chemische Verschiebung deutete auf ein phenolisches C-Atom hin. Daneben war eine Korrelation zu den Signalen von C-3' und C-5' des AA'BB'-Systems zu beobachten. Damit lag ein *para*-Hydroxy-Phenylring vor, zu dem zusätzlich noch das Signal von C-1' bei 121.2 ppm gehörte, wie eine *long-range*-Korrelation zu den Protonen 3'-H und 5'-H bei 6.76 ppm belegte. Die Verknüpfung von C-1' mit einem um 118.0 ppm verschobenen C-Atom konnte aufgrund von *long-range*-Korrelationen dieses C-Atoms zu den Protonen 2'-H und 6'-H bei 7.16 ppm nachgewiesen werden. Die auf diese Weise ermittelte Substruktur ist in **Abb. E17** wiedergegeben.



**Abb. E17:** Formulierten Substrukturen und Strukturelemente von JH0511B aus den Informationen der Summe der NMR-Spektren.

Eine zweite Substruktur ließ sich daraus ableiten, daß für das aromatische Proton bei 7.14 ppm insgesamt fünf *CH*-Korrelationen auszumachen waren. Neben einer Direkt-Korrelation zu dem  $^{13}C$ -Signal bei 98.8 ppm und einer *long-range*-Korrelation zu einem Signal bei 113.2 ppm traten drei weitere Kreuzsignale zu den C-Atomen bei



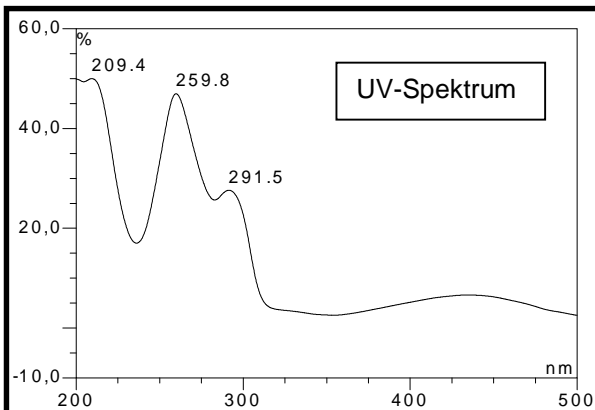
**Cycloleucomelon**Systemat. Name : 2,7,8-Trihydroxy-3-(4-hydroxy-phenyl)-dibenzofuran-1,4-dionBeschreibung : braunes PulverProbencode : JH0511BSubstanzmenge : 5.2 mgSummenformel : C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>Molekulargewicht : 338 g/molQuellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)Jägers *et al.*, 1987

Retentionszeit : 21.1 min.

R<sub>f</sub>-Wert : 0.06

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : -

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : grau+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : braunESI-MS (*m/z*): 337.6 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)EI-MS (*m/z*, rel. Int.): 338 [M]<sup>+</sup> (100), 309 (22), 282 (10), 253 (13), 238 (11), 152 (10), 121 (18), 106 (12), 69 (15), 44 (15)

|   |
|---|
| <b>NMR-Daten von Cycloleucomelon in DMSO-d<sub>6</sub> bzw. *Aceton-d<sub>6</sub> (500 MHz)</b> |
|---|

| Pos.  | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>13</sup> C δ* (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm),<br>mult.,<br>(J in Hz) | <sup>1</sup> H δ* (ppm) | NOESY<br>(H→H) | HMQC<br>(H→C) | HMBC<br>(H→C)        |
|-------|-------------------------|--------------------------|--|-------------------------|----------------|---------------|----------------------|
| 1     | 179.5 (s)               | 180.2                    |  |                         |                |               |                      |
| 2     | 151.5 (s)               | 153.2                    |  |                         |                |               |                      |
| 3     | 118.0 (s)               | 118.9                    |  |                         |                |               |                      |
| 4     | 176.5 (s)               | 177.5                    |  |                         |                |               |                      |
| 4a    | 153.7 (s)               | 153.2                    |  |                         |                |               |                      |
| 5a    | 150.6 (s)               | 152.2                    |  |                         |                |               |                      |
| 6     | 98.8 (d)                | 99.4                     | 7.14 (1H, s)                                   | 7.20                    | 7-OH           | C-6           | C-5a, -7,<br>-8, -9a |
| 7     | 146.2 (s)               | 146.5                    |  |                         |                |               |                      |
| 8     | 148.5 (s)               | 149.0                    |  |                         |                |               |                      |
| 9     | 105.1 (d)               | 106.2                    | 7.29 (1H, s)                                   | 7.43                    | 8-OH           | C-9           | C-5a, -7,<br>-8, -9b |
| 9a    | 113.2 (s)               | 114.8                    |  |                         |                |               |                      |
| 9b    | 118.5 (s)               | 119.7                    |  |                         |                |               |                      |
| 1'    | 121.2 (s)               | 122.3                    |  |                         |                |               |                      |
| 2'/6' | 132.2 (2d)              | 133.3                    | 7.16 (2H, „d“,<br>8.5)                         | 7.33                    |                | C-2'/6'       | C-3, -4'             |
| 3'/5' | 114.4 (2d)              | 115.2                    | 6.76 (2H, „d“,<br>8.5)                         | 6.88                    | 4'-OH          | C-3'/5'       | C-1', -4'            |
| 4'    | 156.8 (s)               | 158.0                    |  |                         |                |               |                      |
| 2-OH  |                         |                          | 10.75 (1H, bs,<br>OH)                          |                         |                |               |                      |
| 7-OH  |                         |                          | 9.94 (1H, s,<br>OH)                            |                         | 6-H, 8-OH      |               |                      |
| 8-OH  |                         |                          | 9.69 (1H, s,<br>OH)                            |                         | 7-OH, 9-H      |               | C-8                  |
| 4'-OH |                         |                          | 9.53 (1H, s,<br>OH)                            |                         | 3'/5'-H        |               | C-3'/5',<br>-4'      |

146.2, 148.5 und 150.6 ppm auf, deren chemische Verschiebung auf eine Verknüpfung mit Sauerstoff hinwies. Diese drei C-Atome korrelierten zusätzlich mit dem aromatischen Proton bei 7.29 ppm, welches seinerseits eine CH-direkt-Korrelation mit einem <sup>13</sup>C-Signal bei 105.1 ppm aufwies.

Somit mußten die beiden aromatischen Protonen in *para*-Position zueinander an einem dreifach sauerstoffsubstituierten Phenylring angeordnet sein (**Abb. E17**).

Mit Hilfe der beiden erarbeiteten Substrukturen, dem Molekulargewicht und der Summenformel konnte über die Substruktursuche im „Dictionary of Natural Products“ [Chapman and Hall, 2002] JH0511B als das bereits bekannte Pilzpigment Cyclouleucomelon identifiziert werden. Dieses Terphenylchinon wurde bisher aus den Basidiomyceten *Boletopsis leucomelaena*, *Paxillus atrotomentosus*, *Anthracophyllum* sp. und *Thelephora ganbajun* isoliert [Jägers *et al.*, 1987, Besl *et al.*, 1989 und Hu *et al.*, 2001]. Zum besseren Vergleich der experimentellen Daten mit den Angaben in der Literatur wurde die Verbindung zusätzlich in deuteriertem Aceton gemessen. Sowohl die  $^1\text{H}$ - als auch die  $^{13}\text{C}$ -Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

### **b) Biscumarin-Derivat**

Bei den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren von JH0508O' fiel auf, daß alle Signale paarweise vorlagen. Zwei Methylgruppen (2.58 und 2.62 ppm), zwei Methoxygruppen (3.76 und 3.84 ppm), zwei mal zwei *meta*-koppelnde aromatische Protonen (6.57/6.61 und 6.79/6.87 ppm) und zwei heteroatomgebundene Protonen (10.49 und 11.26 ppm) im  $^1\text{H}$ -Spektrum und die entsprechenden Signale im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (23.1 und 23.3, 55.8 und 59.2 ppm, 100.3/116.1 und 98.6/115.4 ppm) deuteten darauf hin, daß die Verbindung eine dimere, allerdings unsymmetrische Struktur aufweist.

Neben den bereits aufgezählten Quartetts und Dubletts waren im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum 14 Singulett paarweise verteilt, davon sechs im aromatischen Bereich zwischen 90 und 140 ppm und acht im Bereich sauerstoffgebundener  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoffatome (150 - 170 ppm). Da die Elementaranalyse der Verbindung ergab, daß kein Stickstoff enthalten war, wurde gemäß der Signale der 1D-NMR-Spektren eine Summenformel von  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_8$  angenommen.

Für die Formulierung von Substrukturen wurde jeweils mit den beiden Paaren *meta*-koppelnder Protonen begonnen. Die übrigen Substituenten der beiden aromatischen Systeme wurden mit Hilfe der HMQC- und HMBC-Spektren ermittelt. So korrelierten die beiden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Dubletts des einen Systems bei 100.3 ppm (C-8) und bei 116.1 ppm (C-6) beide mit dem Signal bei 10.50 ppm (7-OH), welches seinerseits ein Kreuzsignal bei 160.5 ppm (C-7) aufwies. Daraus ergab sich, daß sich zwischen den beiden *meta*-koppelnden Protonen eine phenolische Hydroxygruppe befinden mußte.

**Biscumarin-Derivat**

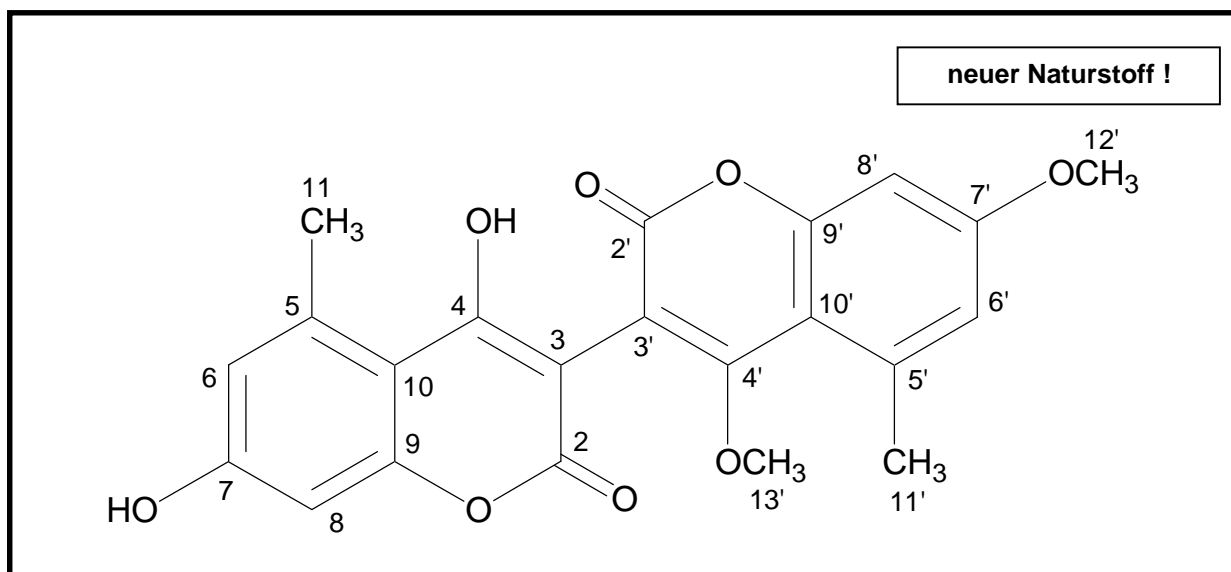
Systemat. Name : 4,7-Dihydroxy-4',7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-[3,3']bichromenyl-2,2'-dion

Beschreibung : weißes Pulver

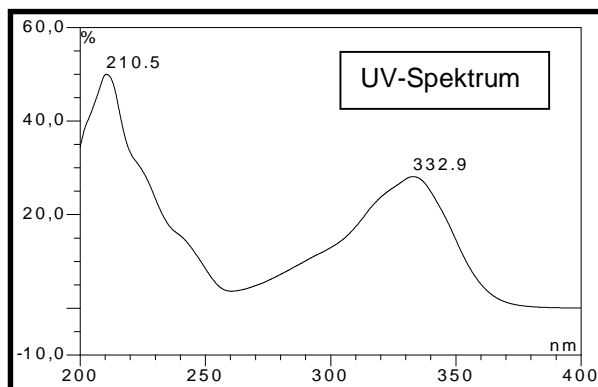
Probencode : JH05080'      Substanzmenge : 35.0 mg

Summenformel : C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>      Molekulargewicht : 410 g/mol

Quellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)



Retentionszeit : 23.0 min.  
 R<sub>f</sub>-Wert : 0.28  
 Fluoreszenzlösch. (254nm) : +  
 Eigenfluoreszenz (366nm) : hell-orange  
 + Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -  
 + Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -



Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  : 0° (c = 0.7 und 1.4, DMSO)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>),  $\nu_{\max}$ : 3079, 2258, 1686, 1611, 1590, 1353, 1335, 1281, 1225

ESI-MS (m/z): 411.1 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), MS/MS 411@35: m/z 261.2,  
 409.3 [M-H]<sup>-</sup> (negativ), MS/MS 409@35: m/z 377.3

EI-MS (m/z, rel. Int.): 392 [M-OH]<sup>+</sup> (10), 378 [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 375 (28), 363 (21),  
 335 (16), 306 (10), 185 (12)

Hochauflösende ESI-MS: für m/z = 411[M+H]<sup>+</sup>: experimentell = 411.1044 amu,  
 berechnet = 411.1080 amu (für C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>)

|  |
|--|
| <b>NMR-Daten des Biscumarin-Derivats in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)</b> |
|--|

| Pos. | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz) | ROESY (H→H)                                 | HMQC (H→C) | HMBC (H→C)                |
|------|-------------------------|--|---|------------|---------------------------|
| 2    | 161.8 (s)               |  |   |            |                           |
| 3    | 94.3 (s)                |  |   |            |                           |
| 4    | 165.3 (s)               |  |   |            |                           |
| 5    | 139.2 (s)               |  |   |            |                           |
| 6    | 116.1 (d)               | 6.61 (1H, d, 2.0)                        | 7-OH, CH <sub>3</sub> -11                   | C-6        | C-7, -8, -10, -11         |
| 7    | 160.5 (s)               |  |   |            |                           |
| 8    | 100.3 (d)               | 6.57 (1H, d, 2.0)                        | 7-OH  | C-8        | C-6, -7, -9, -10          |
| 9    | 156.2 (s)               |  |   |            |                           |
| 10   | 106.1 (s)               |  |   |            |                           |
| 11   | 23.3 (q)                | 2.62 (3H, s, CH <sub>3</sub> )           | H-6   | C-11       | C-4, -5, -6, -9, -10      |
| 4-OH |                         | 11.28 (1H, s, OH)                        |   |            | C-10                      |
| 7-OH |                         | 10.49 (1H, s OH)                         | H-6, H-8                                    |            | C-6, -7, -8               |
| 2'   | 161.4 (s)               |  |   |            |                           |
| 3'   | 99.1 (s)                |  |   |            |                           |
| 4'   | 168.8 (s)               |  |   |            |                           |
| 5'   | 138.3 (s)               |  |   |            |                           |
| 6'   | 115.4 (d)               | 6.79 (1H, d, 2.5)                        | CH <sub>3</sub> -11', OCH <sub>3</sub> -12' | C-6'       | C-7', -8', -10'           |
| 7'   | 161.5 (s)               |  |   |            |                           |
| 8'   | 98.6 (d)                | 6.87 (1H, d, 2.5)                        | OCH <sub>3</sub> -12'                       | C-8'       | C-6', -7', -9', -10'      |
| 9'   | 155.6 (s)               |  |   |            |                           |
| 10'  | 109.4 (s)               |  |   |            |                           |
| 11'  | 23.1 (q)                | 2.58 (3H, s, CH <sub>3</sub> )           | H-6', OCH <sub>3</sub> -13'                 | C-11'      | C-4', -5', -6', -9', -10' |
| 12'  | 55.8 (q)                | 3.84 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )          | H-6', H-8'                                  | C-12'      | C-7'                      |
| 13'  | 59.2 (q)                | 3.76 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )          | CH <sub>3</sub> -11'                        | C-13'      | C-4'                      |

Die starke Hochfeldverschiebung für C-8 war zudem ein deutlicher Hinweis darauf, daß sich dieses C-Atom in *ortho*-Position zu zwei phenolischen Substituenten befinden mußte. C-6 wies zudem ein starkes Signal zu einer aromatischen Methylgruppe auf (2.62 ppm, H<sub>3</sub>-11), die folglich an C-5 substituiert sein mußte.

Diese Methylprotonen korrelierten zusätzlich mit insgesamt vier weiteren Signalen. Davon waren zwei starke Signale für die noch ausstehenden <sup>2</sup>J<sub>CH</sub>- und <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>-

Korrelationen zu C-5 und C-10 sowie zwei schwache Signale für  $^4J_{\text{CH}}$ -Korrelationen zu C-4 und C-9 zu beobachten. Solche  $^4J_{\text{CH}}$ -Korrelationen sind z.B. auch für Anthrone zwischen C-10a und den Protonen einer Methylgruppe in Position 9 beschrieben [Araya-Maturana *et al.*, 2001]).

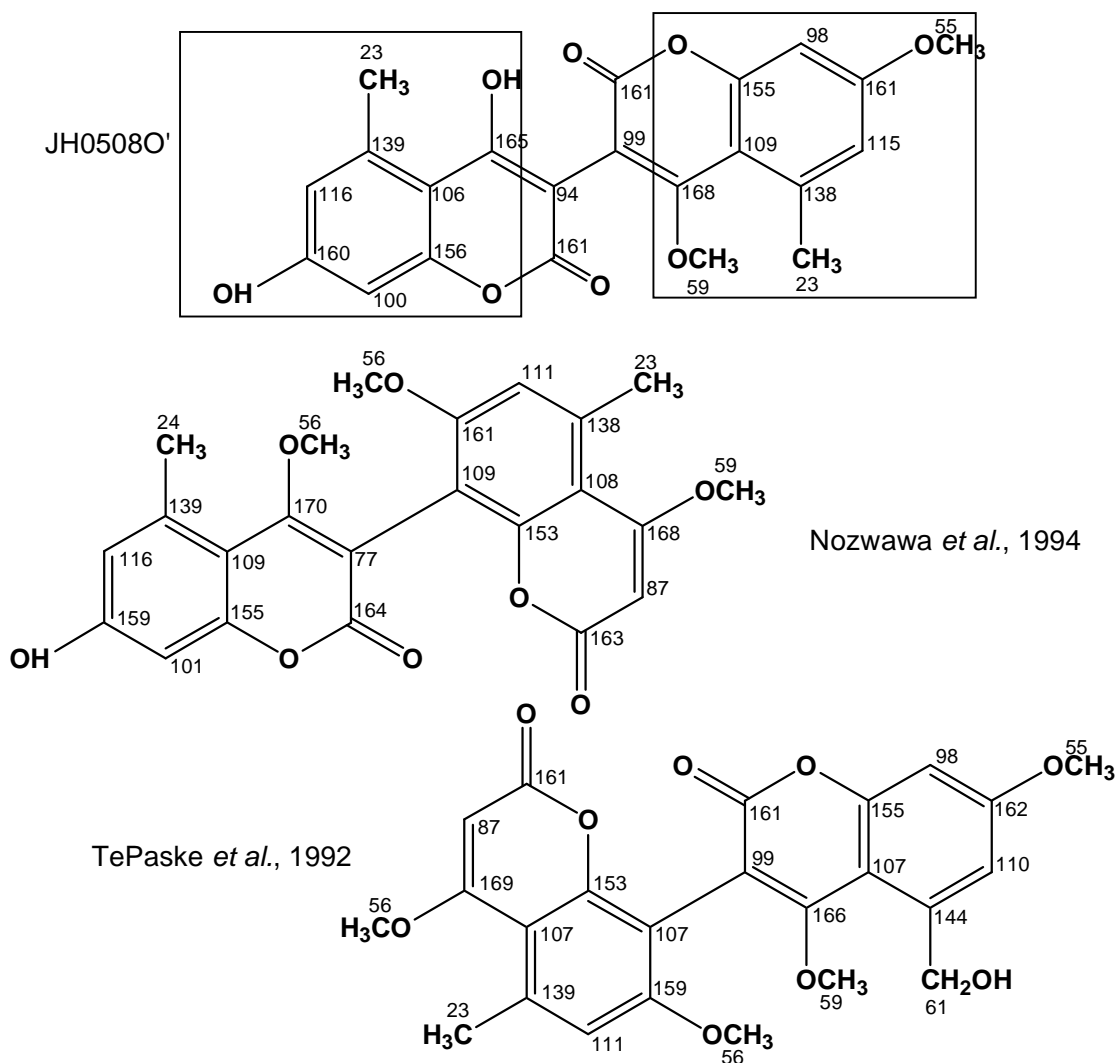
Das Signal für den quartären Kohlenstoff (C-10) war wiederum sehr stark hochfeldverschoben (106.1 ppm) und deutete auf zwei *ortho*-ständige phenolische Substituenten (C-4 und C-9) hin. Dadurch konnte die Korrelation der Methylprotonen über zwei Bindungen dem Signal bei 139.2 ppm zugeordnet werden. Schließlich konnte mit den  $^2J$ - und  $^3J$ -Kreuzsignalen von 8-H zu C-9 und C-10 eine zyklische Substruktur formuliert werden, wie sie in **Abb. E18** in der endgültigen Struktur markiert ist.

Analog konnte mit der strukturell ähnlichen zweiten Substruktur verfahren werden. Auch hier wurden die Signale der *meta*-koppelnden Protonen und der mit ihnen direkt verknüpften Kohlenstoffatome als Ausgangspunkte gewählt. Der Substituent zwischen den beiden Protonen war in diesem Falle allerdings eine Methoxygruppe, wie sich aus der Korrelation von H<sub>3</sub>-12' (3.84 ppm) zu C-7' (161.5 ppm) eindeutig ergab.

Vier der  $^{13}\text{C}$ -Signale konnten nicht über HMBC-Korrelationen zugeordnet werden. Es handelte sich um die Signale im tiefen Feld bei 161.8 und 161.4 ppm (C-2 und C-2') und die Signale bei 94.3 und 99.1 ppm (C-3 und C-3'). An dieser Stelle wurden die Doppelbindungsäquivalente (DBE) der Verbindung mit den vorhandenen Substrukturen abgeglichen. Für die Summenformel C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub> ergaben sich 14 DBE. Davon wurden durch die bisher formulierten Substrukturen 10 DBE erklärt. Die Signale im tiefen Feld konnten mit Hilfe der Informationen aus dem IR-Spektrum als Carbonylsignale (Peak bei 1686 cm<sup>-1</sup>) identifiziert werden und bedeuteten damit zwei weitere DBE. Die verbliebenen 2 DBE konnten nur durch je einen weiteren Ringschluß in beiden Dimer-Untereinheiten erklärt werden. Dadurch entstanden zwei Cumarin-Einheiten, für die als einzige Verknüpfungsmöglichkeit C-3 und C-3' verblieben. Die chemische Verschiebung von C-3/-3' und C-4/-4' war charakteristisch für ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Carbonyl. Somit ließ sich die Struktur von JH0508O' als 3,3'-verknüpftes Biscumarin-Derivat formulieren.

## Ergebnisse

Mit Hilfe eines ROESY-Spektrums der Verbindung konnten die zuvor vorgenommenen Zuordnungen abgesichert werden und der Vergleich der NMR-Daten mit denen von Biscumarinen aus der Literatur [Nozawa *et al.*, 1994 und TePaske *et al.*, 1992] lieferte zusätzliche Bestätigung (**Abb. E18**). Die Summenformel der Verbindung wurde mittels der hochauflösenden ESI-Massenspektrometrie kontrolliert ( $m/z = 411$   $[M+H]^+$ : experimentell = 411.1044 amu, berechnet = 411.1080 amu).



**Abb. E18:** Struktur von JH05080' mit <sup>13</sup>C-NMR-Daten (die beiden während der Strukturaufklärung formulierten Substrukturen sind markiert) und <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Biscumarinen aus der Literatur (die chemische Verschiebung von C-3 bei Nozawa muß vermutlich 97 statt 77 ppm betragen).

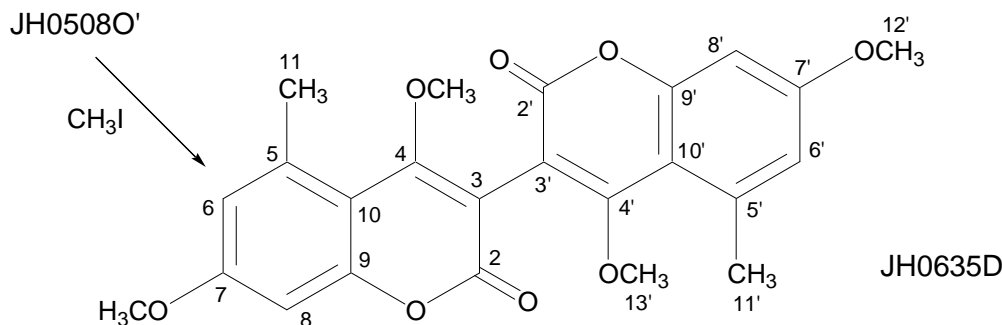
Um zu überprüfen, ob die Verbindung aufgrund einer für Biphenyle möglichen, axialen Chiralität optisch aktiv ist, wurde der Drehwert der Verbindung bestimmt. Bei Konzentrationen von  $c = 0.7$  und  $1.4$  in DMSO war keine optische Drehung feststellbar. Auch ein zusätzlich aufgenommenes CD-Spektrum ergab keinen

Hinweis auf optische Aktivität. Offensichtlich nehmen die beiden Unterheiten keine bevorzugte räumliche Orientierung zueinander ein.

In einem weiteren Experiment wurde die heterodimere Verbindung JH0508O' permethyliert, um zu überprüfen, ob das Produkt wie zu erwarten ein Homodimer sein würde. Das  $^1\text{H}$ -Spektrum des permethylierten Biscumarin-Derivats würde dann nur noch einen Satz charakteristischer Cumarin-Signale aufweisen. Zu diesem Zweck wurde die Verbindung mit Diazomethan und Methyljodid behandelt. Hierbei entstanden Derivate mit verschiedenen Methylierungsgraden, von denen mittels präparativer HPLC das homodimere Derivat JH0635D isoliert wurde (**Abb. E19**).

Sowohl das Molekulargewicht, als auch die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten des permethylierten Homodimers waren zusätzliche Belege dafür, daß die Struktur des Biscumarin-Derivats so vorlag wie angenommen.

Strukturdaten von JH0635D: ESI-MS (positiv)  $m/z = 439.6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  : 2.60 (2 x 3H, s, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 3.80 (2 x 3H, s, 2 x  $\text{OCH}_3$ ), 3.85 (2 x 3H, s, 2 x  $\text{OCH}_3$ ), 6.83 (2 x 1H, d, 2.5 Hz), 6.91 (2 x 1H, d, 2.5 Hz).



**Abb. E19:** Mit Methyljodid und Diazomethan kann das heterodimere Biscumarin-Derivat JH0508O' in sein homodimeres Derivat JH0635D überführt werden.

### c) Pyranopyrrol A

Ein 2-Propenylrest mit *trans*-ständiger Doppelbindung war eines der charakteristischen Strukturmerkmale von JH0507A und von drei weiteren strukturverwandten Verbindungen, die unter **3.3.3.2.7** besprochen werden. Im  $^1\text{H}$ -Spektrum wurde dieses Strukturmerkmal ausgedrückt durch ein charakteristisches Methylgruppensignal bei 1.92 ppm, das als Dublett vom Dublett erschien ( $^3J_{\text{HH}} = 6.9$



Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.6$  Hz). Die beiden weiteren Protonen der Propenyl-Einheit waren in Form von ebenfalls charakteristischen Dubletts von Quartetts im  $^1\text{H}$ -Spektrum repräsentiert. Das der Methylgruppe benachbarte Proton erschien bei 6.45 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz,  $^3J_{\text{HH, trans}} = 15.9$  Hz) während das zweite Proton bei 6.57 ppm lag ( $^3J_{\text{HH, trans}} = 15.9$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.6$  Hz).

Darüber hinaus fanden sich im  $^1\text{H}$ -Spektrum weitere vier Signale zwischen 5 und 10 ppm, von denen nur eines eine CH-direkt-Korrelation aufwies. Dieses Signal lag bei 5.72 ppm und war zum Dublett vom Dublett aufgespalten (1.0 und 8.8 Hz). Die Direkt-Korrelation ging zu einem Kohlenstoffsignal bei 75.4 ppm. Die chemische Verschiebung des Protons und des C-Atoms sprachen für eine aliphatische Substruktur, an die ein Sauerstoff gebunden ist. Der Sauerstoff war Teil einer Hydroxygruppe, deren Proton (6.77 ppm) mit dem Proton bei 5.72 ppm mit 8.8 Hz koppelte. Damit konnte als zweite Substruktur ein sekundärer Alkohol formuliert werden. Die zweite Kopplung des Protons bei 5.72 ppm von 1.0 Hz führte zu einem weiteren heteroatomgebundenen Proton bei 8.60 ppm. Das dritte Wasserstoffatom ohne CH-direkt-Korrelation liegt bei 9.67 ppm.

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum waren neben den Signalen des Propenylrests (18.9, 131.8 und 119.2 ppm) und des sekundären Alkohols (75.4 ppm) noch drei Signale im aromatischen Bereich (112.0, 142.4 und 146.2 ppm) sowie drei Signale für sauerstoffgebundene ungesättigte Kohlenstoffatome (165 - 175 ppm) zu finden.

Das Molekulargewicht der Verbindung lag bei 223 amu und ließ auf die Anwesenheit zumindest eines Stickstoffatoms schließen. Daraus ergab sich in Kombination mit den Informationen aus den 1D-NMR-Spektren eine vorläufige Summenformel von  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO} = 159$  amu. Die Differenz von 64 amu zum tatsächlichen Molekulargewicht entsprach vier Sauerstoffatomen und ergab damit eine vermutete Summenformel von  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_5$ .

Um die einzelnen Strukturinformationen zu verknüpfen, wurden ausgehend von der Propenyleinheit die HMBC-Korrelationen analysiert. Während das  $^{13}\text{C}$ -Signal bei 146.2 ppm CH-Korrelationen mit beiden *trans*-ständigen Protonen des Propenylrests aufwies, lag bei dem Signal bei 142.4 ppm nur ein Kreuzsignal mit dem weniger distal liegenden Proton vor. Damit setzte sich der Propenylrest mit diesen beiden C-Atomen fort, die zusätzlich mit einem Signal bei 9.67 ppm korrelierten. Dies ist ebenso für das C-Atom bei 169.3 ppm der Fall.

**Pyranopyrrol A**

Systemat. Name : 2,6-Dihydroxy-5-propenyl-1,2-dihydro-pyrano[3,2-b]pyrrol-3,7-dion

Beschreibung : weiße Nadeln

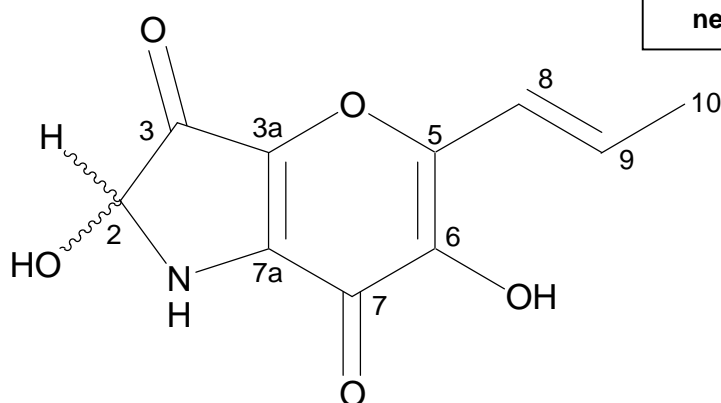
Probencode : JH0507A

Substanzmenge : 41.8 mg

Summenformel : C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>

Molekulargewicht : 223 g/mol

Quellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)



Retentionszeit : 11.2 min.

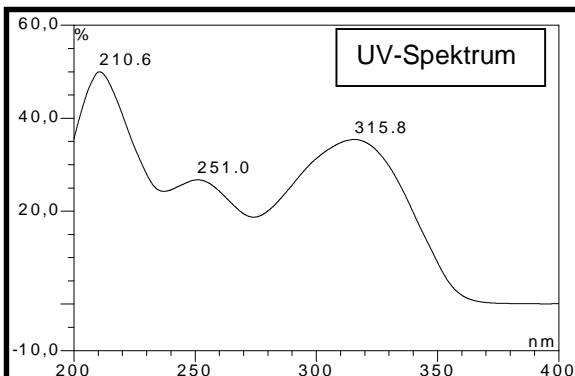
R<sub>f</sub>-Wert : 0.06

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : -

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : blaßgelb

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : hellbraun



Spezifische Drehung [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> : 59.9° (c = 1.0, DMSO)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>), ν<sub>max</sub>: 3286, 1716, 1654, 1636, 1615, 1576, 1488, 1394, 1219, 1035, 960, 792

ESI-MS (m/z): 224.2 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 222.6 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)

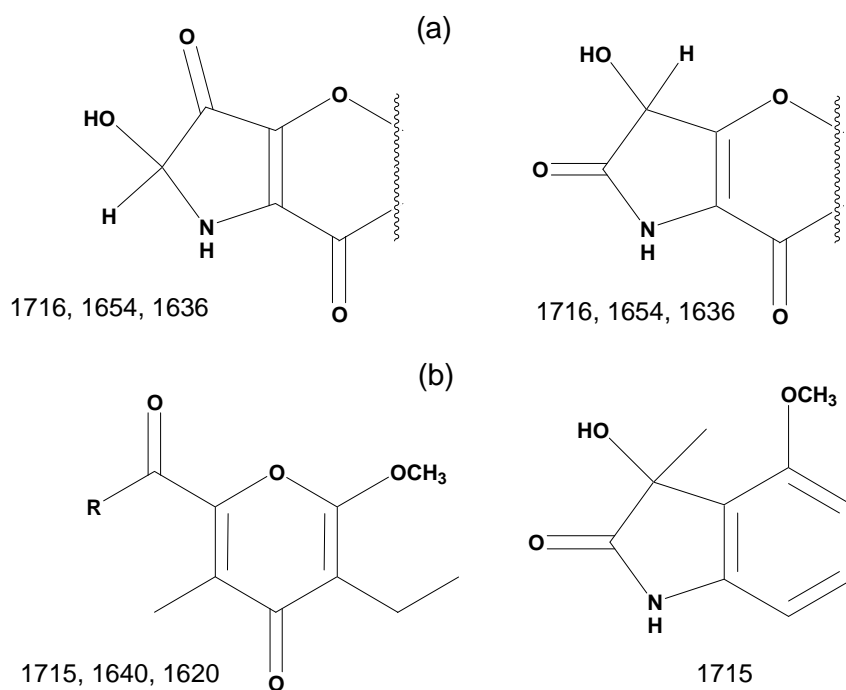
EI-MS (m/z, rel. Int.): 223 [M]<sup>+</sup> (8), 208 (7), 178 (6), 126 (6), 69 (49), 63 (100), 45 (70)

Hochauflösende ESI-MS: für m/z = 224 [M+H]<sup>+</sup>: experimentell = 224.0576 amu, berechnet = 224.0559 amu (für C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>)

NMR-Daten unter 3.3.2.3. e)

Aus den Befunden ergab sich, daß es sich bei dem Signal bei 9.67 ppm um eine Hydroxygruppe handelte, die am Kohlenstoffatom bei 142.4 ppm saß, wodurch auch zu erklären war, warum dieses Signal so weit im tiefen Feld lag. Davon ausgehend, daß das Signal bei 146.2 ppm ebenfalls durch eine Verknüpfung mit Sauerstoff entschirmt wurde und daß es sich bei dem Signal bei 169.3 ppm um eine Carbonylgruppe handelt, wurde ein 3-Hydroxy-2-propenyl- $\gamma$ -pyranon als erweiterte Substruktur formuliert.

Zurück zum heteroatomverknüpften Protonensignal bei 8.60 ppm: da dieses Proton Kreuzsignale mit insgesamt fünf C-Atomen aufwies, konnte es sich nur um eine NH-Gruppe und nicht um eine OH-Gruppe handeln. Eines dieser korrelierenden Kohlenstoffsignale war das der Carbonylgruppe des Pyranons. Die vier weiteren waren der sekundäre Alkohol, und die Signale bei 112.0, 165.3 und 174.3 ppm. Diese vier Signale korrelierten ebenfalls alle mit dem Proton des sekundären Alkohols. Das war nur möglich, wenn diese vier C-Atome und der Stickstoff einen Pyrrolring bilden, in dem das Signal bei 174.5 ppm zusätzlich eine Ketogruppe anzeigt. Die Orientierung der beiden Teilstrukturen Pyranon und Pyrrol zueinander ließ sich ableiten durch die bereits oben erwähnte Korrelation des Carbonyl-Kohlenstoffs des Pyranons mit der NH-Gruppe des Pyrrols.

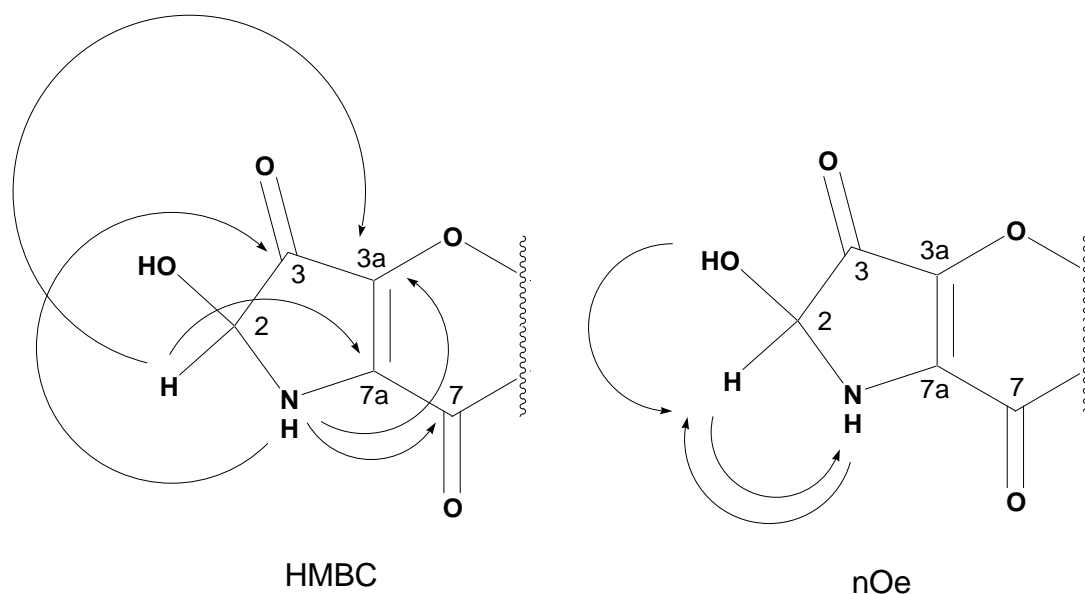


**Abb. E20:** (a) Plausible Strukturvorschläge für JH0507A und (b) Verbindungen aus der Literatur zum Vergleich der IR-Daten [Dekker *et al.*, 1987 und Jaensch *et al.*, 1989].

Die Positionen des sekundären Alkohols und der Carbonylgruppe waren aufgrund der vielen HMBC-Korrelationen im Fünfring zunächst nicht eindeutig festlegbar. Damit ergaben sich vorläufig zwei plausible Strukturvorschläge für JH0507A, wie sie in **Abb. E20** zu sehen sind. Auch mit Hilfe der IR-Daten war eine Differenzierung zwischen den beiden Strukturvorschlägen nicht möglich. Die Bande bei  $1716\text{ cm}^{-1}$  war mit Hilfe von Vergleichsdaten aus der Literatur sowohl als das Signal einer  $\gamma$ -Lactam-Carbonylgruppe interpretierbar [Dekker *et al.*, 1987] als auch als das Signal von konjugierten Ketogruppen [Jaensch *et al.*, 1989].

Ausschlaggebend für die Festlegung auf eine der beiden Strukturen waren die Ergebnisse der nOe-Differenz-Spektren. Hier konnten wechselseitig nOe-Effekte zwischen dem Proton des sekundären Alkohols und der NH-Gruppe nachgewiesen werden (**Abb. E21**). Damit handelte es sich bei JH0507A nicht um ein Lactam sondern ein Pyranopyrrol mit konjugierten Doppelbindungen.

Zur Absicherung der Struktur dieses ungewöhnlichen neuen Naturstoffs wurde die Summenformel mit der hochauflösenden ESI-Massenspektrometrie bestimmt ( $m/z$   $[M+H]^+ = 224$ : experimentell = 224.0576 amu, berechnet = 224.0559 amu).



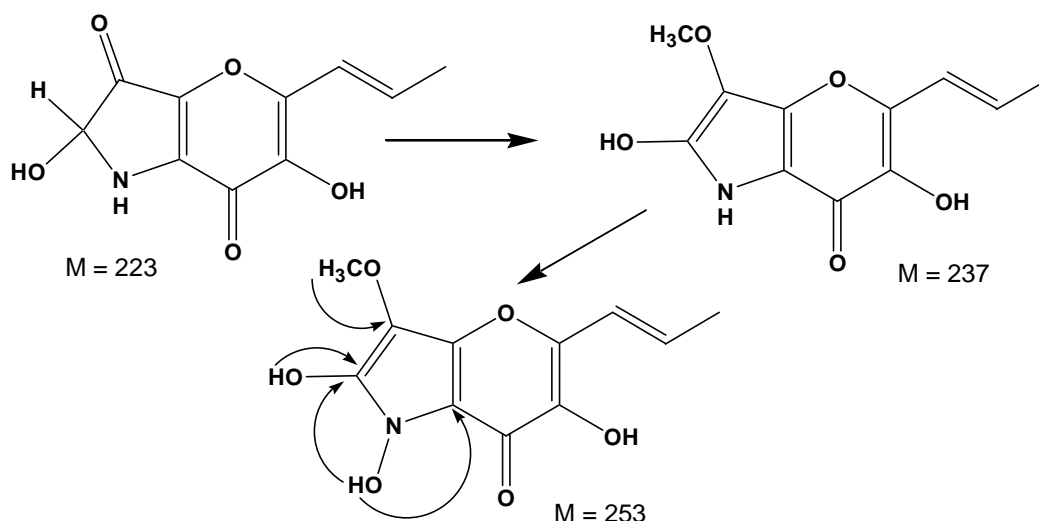
**Abb. E21:** Wichtige HMBC-Korrelationen und nOe-Effekte für die Strukturaufklärung des Pyranopyrrols.

### d) Pyranopyrrole B und C

Bei einer Retentionszeit von etwa 14 Minuten in der analytischen HPLC tauchten zwei um ca. eine Minute getrennte Peaks auf, deren UV-Spektren fast identisch waren. Die UV-Spektren waren zu dem des bereits beschriebenen Pyranopyrrols A sehr ähnlich. Die per präparativer HPLC isolierten Verbindungen JH0623A und B hatten laut ESI-MS ein Molekulargewicht von jeweils 253 amu.

Die Analyse der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren von JH0623B ergab im Vergleich mit dem Pyranopyrrol A, daß die spektralen Charakteristika für die 3-Hydroxy-2-propenyl- $\gamma$ -pyranon-Substruktur auch hier vorhanden waren. Allerdings fanden sich keine Signal für den sekundären Alkohol. Ebenso fehlte ein Signal im für Carbonylgruppen charakteristischen Bereich des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums.

Statt dessen tauchte im  $^1\text{H}$ -Spektrum bei 7.97 ppm ein zusätzlicher Peak für eine an einem  $\text{sp}^2$ -hybridisierten Kohlenstoff sitzende Hydroxygruppe und bei 3.85 ppm ein Signal für eine Methoxygruppe auf. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum fanden sich zwischen 150 und 160 ppm zwei zusätzliche Peaks im für heteroatomgebundene,  $\text{sp}^2$ -hybridisierte Kohlenstoffatome, die aber außerhalb der Carbonylregion lagen. Rechnet man diese strukturellen Veränderungen zusammen, so ergab sich basierend auf dem Molekulargewicht des Pyranopyrrols A von 223 amu die Masse 237 für JH0623B. Die resultierende vorläufige Struktur ist in **Abb. E22** dargestellt.



**Abb. E22:** Stationen der Strukturaufklärung der Pyranopyrrole B und C inklusive wichtiger HMBC-Korrelationen des Pyranopyrrols B.



Die verbleibende Differenz von 16 amu zum tatsächlichen Molekulargewicht konnte erklärt werden durch den Austausch eines Sauerstoffs durch ein Schwefelatom oder durch das Vorhandensein eines weiteren Sauerstoffatoms. Um die Summenformel von JH0623B eindeutig zu bestimmen, wurde die Feinmasse der Verbindung bestimmt (HREI-MS  $m/z = 253$ : experimentell = 253.0579 amu, berechnet = 253.0586 amu für  $C_{11}H_{11}NO_6$  und 253.0409 amu für  $C_{11}H_{11}NO_4S$ ). Damit stand fest, daß kein Schwefel im Molekül vertreten war, sondern ein zusätzliches Sauerstoffatom. Dieser Sauerstoff konnte nur in Form eines Hydroxylamins vorliegen. Für Hydroxylamine ist der Verlust der OH-Gruppe durch ein Fragmentation von [M-17] charakteristisch [Hesse *et al.*, 1991]. Im EI-Spektrum von JH0623B ließ sich diese Fragmentierung deutlich anhand des Signals bei 236 amu erkennen.

Die Schwesterverbindung von JH0623A unterschied sich bei gleicher Masse von JH0623B lediglich durch die Retentionszeit und kleine Abweichungen im  $^1H$ -Spektrum. Damit blieb nur noch die Anordnung der Substituenten am Pyrrolring der beiden Verbindungen zu klären.

Dies geschah über die Zuordnung der HMBC-Korrelationen von JH0623B. Die Position der Hydroxygruppe konnte nachgewiesen werden durch ein Kreuzsignal des C-Atoms, an dem diese Gruppe saß (162.8 ppm) mit dem Hydroxylaminproton während die Methoxyprotonen mit dem  $^{13}C$ -Signal bei 160.3 ppm korrelierten. Daraus folgte, daß der Fünfring von JH0623B (Pyranopyrrol B) ein 1,2-Dihydroxy-3-methoxypyrrrol war, während analog bei JH0623A (Pyranopyrrol C) ein 1,3-Dihydroxy-2-methoxypyrrrol vorlag.

### **e) Pyranopyrrol D**

Als eine Art strukturelles Bindeglied zwischen den Pyranopyrrolen A, B und C konnte JH0507B gesehen werden. Bei dieser Verbindung sind die beiden Sauerstoffsubstituenten über eine Methylen-dioxo-Brücke verbunden. Dies konnte durch die Analyse der  $^1H$ -NMR- und Massenspektren nachgewiesen werden. Das  $^1H$ -Spektrum von JH0507B wies wie die vorigen Verbindungen die charakteristischen Peaks für ein 3-Hydroxy-2-propenyl- $\gamma$ -pyranon auf. Allerdings schien der Pyrrolteil des Moleküls eindeutig anders aufgebaut zu sein. Anstelle der typischen Signale für

## Ergebnisse

einen sekundären Alkohol, Methoxy- oder Hydroxygruppen tauchte lediglich ein Peak bei 4.31 ppm auf, der laut Integral zwei Protonen repräsentierte. Dieses Signal stand für die beiden Protonen der Methylen-dioxo-Brücke. Damit handelt es sich bei dem Pyranopyrrol D um ein trizyklisches Derivat dieser neuen Substanzklasse.

### Pyranopyrrol D

Systemat. Name : 6-Hydroxy-2,3-methylen-dioxy-5-propenyl-1H-pyrano[3,2-b]pyrrol-7-on

Beschreibung : weißes Pulver

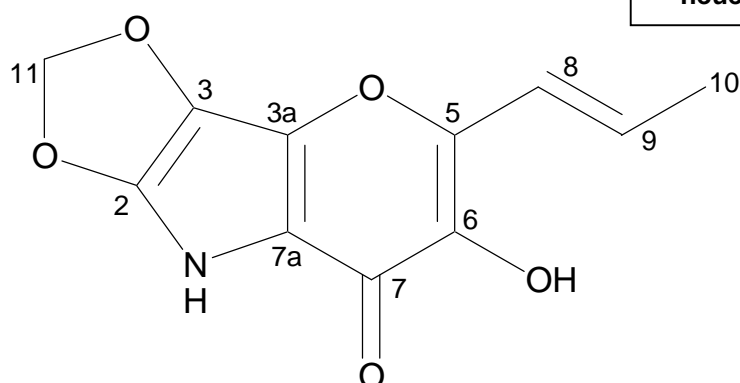
Probencode : JH0507B

Substanzmenge : 0.9 mg

Summenformel : C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>

Molekulargewicht : 235 g/mol

Quellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)



Retentionszeit : 11.7 min.

R<sub>f</sub>-Wert : n.b.\*

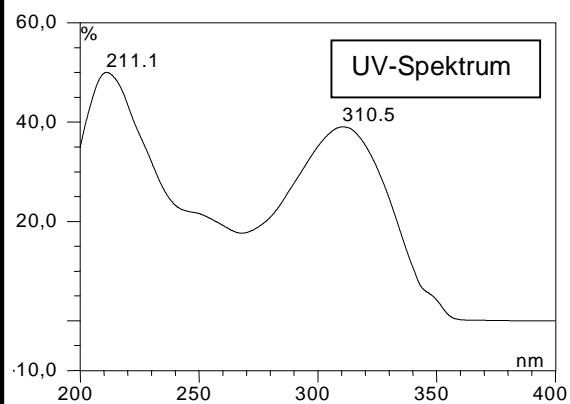
Fluoreszenzlösch. (254nm) : n.b.\*

Eigenfluoreszenz (366nm) : n.b.\*

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : n.b.\*

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : n.b.\*

\* n.b. = nicht bestimmt



ESI-MS (*m/z*): 236.1 [M+H]<sup>+</sup> (positiv)



**NMR-Daten der Pyranopyrrole A-D in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)**

| Pos. | A                       |   |                           | B                       |  |                     | C   | D   |
|------|-------------------------|---|---------------------------|-------------------------|--|---------------------|---|---|
|      | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)  | HMBC (H→C)                | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz) | HMBC (H→C)          | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)  | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)  |
| 1    |                         | 8.60 (1H, d, 1.0, NH)                     | C-2, C-3, C-3a, C-7, C-7a |                         | 7.65 (1H, s, N-OH)                       | C-2, C-7a           | 8.15 (1H, s, N-OH)                        | 8.17 (1H, s, NH)                          |
| 2    | 75.4 (d)                | 5.72 (1H, dd, 1.0, 8.8)                   | C-3, C-3a, C-7a           | 162.8 (s)               | 7.97 (1H, s, OH)                         | C-2                 |   |   |
|      |                         | 6.77 (1H, d, 8.8, OH)                     | C-2, C-3                  |                         |  |                     |   |   |
| 3    | 174.5 (s)               |   |                           | 160.3 (s)               |  |                     | 8.26 (1H, s, OH)                          |   |
| 3a   | 165.3 (s)               |   |                           | 150.0 (s)               |  |                     |   |   |
| 5    | 146.2 (s)               |   |                           | 145.9 (s)               |  |                     |   |   |
| 6    | 142.4 (s)               | 9.67 (1H, s, OH)                          | C-5, C-6, C-7             | 141.7 (s)               | 10.00 (1H, s, OH)                        | C-5, C-6, C-7       | 9.95 (1H, s, OH)                          | 9.54 (1H, s, OH)                          |
| 7    | 169.3 (s)               |   |                           | 171.5 (s)               |  |                     |   |   |
| 7a   | 112.0 (s)               |   |                           | 122.1 (s)               |  |                     |   |   |
| 8    | 119.2 (d)               | 6.57 (1H, dq, 1.6, 15.9)                  | C-5, C-6, C-9, C-10       | 118.4 (d)               | 6.57 (1H, d, 15.8)                       | C-5, C-6, C-9, C-10 | 6.54 (1H, dd, 1.3, 16.4)                  | 6.56 (1H, dd, 1.9, 15.8)                  |
| 9    | 131.8 (d)               | 6.45 (1H, dq, 6.8, 15.9)                  | C-5, C-8, C-10            | 133.5 (d)               | 6.51 (1H, dq, 5.4, 15.8)                 | C-5, C-8, C-10      | 6.93 (1H, dq, 6.9, 16.4)                  | 6.44 (1H, dq, 6.9, 15.8)                  |
| 10   | 18.94 (q)               | 1.92 (3H, dd, 1.6, 6.9, CH <sub>3</sub> ) | C-8, C-9                  | 18.6 (q)                | 1.92 (1H, d, 5.5, CH <sub>3</sub> )      | C-8, C-9            | 1.93 (3H, dd, 1.3, 6.9, CH <sub>3</sub> ) | 1.91 (3H, dd, 1.9, 6.9, CH <sub>3</sub> ) |
| 11   |                         |   |                           | 53.3 (q)                | 3.85 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )          | C-3                 | 3.72 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )           | 4.31 (2H, s, OCH <sub>2</sub> O)          |

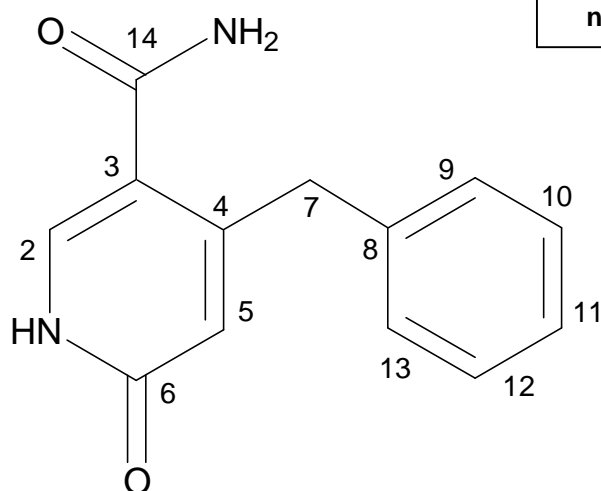
### **f) Benzylpyridin A**

Die beiden Verbindungen JH0622C (Benzylpyridin A) und JH0620B (Benzylpyridin B) haben eine gemeinsame Substruktur oder genauer: die Struktur von JH0620C ist bis auf ein Proton komplett in JH0620B enthalten. Aus diesem Grund wird hier zunächst die Strukturaufklärung von JH0622C besprochen.

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von JH0622C setzte sich unter anderem aus einem Signal für eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe bei 3.90 ppm ( $\text{H}_2$ -8, wobei die chemische Verschiebung auf ein benachbartes Heteroatom oder einen Aromaten hindeutete) und zwei Multipletts bei etwa 7.3 ppm für insgesamt fünf aromatische Protonen (H-9 bis H-13), die zu einem monosubstituierten Phenylrest gehörten, zusammen. Des Weiteren waren zwei scharfe Singulets (6.30 und 8.32 ppm), die typisch für *para*-ständige Protonen in den Positionen H-2 und H-5 eines trisubstituierten Pyridinrings sind, zu finden, wobei das im tieferen Feld liegende Signal zu dem Stickstoff-benachbarten Proton gehörte. Im tiefen Feld schließlich lagen drei breite Singulets für OH oder NH-Protonen (7.40, 9.47 und 12.21 ppm)

Die  $^{13}\text{C}$ -Daten von JH0622C wurden aus den HMQC- und HMBC-Spektren abgeleitet. Alle Schlüsse, die aus dem  $^1\text{H}$ -Spektrum gezogen worden waren, konnten durch CH-Korrelationen bestätigt werden. Die aromatischen Protonen zeigten Direkt-Korrelationen mit Kohlenstoffatomen zwischen 127 (H-9 / H-13) und 129 ppm (H-10 / H-12 und H-11) und eine *long-range*-Korrelation mit einem nicht-protoniertem C-Atom bei 136.9 ppm (H-8). Die Korrelationen zwischen H-9 / H-13 und C-7 sowie  $\text{H}_2$ -7 und C-9 / C-13 sprachen für die Verknüpfung des Phenylrings mit der  $\text{CH}_2$ -Gruppe. Damit stand ein Benzylrest als erste Substruktur fest.

Im Pyridinring waren die Positionen 2 und 5 bereits mit Protonen besetzt. Die dazugehörigen  $^{13}\text{C}$ -Signale lagen bei 142.1 und 118.2 ppm. Damit blieben vier Signale ohne CH-direkt-Korrelationen übrig (117.4, 151.0, 165.5 und 177.6 ppm). Eine *long-range*-Korrelation des  $\text{CH}_2$ -Kohlenstoffatoms (C-7) führte zu H-5 im Pyridinring. Die Signale von C-5 (118.2 ppm) und C-4 (151.0) waren charakteristisch für eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung mit dem Carbonyl-Kohlenstoff in Position 6 (165.5 ppm, Kreuzsignal von H-5 und C-6).

**Benzyldipridin A**Systemat. Name : 4-Benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-pyridin-3-carboxylamidBeschreibung : weißes PulverProbencode : JH0622CSubstanzmenge : 6.0 mgSummenformel : C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Molekulargewicht : 228 g/molQuellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)

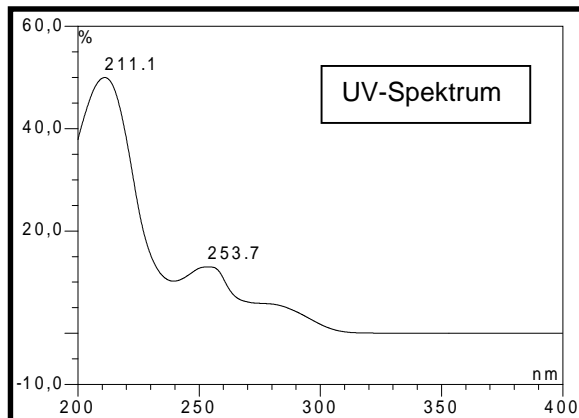
neuer Naturstoff !

Retentionszeit : 14.8 min.

R<sub>f</sub>-Wert : 0.27

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : hellblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -

UV-Spektrum

ESI-MS (*m/z*): 229.2 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 227.7 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)EI-MS (*m/z*, rel. Int.): 228 [M]<sup>+</sup> (60), 227 (95), 211 (40), 210 (100), 185 (20),  
155 (20), 154 (22)Hochauflösende EI-MS: für *m/z* = 228: experimentell = 228.0880 amu,  
berechnet = 228.0899 amu (für C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

|  |
|--|
| <b>NMR-Daten von Benzylpyridin A in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)</b> |
|--|

| Pos.                  | <sup>13</sup> C δ* (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult.,<br>(J in Hz) | HMQC<br>(H→C) | HMBC<br>(H→C)      |
|-----------------------|--------------------------|---|---------------|--------------------|
| <b>1</b>              |                          | 12.21 (1H, s, NH)                           |               |                    |
| <b>2</b>              | 142.1 (d)                | 8.32 (1H, s)                                | C-2           | C-4, C-6, C-14     |
| <b>3</b>              | 117.4 (s)                |   |               |                    |
| <b>4</b>              | 151.0 (s)                |   |               |                    |
| <b>5</b>              | 118.2 (d)                | 6.30 (1H, s)                                | C-5           | C-3, C-4, C-6, C-7 |
| <b>6</b>              | 165.5 (s)                |   |               |                    |
| <b>7</b>              | 37.6 (t)                 | 3.90 (2H, s, CH <sub>2</sub> )              | C-7           | C-4, C-8, C-9/13   |
| <b>8</b>              | 136.9 (s)                |   |               |                    |
| <b>9/13</b>           | 128.8 (2d)               | 7.34 (2H, m)                                | C-9/13        | C-8, C-11          |
| <b>10/12</b>          | 126.9 (2d)               | 7.28 (2H, m)                                | C-10/12       | C-9/13, C-11       |
| <b>11</b>             | 126.9 (d)                | 7.28 (1H, m)                                | C-11          | C-9/13, C-10/12    |
| <b>14</b>             | 177.6 (s)                |   |               |                    |
| <b>NH<sub>2</sub></b> |                          | 9.47 (1H, s)                                |               |                    |
| <b>NH<sub>2</sub></b> |                          | 7.40 (1H, s)                                |               |                    |

\* Die <sup>13</sup>C-Daten wurden aus den HMQC- und HMBC-Spektren abgeleitet.

Ein weiteres Kreuzsignal von H-5 führte zu dem Signal bei 117.4 ppm, das zu dem Kohlenstoffatom in Position 3 gehörte. Proton H-2 wies drei HMBC-Korrelationen auf: eine mit C-4, eine mit C-6 und eine mit dem Carboxamid-Kohlenstoffatom bei 177.6 ppm (C-14). Charakteristisch für die Carboxamid-Protonen waren die beiden breiten Singulets bei 7.40 und 9.47 ppm. Die Werte der chemischen Verschiebung von C-14, C-3 und C-2 deuteten auf das Vorliegen einer zweiten α,β-ungesättigten Carbonylsubstruktur hin. Auf der Basis einer *long-range*-Korrelation von C-2 und H-6 konnte schließlich ein Pyridinonring formuliert werden.

Damit war die Struktur der Verbindung als 4-Benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-pyridin-3-carboxylamid identifiziert mit der dazugehörigen Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (bestätigt durch HREI-MS: *m/z* = 228: experimentell = 228.0880 amu, berechnet = 228.0899 amu für C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **g) Benzylpyridin B**

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum des Benzylpyridin B wies einen Satz Signale auf, der auch im  $^1\text{H}$ -Spektrum von Benzylpyridin A enthalten war (Phenylprotonen-Multipletts,  $\text{CH}_2$ -Protonen, zwei aromatische Singulets bei 6 und 8 ppm und die breiten Singulets für die  $\text{NH}_2$ -Protonen des Carboxamids). Entscheidende Abweichungen zu JH0622C gab es in zwei Punkten. Die  $\text{CH}_2$ -Protonen zeigten unterschiedliche chemische Verschiebungen (3.75 und 3.91 ppm) und wiesen eine geminale Kopplung von 16.0 Hz auf. Dies deutete darauf hin, daß das Molekül chiral ist, was durch die Messung der spezifischen Drehung ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ :  $37.8^\circ$  ( $c = 0.5$  und  $1.0$ , DMSO)) bestätigt wurde. Der zweite entscheidende Unterschied war, daß der Pyridin-Stickstoff offensichtlich substituiert war.

Zusätzlich zum  $^1\text{H}$ -Spektrum von Benzylpyridin A fanden sich Signale für einen weiteren Benzylrest, für eine Methoxygruppe (3.79 ppm), für zwei *meta*-koppelnde Protonen (6.23 und 5.65 ppm) und ein Dublett vom Dublett bei 5.62 ppm.

Sowohl die *meta*-koppelnden Protonen als auch die Protonen der Methoxygruppe zeigten HMBC-Korrelationen mit den jeweiligen Kohlenstoffatomen in diesen Positionen sowie mit einem  $^{13}\text{C}$ -Signal bei 170.0 ppm (C-4'). Dies deutete darauf hin, daß die Methoxygruppe an das C-Atom zwischen den beiden *meta*-koppelnden Protonen gebunden sein mußte. Die extreme Hochfeldverschiebung für C-3' bei 89.3 ppm ist ungewöhnlich und konnte nur durch ein Kohlenstoffatom in  $\alpha$ -Position einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylsubstruktur mit einem zusätzlichen Sauerstoffsubstituenten in  $\beta$ -Position erklärt werden.

Damit war klar, daß eines der beiden Signale bei 160 ppm für eine Carbonylgruppe stehen mußte. Das andere Signal war gemeinsam mit dem Signal bei 102.4 ppm (C-5') charakteristisch für ein weiteres  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes System, ebenfalls mit einem Sauerstoffsubstituenten. Diese Strukturmerkmale konnten am besten durch eine  $\alpha$ -Pyron-Substruktur erklärt werden und der Vergleich mit Literaturdaten bestätigte diese Annahme [Varoglu *et al.*, 2000].

**Benzylopyridin B**

Systemat. Name : 6-Benzyl-1-[1-(4-methoxy-6-oxo-6H-pyran-2-yl)-2-phenyl-ethyl]-4-oxo-1,4-dihydro-pyridin-3-carboxylamid

Beschreibung : farbloses Öl

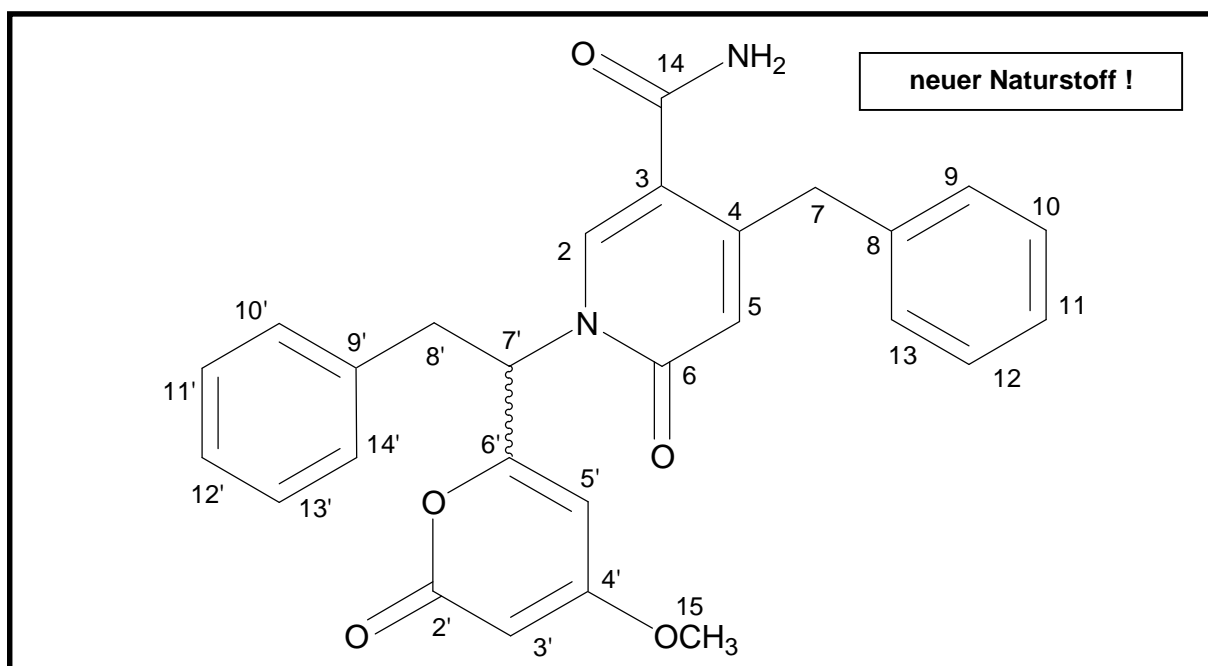
Probencode : JH0620B

Substanzmenge : 3.8 mg

Summenformel : C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Molekulargewicht : 456 g/mol

Quellorganismus : *Aspergillus niger* aus *Axinella damicornis* (E99/3-341)



Retentionszeit : 22.7 min.

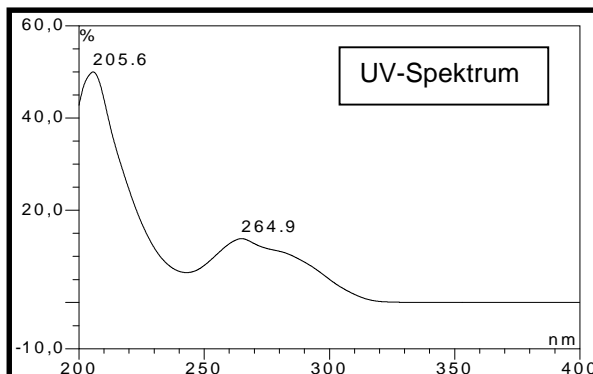
R<sub>f</sub>-Wert : 0.48

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : hellblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : blaßbraun



Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  : 37.8° (c = 0.5 und 1.0, DMSO)

ESI-MS (*m/z*): 457.3 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), MS/MS 457@35: *m/z* 229.1,  
455.8 [M-H]<sup>-</sup> (negativ), MS/MS 455@35: *m/z* 411.2, 379.3

EI-MS (*m/z*, rel. Int.): 456 [M]<sup>+</sup> (71), 368 (66), 339 (36), 313 (42), 257 (53), 236 (60),  
124 (61), 97 (91), 83 (100)

Hochauflösende EI-MS: für *m/z* = 456: experimentell = 456.1681 amu,  
berechnet = 456.1685 amu (für C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

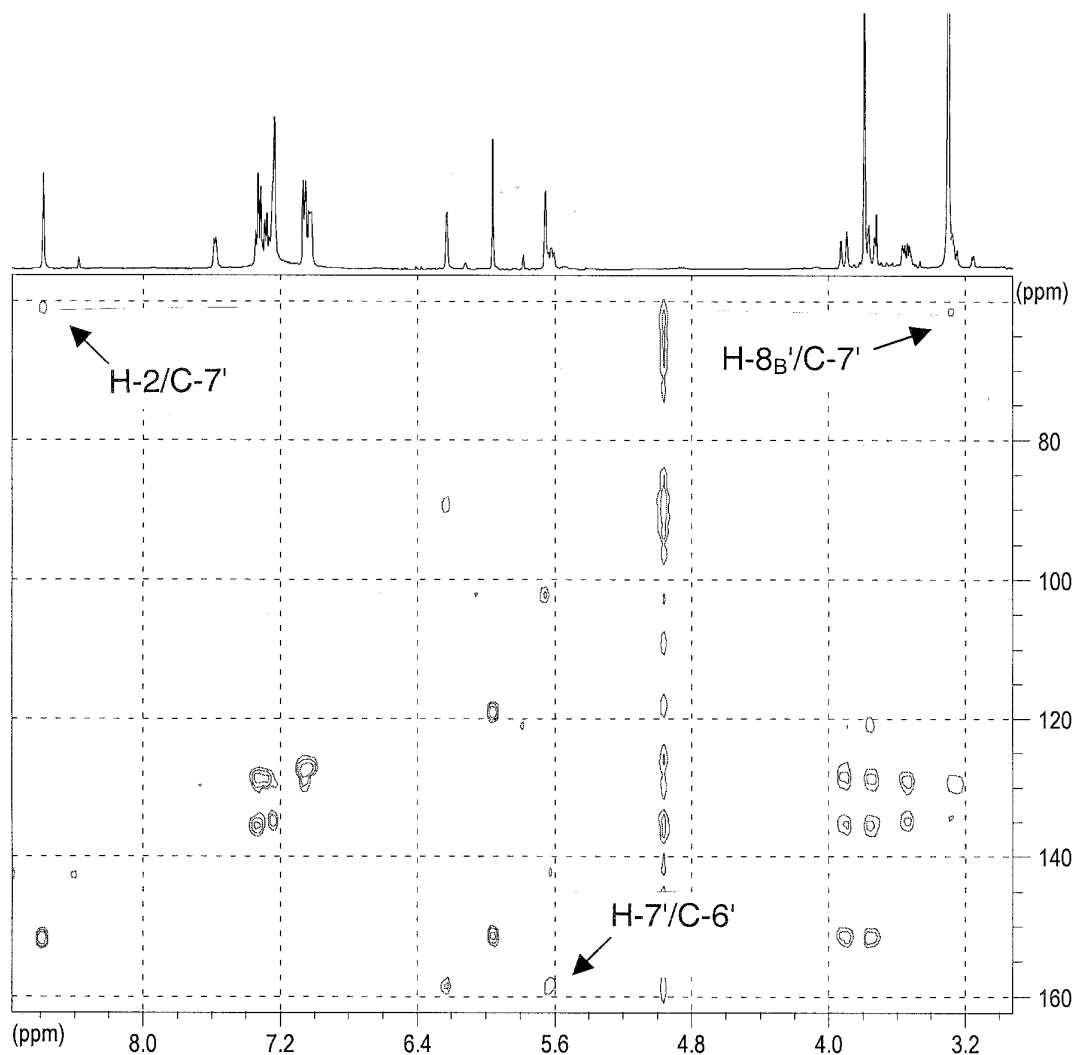
**NMR-Daten von Benzylpyridin B in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)**

| Pos.            | <sup>13</sup> C δ (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)                | COSY (H→H)  | HMQC (H→C) | HMBC (H→C)            |
|-----------------|-------------------------|---|---|------------|-----------------------|
| 2               | 143.8 (d)               | 8.57 (1H, s)  |   | C-2        | C-4, C-6, C-14, C-7'  |
| 3               | 118.9 (s)               |   |   |            |                       |
| 4               | 151.7 (s)               |   |   |            |                       |
| 5               | 121.9 (d)               | 5.96 (1H, s)  | 7-H <sub>A</sub> , 7-H <sub>B</sub>               | C-5        | C-3, C-4, C-6, C-7    |
| 6               | 164.5 (s)               |   |   |            |                       |
| 7               | 36.9 (t)                | 3.91 (1H, d, 16.4, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe) | 5-H, 7-H <sub>A</sub> , 9/13-H                    | C-7        | C-4, C-8, C-9/13      |
|                 |                         | 3.75 (1H, d, 16.4, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe) | 5-H, 7-H <sub>A</sub> , 9/13-H                    | C-7        | C-4, C-5, C-8, C-9/13 |
| 8               | 135.4 (s)               |   |   |            |                       |
| 9/13            | 128.9 (2d)              | 7.05 (2H, m)  | 7-H <sub>A</sub> , 7-H <sub>B</sub> , 10/12-H     | C-9/13     | C-10/12               |
| 10/12           | 128.6 (2d)              | 7.32 (2H, m)  | 9/13-H  | C-10/12    | C-8, C-11             |
| 11              | 128.9 (d)               | 7.27 (1H, m)  |   | C-11       | C-9/13                |
| 14              | 176.1 (s)               |   |   |            |                       |
| 2'              | 162.0 (s)               |   |   |            |                       |
| 3'              | 89.3 (d)                | 5.65 (1H, d, 2.5)                                       |   | C-3'       | C-4', C-5'            |
| 4'              | 170.0 (s)               |   |   |            |                       |
| 5'              | 102.4 (d)               | 6.23 (1H, d, 2.5)                                       |   | C-5'       | C-3', C-4', C-6'      |
| 6'              | 158.3 (s)               |   |   |            |                       |
| 7'              | 60.7 (d)                | 5.62 (1H, dd, 6.9, 8.2)                                 | 8'-H <sub>A</sub> , 8'-H <sub>B</sub>             | C-7'       | C-2, C-6'             |
| 8'              | 36.7 (t)                | 3.55 (1H, d, 13.9, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe) | 7'-H, 8'-H <sub>B</sub> , 10'/14'-H               | C-8'       | C-9', C-10'/14'       |
|                 |                         | 3.27 (1H, d, 13.9, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -Phe) | 7'-H, 8'-H <sub>A</sub> , 10'/14'-H               | C-8'       | C-7', C-9', C-10'/14' |
| 9'              | 135.0 (s)               |   |   |            |                       |
| 10'/14'         | 129.1 (2d)              | 7.02 (2H, m)  | 8'-H <sub>A</sub> , 8'-H <sub>B</sub> , 11'/13'-H | C-10'/14'  | C-12'                 |
| 11'/13'         | 127.2 (2d)              | 7.23 (2H, m)  | 10'/14'-H, 12'-H                                  | C-11'/13'  | C-9', C-10'/14'       |
| 12'             | 128.9 (d)               | 7.27 (1H, m)  | 11'/13'-H   | C-12'      |                       |
| 15'             | 56.7 (q)                | 3.79 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )                         |   | C-15'      | C-4'                  |
| NH <sub>2</sub> |                         | 9.31 (1H, d, 4.4)                                       | NH <sub>A</sub> H <sub>B</sub>                    |            |                       |
|                 |                         | 7.58 (1H, d, 4.4)                                       | NH <sub>A</sub> H <sub>B</sub>                    |            |                       |

## Ergebnisse

Die Schlüsselrolle bei der Verknüpfung der drei Substrukturen spielten der tertiäre Kohlenstoff bei 60.7 ppm (C-7') und das dazugehörige Proton bei 5.62 ppm (H-7'). Die COSY-Kreuzsignale zwischen H-7' und den CH<sub>2</sub>-Protonen (H-8<sub>A</sub>' und H-8<sub>B</sub>') des zweiten Benzylrests belegten die Verknüpfung von C-7' und C-8'. HMBC-Korrelationen von H-7' zu C-6' im  $\alpha$ -Pyronring sowie von H-7' zu C-2 im Pyridinonsystem (und *vice versa* von H-2 zu C-7') dienten als Beweise für die Verknüpfung der drei Substrukturen über den tertiären Kohlenstoff in Position 7' (**Abb. E23**).

Die resultierende tetrazyklische Struktur wies bei einem Molekulargewicht von 456 eine Summenformel von C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> auf. Dies wurde bestätigt durch die Daten der hochauflösenden Massenspektrometrie (HREI-MS:  $m/z = 456$ : experimentell = 456.1681 amu, berechnet = 456.1685 amu für C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

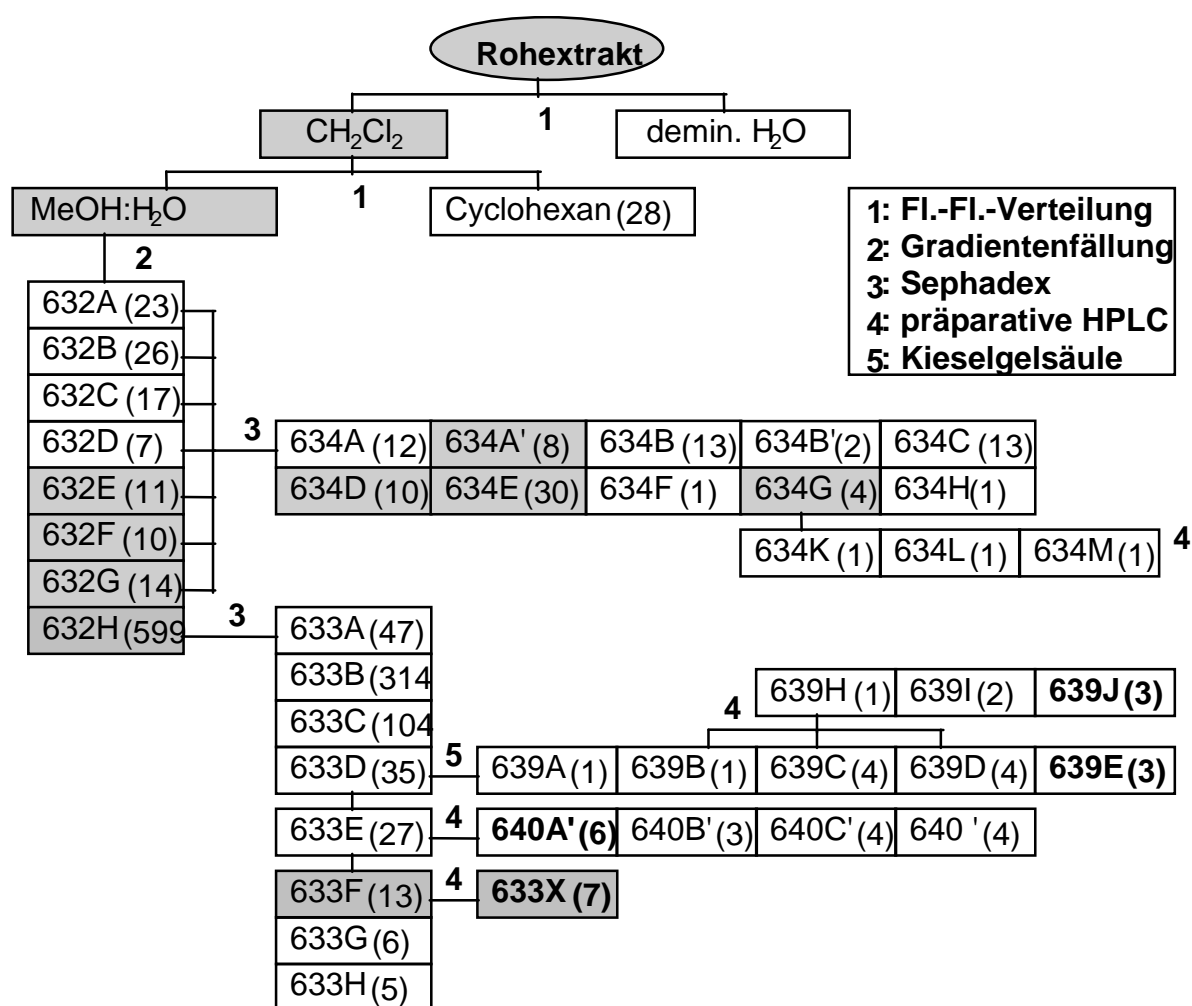


**Abb. E23:** HMBC-Spektrum mit den wichtigsten Korrelationen zur Verknüpfung der drei Substrukturen von Benzylpyridin B (JH0620B).



### 3.3.2.4. Inhaltsstoffe aus *Verticillium cf. cinnabarinum* (E00/13-33)

Das Chromatogramm der Screening-Kultur von E00/13-33 war relativ komplex und bestand aus 7 Hauptpeaks und einer Reihe von kleineren Peaks. Im Vergleich mit dem Chromatogramm des Extrakts der Großanzucht waren nur quantitative Unterschiede feststellbar. Entscheidend war jedoch, daß die Aktivität erhalten geblieben war. Die UV-Spektren der einzelnen Komponenten des Extrakts wichen nicht besonders stark voneinander ab. Somit war zu erwarten, daß es sich bei den Inhaltsstoffen um strukturell verwandte Verbindungen handeln könnte. Nicht zuletzt aufgrund der starken biologischen Aktivität des Extrakts in verschiedenen Testsystemen wurde schließlich eine Großkultur mit einem Kulturvolumen von 15 l von E00/13-33 angezogen.



**Abb. E24:** Trennschema für den Rohextrakt der Kultur von *Verticillium* E00/13-31: in Klammern = Ausbeute in Milligramm, grau unterlegt = aktive Fraktionen im *brine shrimp* assay, fettgedruckt = Reinsubstanzen.

## Ergebnisse

Im Fraßversuch mit den Raupen von *S. littoralis* wirkte der Extrakt nur schwach wachstumshemmend. Im Agarplattendiffusionstest wurden zum Teil sehr große Hemmhöfe mit Durchmessern von 22 mm (*S. aureus*) und 23 mm (*B. subtilis*) gemessen. Die Überlebensrate im *brine shrimp* assay war unter Einwirkung des Extrakts von E00/13-33 auch in der niedrigsten Dosis gleich null. Im Zytotoxizitätstest bewirkte der Extrakt eine 100%ige Hemmung des Wachstums aller eingesetzten Testzellen.

Die Extrakte, die aus den Extraktionsexperimenten hervorgingen waren teilweise sehr verschieden hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrer biologischen Aktivität. Im *brine shrimp* assay waren zwar alle gemäß 2.1.3.2. hergestellten Extrakte aktiv. Am geringsten war allerdings die Aktivität des Methanol-Extrakts des Mycels. Hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung zeigte der Ethylacetat-Extrakt des Mediums die größte Übereinstimmung mit dem Rohextrakt. Da die biologische Aktivität aber ebenso in dem etwas weniger komplex zusammengesetztem Dichlormethan-Extrakt des Mediums nachzuweisen war, wurde für die Extraktion der Großanzucht Dichlormethan als Extraktionsmittel ausgewählt.

Die aktive Methanol-Phase von E00/13-33 wurde zunächst durch eine Gradientenfällung aufgetrennt. Hierzu wurde die Phase in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und Wasser angelöst und zentrifugiert. Der Niederschlag bildete die erste Fraktion JH0632A. Der Überstand wurde schrittweise weiter mit Wasser verdünnt. Die resultierenden Methanol-Gehalte lagen zwischen 48 und 25 %. Die Hauptpeaks des Rohextrakts waren in JH0632H vertreten. Darum wurde auch diese nicht aktive Fraktion über eine Sephadex-Säule getrennt. Aus den resultierenden Fraktionen wurden per Kieselgel-Säule ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 92:8$ ) und mittels präparativer HPLC vier Indol-Derivate isoliert. JH0639J und JH0640A' waren die strukturell einfachen Indol-Derivate Indol-3-Carboxaldehyd und Indol-3-Carboxyl. JH0639E war ein Diketopiperazin aus Alanin und Tryptophan und JH0633X war ein komplexes Pyrazinpyranindol vom Leptosin-Typ.

Die aktiven Fraktionen E, F und G wurden vereinigt und per Sephadex-Säule weiter aufgetrennt. Die Aktivität fand sich in den Fraktionen JH0634A', JH0634D, JH0634E und JH0634G. JH0634A' bestand aus einem Gemisch mehrerer Verbindungen und

war aufgrund der geringen Masse für eine weitere Auftrennung nicht geeignet. Ähnliches galt für JH0634D: hier konnten zumindest zwei der Peaks identifiziert werden. Es handelte sich um das bereits aus JH0632H isolierte Indol-3-Carboxaldehyd und Indol-3-Carboxyl. Die Hauptverbindung aus JH0634E war das biologisch aktive Leptosin-Derivat. Darüber hinaus waren im Chromatogramm dieser Fraktion viele Nebenkomponten vertreten, deren Isolierung und Identifizierung aufgrund der geringen Substanzmenge nicht möglich war. Aus der aktiven Fraktion JH0634G ging nach präparativer HPLC JH0634K hervor, bei dem es sich wie bei JH0639E um Cyclo(alanyltryptophyl) handelt.

### **a) Indol-3-carboxaldehyd und Indol-3-carbonsäure**

Für die Strukturaufklärung der Verbindungen JH0639J und JH0640A' standen jeweils das UV-Spektrum, die Molekülmasse und das <sup>1</sup>H-Spektrum zur Verfügung sowie ein COSY-Spektrum von JH0639J.

Die UV-Spektren waren sich sehr ähnlich und dienten so als Hinweis dafür, daß die beiden Substanzen strukturverwandt sind. Das UV-Spektrum von JH0639J wies vier Absorptionsmaxima bei 208, 244, 261 und 297 nm auf. Bei JH0640A' fanden sich nur drei Maxima (213, 228 und 281 nm), dafür lag an Stelle des dritten Absorptionsmaximums eine Schulter bei 249 nm vor.

Auch die Molekulargewichte der beiden Verbindungen lagen mit 145 amu für JH0639J und 161 amu für JH0640A' sehr dicht beieinander und waren nur durch 16 Masseneinheiten voneinander getrennt. In beiden Fällen ließ das ungerade Molekulargewicht das Vorhandensein zumindest eines Stickstoffatoms pro Molekül vermuten.

In den <sup>1</sup>H-Spektren traten die charakteristischen Kopplungspartner für ein ABCD-System eines 1,2-disubstituierten Phenylrings auf, wie es bereits bei der Aufklärung der Anthranilsäuresubstruktur des Cycloaspeptids vorgestellt wurde. Die chemische Verschiebung der Singulets bei 7.70 bzw. 8.27 ppm (H-2) waren ein Hinweis darauf, daß wie im Falle des Cycloaspeptids einer der Substituenten ein Stickstoffatom sein mußte. Bei beiden Verbindungen konnte außerdem ein breiter Peak um 12 ppm als Signal eines heterozyklischen NH-Protons erklärt werden.

**Indol A und B**

Systemat. Namen : Indol-3-carboxaldehyd (A) und Indol-3-carbonsäure (B)

Probencodes : JH0639J (A), JH0640A' (B)

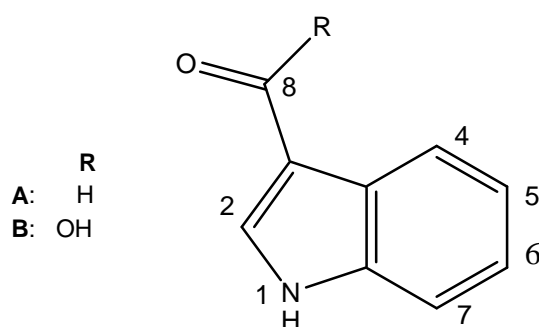
Substanzmenge : 3.5 mg (A), 5.8 mg (B)

Beschreibung : weißes Pulver (A) und (B)

Summenformeln : C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO (A), C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> (B)

Molekulargewicht : 145 (A), 161 (B) g/mol

Quellorganismus : *V. cf. cinnabarinum* aus *I. fasciculata* (E00/13-33), (A) + (B)



Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spectra. 1992

Retentionszeit : 15.9 min.

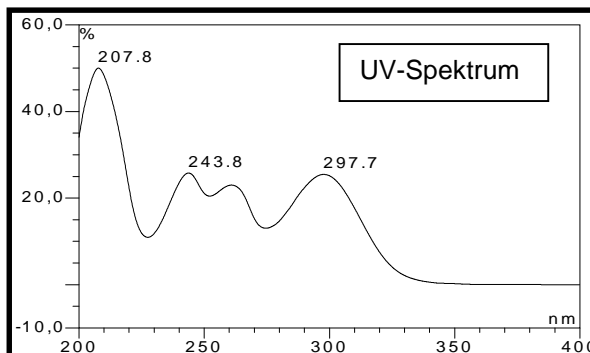
R<sub>f</sub>-Wert : 0.53

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : blaßblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : -

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : hellbraun



Retentionszeit : 15.2 min.

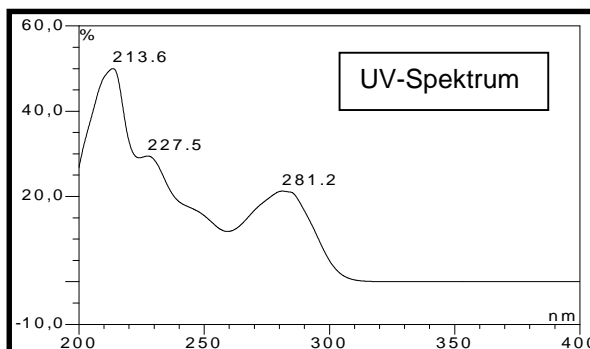
R<sub>f</sub>-Wert : 0.37

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : blaßblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : orange

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : rot



ESI-MS (*m/z*): (A) 146.2 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 144.6 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)

(B) 160.8 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), 162.4 [M-H]<sup>-</sup> (negativ)

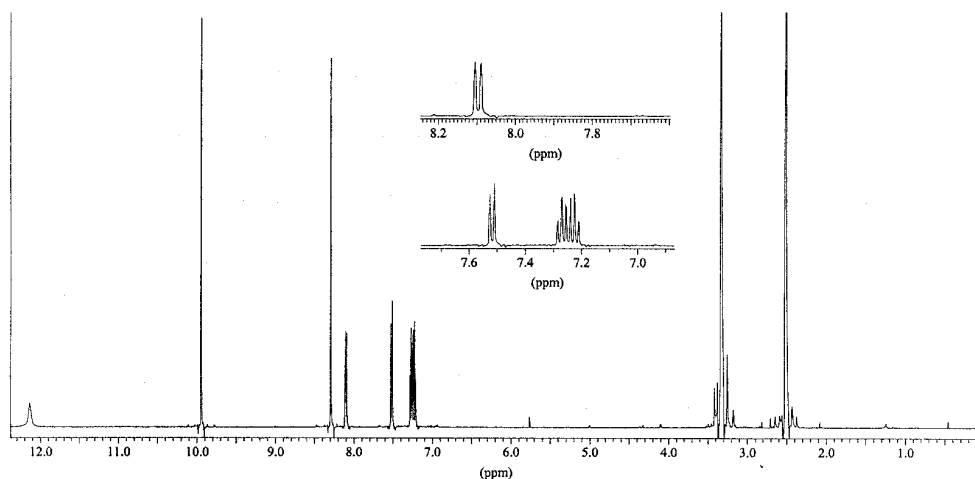
## Ergebnisse

Bei JH0639J konnte das zusätzliche scharfe Singulett bei 9.92 ppm unter Berücksichtigung der noch verbliebenen Differenz zum experimentell ermittelten Molekulargewicht (145 amu) als das Signal eines Aldehydprotons interpretiert werden. Die Struktur war demzufolge ein Indol-3-Carboxaldehyd und konnte durch Vergleich der Daten mit denen aus der Spektrensammlung der „Aldrich Library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR Spectra“ abgesichert werden.

Die Massendifferenz zwischen JH0639J und JH0640A' von 16 Masseneinheiten konnte durch die Oxidation des Aldehyds zur Carbonsäure erklärt werden. Bei JH0640A' handelte es sich folglich um Indol-3-Carbonsäure. Auch hier lieferte der Vergleich der Daten mit denen aus der Spektrensammlung der „Aldrich Library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR Spectra“ die Bestätigung der Struktur.

### NMR-Daten der Indole A und B in DMSO- $d_6$ (500 MHz)

| Pos. | A<br>$^1\text{H}$ (ppm), mult., (J in Hz) | COSY (H $\rightarrow$ H) | B<br>$^1\text{H}$ (ppm), mult., (J in Hz) |
|------|---|--------------------------|---|
| 1    | 12.11 (1H, s, NH)                         |                          | 11.43 (1H, s, NH)                         |
| 2    | 8.27 (1H, s)                              |                          | 7.70 (1H, s)                              |
| 4    | 8.07 (1H, „dd“, 1, 7.6)                   | 5-H                      | 8.14 (1H, d, 7.6)                         |
| 5    | 7.20 (1H, „dt“, 1.3, 6.9)                 | 4-H                      | 7.02 (1H, „dt“, 1.3, 6.9)                 |
| 6    | 7.25 (1H, „dt“, 1.3, 6.9)                 | 7-H                      | 7.05 (1H, „dt“, 1.3, 6.9)                 |
| 7    | 7.50 (1H, „dd“, 1, 8.2)                   | 6-H                      | 7.35 (1H, d, 7.6)                         |
| 8    | 9.92 (1H, s, -CHO)                        |                          |   |



**Abb. E25:**  $^1\text{H}$ -Spektrum von JH0639J mit den charakteristischen Signalen eines in Position 3 substituierten Indols.

**b) Cyclo(alanyltryptophyl)**

Im  $^1\text{H}$ -Spektrum von JH0639E konnten mit Hilfe der bereits besprochenen Indolspektren (Indol-3-carbonsäure, Indol-3-carboxaldehyd) die charakteristischen Signale eines Indols leicht identifiziert werden. Eine Besonderheit bei diesem Indol war, daß das Proton am Heterozyklus nicht so stark entschirmt wurde und statt dessen bei 7.05 ppm und damit im Bereich der Multipletts des 1,2-disubstituierten Phenylrings erschien. Außerdem tauchten eine Reihe von zusätzlichen Signalen auf. Zwei dieser Signale lagen bei 7.89 bzw. 7.99 ppm. Beide wiesen keine CH-direkt-Korrelation auf und waren zu Dubletts aufgespalten ( $J = 1.3$  Hz). Im aliphatischen Bereich fanden sich die Dubletts von Dubletts einer Methylengruppe (3.23 und 3.00 ppm). Neben der geminalen Kopplung von 14.5 Hz korrelierten diese beiden Protonen mit einem Peak bei 4.09 ppm. Ein weiteres Spinsystem bildeten eine Methylgruppe bei 0.41 ppm (d, 6.9 Hz) und ein Proton bei 3.58 (bq, 6.93).

Die  $^{13}\text{C}$ -Daten der Verbindung wurden aus den HMQC- und HMBC-Spektren abgeleitet. Begonnen wurde mit der Zuordnung der Signale des Indolkörpers. Vier Dubletts zwischen 110 und 121 ppm wurden dem 1,2-disubstituierten Phenylring zugeordnet. Die dem Indolstickstoff benachbarten Kohlenstoffatome lagen bei 124.7 (d) und 135.9 (s) ppm. Die restlichen  $^{13}\text{C}$ -Signale des Indols waren bei 108.3 ppm (Position 3) und 127.7 ppm (Position 3a).

Folgende Kohlenstoffsignale konnten darüber hinaus zusätzlich gefunden werden: ein Quartett bei 18.8 ppm, ein Triplett bei 28.7 ppm, zwei aliphatische Dubletts bei 49.3 und 55.3 ppm und zwei Signale für sauerstoffgebundene C-Atome (166.7 und 168.0 ppm).

Ausgehend von den Signalen des Indols wurde die Struktur der Verbindung abgeleitet. Eine zentrale Position nahmen hierbei die Methylenprotonen (H-8') ein. Sie korrelierten im HMBC-Spektrum mit den drei  $^{13}\text{C}$ -Signalen der Positionen 2', 3' und 3a' des Indols. Die Methylengruppe mußte folglich mit dem Kohlenstoffatom in Position 3' des Indols verknüpft sein. Weiterhin wiesen sie im COSY-Spektrum eine Korrelation mit dem Proton bei 4.09 ppm (H-3) auf. Damit mußte der tertiäre

## Ergebnisse

Kohlenstoff bei 55.3 ppm (CH-direkt-Korrelation mit H-3) mit der -CH<sub>2</sub>-Gruppe verknüpft sein.

Die Methylenprotonen und H-3 zeigten außerdem beide im HMBC Kreuzsignale mit einem <sup>13</sup>C-Signal im tiefen Feld bei 166.7 ppm (C-4), daß demzufolge mit dem tertiären Kohlenstoff (C-3) verknüpft sein mußte.

### **Cyclo(alanyltryptophyl)**

Systemat. Name : 3-(1*H*-Indol-3-ylmethyl)-6-methyl-2,5-diketopiperazin

Beschreibung : weißes Pulver

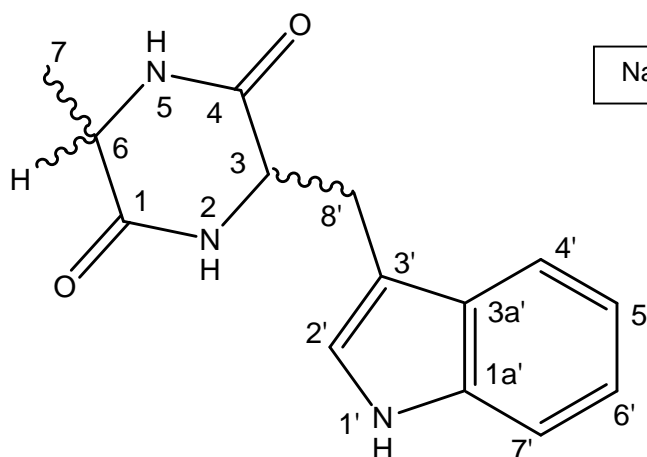
Probencode : JH0639E

Substanzmenge : 2.7 mg

Summenformel : C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molekulargewicht : 257 g/mol

Quellorganismus : *Verticillium cf. cinnabarinum* aus *Ircinia fasciculata* (E00/13-33)



Retentionszeit : 10.9 min.

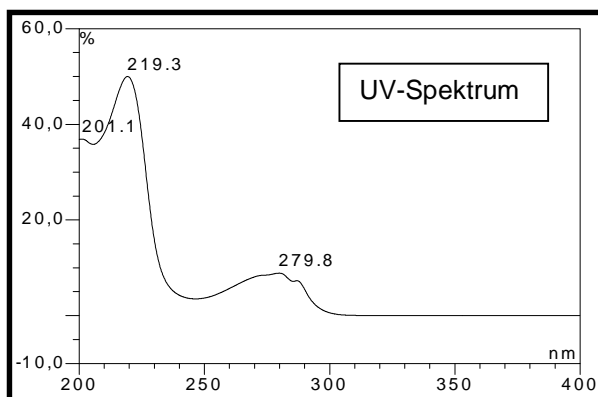
R<sub>f</sub>-Wert : 0.22

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : blaßblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : lila

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : violett



ESI-MS (*m/z*): 258.4 [M+H]<sup>+</sup> (positiv), MS/MS 258@35: *m/z* 130.2,  
257.0 [M-H]<sup>-</sup> (negativ), MS/MS 455@35: *m/z* 127.1

|  |
|--|
| <b>NMR-Daten von Cyclo(alanyltryptophyl) in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)</b> |
|--|

| Pos. | <sup>13</sup> C δ* (ppm) | <sup>1</sup> H δ (ppm), mult., (J in Hz)                    | COSY (H→H)                                      | HMQC (H→C) | HMBC (H→C)                  |
|------|--------------------------|---|---|------------|-----------------------------|
| 1    | 168.0 (s)                |   |   |            |                             |
| 2    |                          | 7.99 (1H, d, 1.3, NH)                                       | 3-H   |            |                             |
| 3    | 55.3 (d)                 | 4.09 (1H, bs)   | 2-H, 6-H, 8'-H <sub>A</sub> , 8'-H <sub>B</sub> | C-3        | C-4, C-3'                   |
| 4    | 166.7 (s)                |   |   |            |                             |
| 5    |                          | 7.89 (1H, d, 1.3, NH)                                       | 6-H   |            |                             |
| 6    | 49.3 (d)                 | 3.58 (1H, bq, 6.9)  | 3-H, 5-H, 7-H                                   | C-6        | C-1, C-7                    |
| 7    | 18.8 (q)                 | 0.41 (3H, d, 6.9, CH <sub>3</sub> )                         | 6-H   | C-7        | C-6                         |
| 1'   |                          | 10.88 (1H, s, NH)   | 2'-H  |            | C-1, C-3, C-3a'             |
| 1'a  | 135.9 (s)                |   |   |            |                             |
| 2'   | 124.7 (d)                | 7.05 (1H, m)  | 1'-H, 8'-H <sub>A</sub> , 8'-H <sub>B</sub>     | C-2'       | C-1'a, C-3'                 |
| 3'   | 108.3 (s)                |   |   |            |                             |
| 3'a  | 127.7 (s)                |   |   |            |                             |
| 4'   | 118.9 (d)                | 7.55 (1H, d, 7.6)   | 5'-H, 7'-H                                      | C-4'       | C-1'a, C-3', C-6'           |
| 5'   | 118.2 (d)                | 6.90 (1H, m)  | 4'-H  | C-5'       | C-3a', C-7'                 |
| 6'   | 121.1 (d)                | 7.05 (1H, m)  | 7'-H  | C-6'       | C-4'                        |
| 7'   | 110.7 (d)                | 7.29 (1H, d, 8.1)   | 4'-H, 6'-H                                      | C-7'       | C-3a', C-5'                 |
| 8'   | 28.7 (t)                 | 3.23 (1H, dd, 4.1, 14.5, -CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -) | 3-H, 2'-H, 8'-H <sub>B</sub>                    | C-8'       | C-3, C-2', C-3a'            |
|      |                          | 3.00 (1H, dd, 4.4, 14.5, -CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> -) | 3-H, 2'-H, 8'-H <sub>A</sub>                    | C-8'       | C-3, C-4, C-2', C-3', C-3'a |

\* Die <sup>13</sup>C-Daten wurden aus den HMQC- und HMBC-Spektren abgeleitet.

Im COSY-Spektrum korrelierte H-3 mit einem der heteroatomgebundenen Protonen (NH-2: 7.99 ppm, d, 1.3 Hz). Die Kopplungskonstante sowie die chemische Verschiebung sprach dafür, daß es sich hierbei nicht um das Signal einer Hydroxygruppe eines sekundären Alkohols handelte (zum Vergleich:  $J = 8.8$  Hz bei Pyranopyrrol A) sondern dafür, daß in dieser Position eine NH-Gruppe vorlag. Auf diese Weise wurde eine Tryptophan-Substruktur für JH0639E nachgewiesen.



Die Alanin-Substruktur ergab sich aus der im COSY-Spektrum beobachteten Kopplung der verbliebenen Methylgruppe bei 0.41 ppm (H<sub>3</sub>-7) mit einem Proton bei 3.58 ppm (H-6) mit einer Kopplungskonstante von 6.9 Hz. Besonders auffällig war hierbei die wie im Alanin des Cycloaspeptids vorliegende extreme Hochfeldverschiebung der Methylprotonen. Auch die Elemente dieser Substruktur korrelierten mit einem heteroatomgebundenen Proton (NH-5: 7.89 ppm, d, 1.3 Hz) und einem sauerstoffgebundenem Kohlenstoff (C-1 bei 168.0 ppm). Diese Information und die chemische Verschiebung der Methylgruppe ließen den Schluß zu, daß es sich bei der zweiten Substruktur um zyklisch eingebundenes Alanin handelte.

Das Ergebnis der Massenbestimmung per HPLC-MS (M = 257) belegte, daß beide Aminosäuren in Form eines zyklischen Dipeptids verknüpft waren und somit ein Diketopiperazin aus Alanin und Tryptophan vorlag. Cyclo(alanyltryptophyl) ist in allen Kombinationsmöglichkeiten aus D- bzw. L-Alanin und D- bzw. L-Tryptophan bekannt [Chapman and Hall, 2002]. Die erste Verbindung dieser Art wurde 1967 von Nakashima isoliert [Nakashima *et al.*, 1967].

### **c) Leptosin-Derivat**

Im <sup>1</sup>H-Spektrum von JH0633X ließen sich mit Hilfe der Erfahrungen aus der Strukturaufklärung der Indole (Indol-3-carbonsäure, Indol-3-carboxaldehyd, Cyclo(alanyltryptophyl) schnell die für diese Stoffgruppe charakteristischen Signale identifizieren. Erschwert wurde die Zuordnung allerdings durch zusammenfallende Signale von zwei Indoleinheiten.

Durch eingehende Analyse der 1D- und 2D-NMR-Daten konnten die Signale eines in Position 3 substituierten Indols ausfindig gemacht werden, während die zweite Indoleinheit offensichtlich in den Positionen 2 und 3 substituiert vorlag, da das Signal für die NH-Gruppe hier bei 7.03 ppm (H-6), das für das benachbarte Proton im Heterozyklus bei 6.27 ppm (H-5a) lag. Zusätzlich tauchten zwischen 2 und 3 ppm Signale für drei Methylgruppen auf (2 x -CH<sub>3</sub>, 1 x N-CH<sub>3</sub>), zwei Dubletts von Dubletts bei ca. 4 ppm, ein Dublett bei 5 ppm und zwei Signale ohne CH-direkt-Korrelation bei 5.25 („t“) und 5.48 (d) ppm. Die vier Singulett (125 - 150 ppm) und neun Dubletts (108 - 123 ppm) im aromatischen Bereich des <sup>13</sup>C-Spektrums von JH0633X wurden

den zwei 1,2-disubstituierten Phenylringen und dem C-Atom in Position 2 eines der Indole zugeordnet. Weitere Kohlenstoffsignale lagen im Bereich zwischen 10 und 30 ppm (2 x -CH<sub>3</sub>, 1 x N-CH<sub>3</sub>), bei 60 ppm (1 x s, 1 x t), bei 70 ppm (2 x s), bei 80 ppm (2 x d) und bei 164 ppm (2 x s).

### Leptosin-Derivat

Systemat. Name :

11-Hydroxy-3-hydroxymethyl-10b-(1*H*-indol-3-yl)-2-methyl-3,11a-bis-methylsulfanyl-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-5a*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4-dion

Beschreibung : weißes Pulver

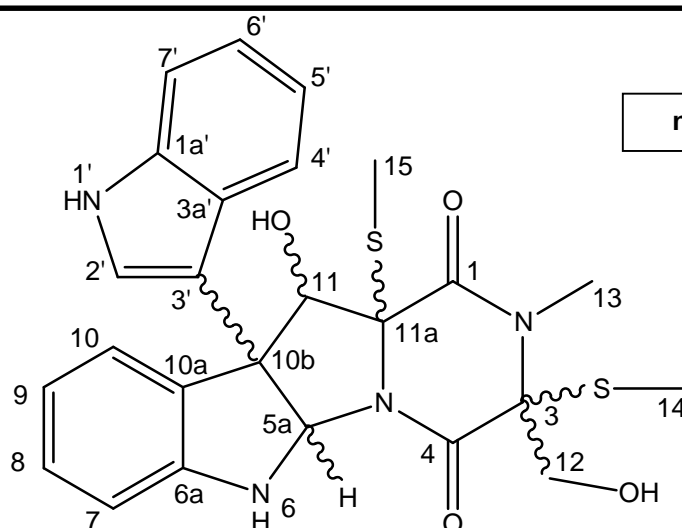
Probencode : JH0633X

Substanzmenge : 7.1 mg

Summenformel : C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

Molekulargewicht : 510 g/mol

Quellorganismus : *Verticillium cf. cinnabarinum* aus *Ircinia fasciculata* (E00/13-33)



Retentionszeit : 22.6 min.

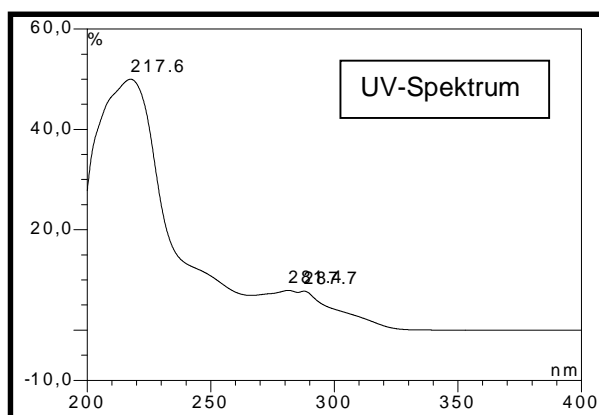
R<sub>f</sub>-Wert : 0.48

Fluoreszenzlösch. (254nm) : +

Eigenfluoreszenz (366nm) : blaßblau

+ Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : graubraun

+ Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : dunkelbraun



ESI-MS (*m/z*): 533.6 [M+Na]<sup>+</sup> (positiv)

## Ergebnisse

NMR-Daten des Leptosin-Derivats in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)

| Pos. | <sup>13</sup> C δ* (ppm) | <sup>1</sup> H δ* (ppm), mult., (J in Hz)                   | COSY (H→H)                            | HMQC (H→C) | HMBC* (H→C)            |
|------|--------------------------|---|---------------------------------------|------------|------------------------|
| 1    | 164.7 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 3    | 71.5 (s)                 |   |                                       |            |                        |
| 4    | 162.9 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 5a   | 81.0 (d)                 | 6.27 (1H, d, 1.3)   | 6-H                                   | C-5a       | C-3', -10a, -10b       |
| 6    |                          | 7.03 (1H, d, 1.3, NH)                                       | 5a-H                                  |            | C-5a, -6a, -10a, -10b  |
| 6a   | 149.3 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 7    | 108.1 (d)                | 6.46 (1H, d, 8.2)   | 8-H                                   | C-7        | C-6a, -9, -10a         |
| 8    | 127.6 (d)                | 6.89 (1H, dt, 1.3, 7.6)                                     | 7-, 9-, 10-H                          | C-8        | C-6a, -10              |
| 9    | 116.7 (d)                | 6.49 (1H, t, 7.6)   | 8-, 10-H                              | C-9        | C-7                    |
| 10   | 122.6 (d)                | 7.27 (1H, d, 7.5)   | 8-, 9-H                               | C-10       | C-6a, -8, -10b         |
| 10a  | 132.7 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 10b  | 58.9 (s)                 |   |                                       |            |                        |
| 11   | 79.3 (d)                 | 5.07 (1H, d, 6.9)   | 11-OH                                 | C-11       | C-5a, -10a,            |
|      |                          | 5.48 (1H, d, 6.9, OH)                                       | 11-H                                  |            | C-10b, -11, -11b       |
| 11a  | 72.0 (s)                 |   |                                       |            |                        |
| 12   | 62.8 (t)                 | 3.69 (1H, dd, 6.3, 11.4, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> OH) | 12-H <sub>B</sub> und -OH             | C-12       | C-3, -4                |
|      |                          | 4.20 (1H, dd, 5.4, 11.4, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> OH) | 12-H <sub>A</sub> und -OH             | C-12       | C-4                    |
|      |                          | 5.26 (1H, „t“, 6.0, CH <sub>A</sub> H <sub>B</sub> OH)      | 12-H <sub>A</sub> und -H <sub>B</sub> |            | C-3, -12               |
| 13   | 27.9 (q)                 | 2.96 (3H, s, NCH <sub>3</sub> )                             |                                       | C-13       | C-1, -3                |
| 14   | 12.8 (q)                 | 2.21 (3H, s, SCH <sub>3</sub> )                             |                                       | C-14       | C-3                    |
| 15   | 15.4 (q)                 | 2.00 (3H, s, SCH <sub>3</sub> )                             |                                       | C-15       | C-11a                  |
| 1'   |                          | 10.84 (1H, d, 1.9, NH)                                      | 2'-H                                  |            | C-1a', -2', -3', -3a'  |
| 1a'  | 136.6 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 2'   | 123.0 (d)                | 7.07 (1H, d, 2.5)   | 1'-H                                  | C-2'       | C-1a', -3', -3a', -10b |
| 3'   | 115.7 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 3a'  | 126.1 (s)                |   |                                       |            |                        |
| 4'   | 121.3 (d)                | 7.78 (1H, d, 8.2)   | 5'-, 6'-, 7'-H                        | C-4'       | C-1a', -3', -3a', -6'  |
| 5'   | 118.4 (d)                | 6.91 (1H, t, 5.0)   | 4'-, 6'-, 7'-H                        | C-5'       | C-3a', -7'             |
| 6'   | 120.6 (d)                | 7.00 (1H, t, 7.6)   | 4'-, 5'-, 7'-H                        | C-6'       | C-1a', -4', -7'        |
| 7'   | 111.2 (d)                | 7.27 (1H, d, 7.5)   | 4'-, 5'-, 6'-H                        | C-7'       | C-3a', -5', -6'        |

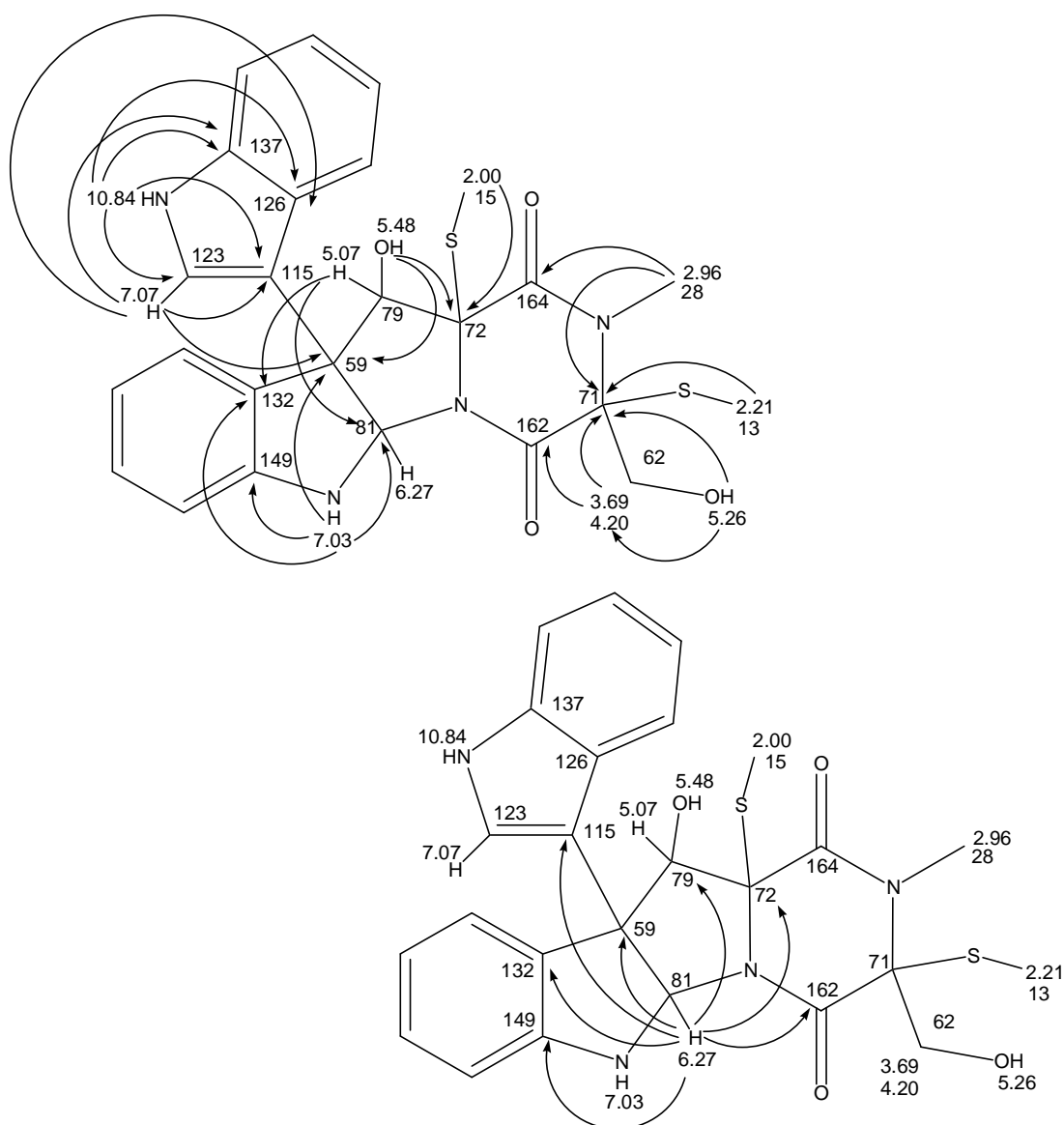
Ausgehend von der NH-Gruppe (H-6) des disubstituierten Indols wurde anhand der Daten aus den 2D-NMR-Spektren die Struktur von JH0633X aufgeklärt. Hierbei spielten auch die 2D-Korrelationen von H-5a eine zentrale Rolle (**Abb. E26**). Beide Signale erschienen als Dublett ( $J = 1.3$  Hz), wiesen ein COSY-Kreuzsignal auf und waren demzufolge direkt benachbart.

Im HMBC-Spektrum korrelierte H-6 mit den Signalen der C-Atome in Position 6a (149.3 ppm) und 10a (132.7 ppm). Diese konnten über ihre HMBC-Korrelationen mit den Protonen des ABCD-Systems dem Phenylring zugeordnet werden. Des weiteren korrelierte H-6 wie zu erwarten mit dem Signal von C-5a (tertiäres C-Atom bei 81.0 ppm) und außerdem mit einem quartären C-Atom bei 58.9 ppm (C-10b). Dieses Kohlenstoffatom wiederum wurde durch seine Korrelation mit H-10 im ABCD-Spinsystem als das letzte Glied im Fünfring des disubstituierten Indols identifiziert. Der vierte Substituent in dieser Position war die monosubstituierte Indoleinheit und dies konnte durch ein *long-range*-Kreuzsignal von C-10b und H-2' nachgewiesen werden.

Mit einem Dublett bei 79 ppm und zwei Protonen bei 5.07 (H-11) und 5.48 ppm (11-OH), die eine Kopplungskonstante von 6.9 Hz gemeinsam hatten und von denen das tiefer liegende Signal keine CH-direkt-Korrelation aufwies, lagen die für einen sekundären Alkohol typischen Signale vor (zum Vergleich: Pyranopyrrol A). Aufgrund der Kreuzsignale von H-11 mit C-10a und C-10b mußte diese Gruppe mit C-10b verknüpft sein. Darüber hinaus korrelierte das Signal der Hydroxyfunktion mit einem quartären Kohlenstoff bei 72.9 ppm (C-11a) der seinerseits ein Kreuzsignal mit dem Proton in Position 5a aufwies. C-5a war mit 81 ppm sehr stark ins tiefe Feld verschoben und die Nachbarschaft des Indolstickstoffs reichte als Erklärung hierfür nicht aus (zum Vergleich: C-7' des Benzylpyridins A bei 60.7 ppm). Daher wurde angenommen, daß dieses C-Atom mit einem weiteren Heteroatom verknüpft war. Die Korrelation von C11-a und H-5a belegte, daß dieses Heteroatom Teil eines zweiten, mit dem disubstituierten Indol verknüpften Fünfrings war. Da es noch ein weiteres Kreuzsignal für H-5a mit einem C-Atom bei 162.9 ppm (C-4) gab, konnte es sich bei diesem Heteroatom nur um einen Amid-Stickstoff handeln.

## Ergebnisse

C-4 wiederum wies Korrelationen mit Methylenprotonen bei 3.69 und 4.20 auf. Die hohe chemische Verschiebung dieser Signale und des entsprechenden Methylen-Kohlenstoffatoms bei 62.8 ppm (C-12) ließen sich durch die starke Entschirmung durch eine benachbarte Hydroxygruppe erklären (5.26 ppm, Pseudotriplett, keine CH-direkt-Korrelation). Das Hydroxyproton korrelierte mit einem C-Atom bei 71.5 ppm (C-3), das seinerseits *long-range*-Korrelationen zu zwei Methylgruppen aufwies. Während H<sub>3</sub>-13 aufgrund der chemischen Verschiebung von 2.96 ppm offensichtlich eine N-Methylgruppe war, blieb die Natur der zweiten Methylgruppe H<sub>3</sub>-14 bei 2.21 ppm zunächst ungeklärt. Dennoch war an dieser Stelle klar, daß es sich bei dieser Substruktur um ein Derivat des N-Methylserins handelte.



**Abb. E26:** 2-D-NMR-Daten von JH0633X, die essentiell für die Strukturaufklärung der Verbindung waren.

H<sub>3</sub>-13 korrelierte zusätzlich mit einem Carbonylkohlenstoff bei 164.7 ppm (C-1). Auf diese Weise war eine weitere Amidbindung im Molekül nachgewiesen und es wurde angenommen, daß wie bei Cyclo(alanyltryptophyl) ein Diketopiperazin vorliegt (Verknüpfung von C-1 mit C-11a). Eine Substrukturensuche im „Dictionary of Natural Products“ [Chapman and Hall, 2002] nach einem in Position 10b mit Indol substituierten Pyrazinopyrroloindols lieferte Treffer aus der Gruppe der Leptosine [Takahashi, *et al.*, 1994].

Die letzte verbliebene Korrelation war die einer weiteren Methylgruppe (H<sub>3</sub>-15 bei 2.00 ppm) mit C-11a. Wie bei H<sub>3</sub>-14 fiel auf, daß die jeweiligen Methylprotonen nur eine CH-*long-range*-Korrelation aufwiesen. Der Grund hierfür war, daß es sich in beiden Fällen um S-Methylgruppen handelte, die nur eine <sup>3</sup>J-Korrelation haben können. Die meisten Leptosine haben zwischen den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen des Diketopiperazinteils eine Di-, Tri- oder Tetrasulfidbrücke ausgebildet. In manchen Fällen liegt in  $\alpha$ -Position auch eine S-Methylierung vor [Takahashi, *et al.*, 1994]. Durch Vergleich mit der in der Literatur hierfür beschriebenen chemischen Verschiebung der S-Me-Signale konnte festgestellt werden, daß dies auch bei JH0633X der Fall war. Die Summenformel von C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> entsprach damit auch dem experimentell ermittelten Molekulargewicht von 510 amu und bei JH0633X handelte es sich demzufolge um ein neues monomeres Leptosin-Derivat.

### 3.3.3. Ergebnisse der Biotests mit Reinsubstanzen

Soweit genügend Substanz vorhanden war wurden die isolierten Reinsubstanzen in möglichst allen vier im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Testsystemen untersucht. Hierbei wurden z.T. auch die bereits aus der Literatur bekannten Verbindungen getestet. Dies geschah zum einen, weil in den bisherigen Veröffentlichungen teilweise keine oder nur wenige Informationen über die biologische Aktivität der Substanzen zu finden waren, zum anderen dienten die als bioaktiv bekannten Verbindungen als Positiv-Kontrolle.

#### 3.3.3.1. Reinsubstanzen im Agarplatten-Diffusionstest

Im Agarplattendiffusionstest wurden alle Verbindungen bis auf das Pyranopyrrol D (zu wenig Substanz) untersucht.

Getestet wurde in Dosen von 50 und 100 µg pro Disc gegen folgende Teststämme: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae*. Leider waren weder die bekannten Verbindungen noch die neuen Naturstoffe in diesem Assay aktiv.

Bei den Positiv-Kontrollen Penicillin, Streptomycin und Gentamycin sowie Nistatin waren in den Tests gegen die jeweiligen Organismen bei einer Dosis von 5 µg / disc deutliche Hemmhöfe auf den Platten zu erkennen.

#### 3.3.3.2. Reinsubstanzen im Fraßversuch mit *Spodoptera littoralis*

Wegen der großen Substanzmenge, die für die Fraßversuche mit *S. littoralis* nötig ist (600 µg bei Konzentrationen von 50 und 100 ppm pro Futterstück), wurden nur das Cycloaspeptid, das Pyranopyrrol A, das Biscumarin-Derivat, das Cycloleucomelon und das Phenyllessigsäureamid in die Untersuchungen mit diesem Testsystem integriert.

Außer dem Pyranopyrrol fiel keine der Verbindungen durch eine Aktivität auf; auch nicht das Cycloleucomelon, für das als Pigment von Ständerpilzen sicherlich auch eine fraßhemmende Wirkung auf Insekten ökologisch sinnvoll für den Pilz wäre.

Das Pyranopyrrol A hemmt in der höchsten Konzentration die Überlebensrate zwar nur schwach (ÜR = 85%). Aber die Wachstumsrate ist bei 100 ppm Pyranopyrrol A im Futterstück mit 29 % im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert. Die Verbindung wirkt damit wachstumshemmend im Fraßversuch mit den frisch geschlüpften Raupen von *S. littoralis*.

### 3.3.3.3. Reinsubstanzen im *brine shrimp* assay

Im *brine shrimp* assay wurden alle Verbindungen bis auf das Pyranopyrrol D in Konzentrationen von 10 und 100 ppm gegen die Nauplien von *Artemia salina* getestet. Insgesamt drei der isolierten Reinsubstanzen zeigten in diesem Test eine Wirkung:

Cycloaspeptid: Aufgrund der Ergebnisse der Dosis-Wirkungsexperimente mit dem Extrakt von E99-1/95 wurde von einer relativ starken Wirkung des Cycloaspeptids ausgegangen. Die eingesetzten Konzentrationen wurden deshalb auf 10 und 25 ppm festgelegt. In beiden Konzentrationen war eine Wirkung der Verbindung erkennbar. Bei 10 ppm überlebten noch zwölf von 20 Nauplien (60 %). Bei 25 ppm lag die Überlebensrate der Nauplien nach 24 Stunden nur bei 38 %. Damit war das Cycloaspeptid als eines der wirksamen Prinzipien des Extrakts von E99-1/95 identifiziert. Zur näheren Charakterisierung der biologischen Aktivität wurde die Verbindung auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht (siehe unten).

Citrinin: Bei 10 ppm Citrinin im Testsystem war lediglich eine Verhaltensänderung der Artemien feststellbar. Die positiv phototaktische Bewegung der Tiere war gestört und die Beweglichkeit insgesamt stark eingeschränkt. Bei Erhöhung der Konzentration auf 100 ppm konnte auch eine letale Wirkung festgestellt werden. Von 20 eingesetzten Nauplien waren nach 24 Stunden nur noch 11 am Leben und die Überlebensrate bei dieser Konzentration lag damit bei nur knapp über 50 %.

Durch die Aktivität des Citrinins konnte auch die Aktivität des Rohextrakts von E99-1/7 gegen *A. salina* erklärt werden.



Leptosin-Derivat: Auch beim Leptosin-Derivat war bei niedriger Konzentration (10 ppm) keine letale Wirkung feststellbar und in dieser Dosierung konnte nur eine Änderung des Verhaltens der Nauplien, wie der Testung des Citrinin beschrieben wurden, beobachtet werden. Bei 100 ppm war das Leptosin-Derivat dem Citrinin dann in der Wirkung sogar überlegen. Nur fünf von 20 Nauplien überlebten nach 24 Stunden (ÜR = 25 %).

Auch hier wurde zur näheren Charakterisierung der biologischen Aktivität die Verbindung auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht.

#### **3.3.3.4. Reinsubstanzen im Zytotoxizitätstest**

In den Assays zur Bestimmung des zytotoxischen Potentials der isolierten Reinsubstanzen wurden die bekannten Verbindungen Cycloaspeptid A, Cycloleucomelon und Citrinin sowie die neuen Naturstoffe Pyranopyrrol A, Biscumarin-Derivat, Phenyllessigsäureamid, Leptosin-Derivat und die Benzylpyridine getestet.

Von Cycloaspeptid A und Cycloleucomelon waren keine Zytotoxizitätsdaten aus der Literatur bekannt und Citrinin diente als positive Kontrolle. Da das Leptosin-Derivat erst in den letzten Wochen der Labortätigkeiten im Rahmen dieser Arbeit isoliert worden war, lagen die Ergebnisse der Testung auf Zytotoxizität zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit leider noch nicht vor.

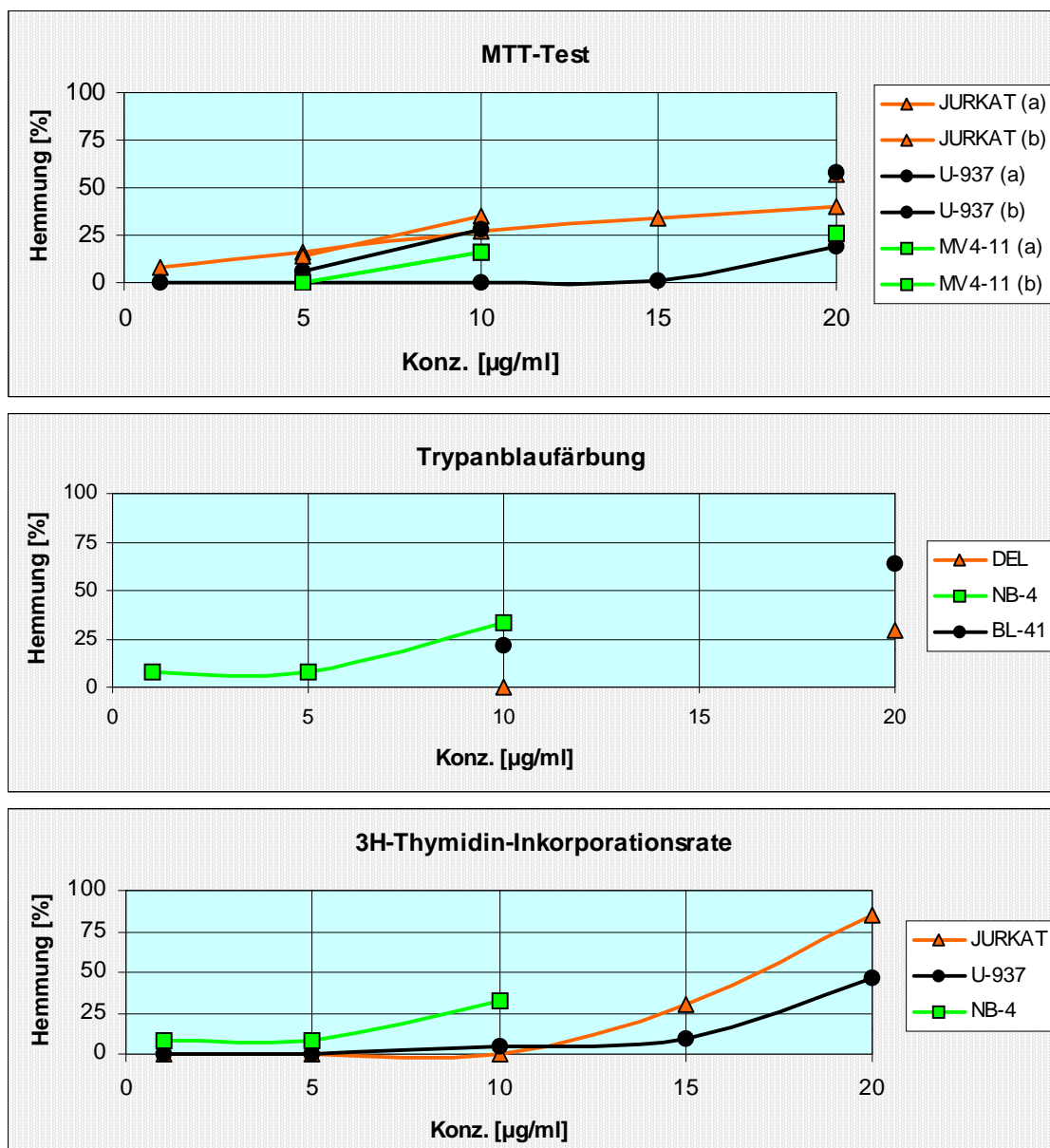
Während Cycloleucomelon, Pyranopyrrol A und das Phenyllessigsäureamid gegen keine der eingesetzten Testlinien aktiv waren zeigten die beiden Benzylpyridine bei der höchsten Konzentration von 50 µg/ml zumindest eine sehr geringe Aktivität von 5 - 15 % Hemmung.

Citrinin: Die Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit Citrinin lieferte IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 20 und 30 µg/ml. Hierbei wurde zum Teil das MTT-Assay eingesetzt, zum Teil nach Trypanblaufärbung direkt ausgezählt (nach 24, 48 und 72 Stunden).

Biscumarin-Derivat: Das Biscumarin-Derivat wies gegen verschiedene Zelllinien aus humanen Leukämien (z.B. JURKAT, U-937, MV4-11) eine moderate antiproliferative Aktivität zwischen 10 und 20 µg/ml auf, wobei die Wirkung erst ab mindestens 24

## Ergebnisse

Stunden Inkubationszeit feststellbar war. In zwei Testserien mit JURKAT-Zellen stieg die Inhibition langsam von 8 % bei 1  $\mu\text{g/ml}$  auf bis zu 40 % bei 20  $\mu\text{g/ml}$  an (ausgewertet nach 48 h). In einer zweiten Testreihe lag die Hemmung bei 20  $\mu\text{g/ml}$  sogar bei 57 % (**Abb. E27**).

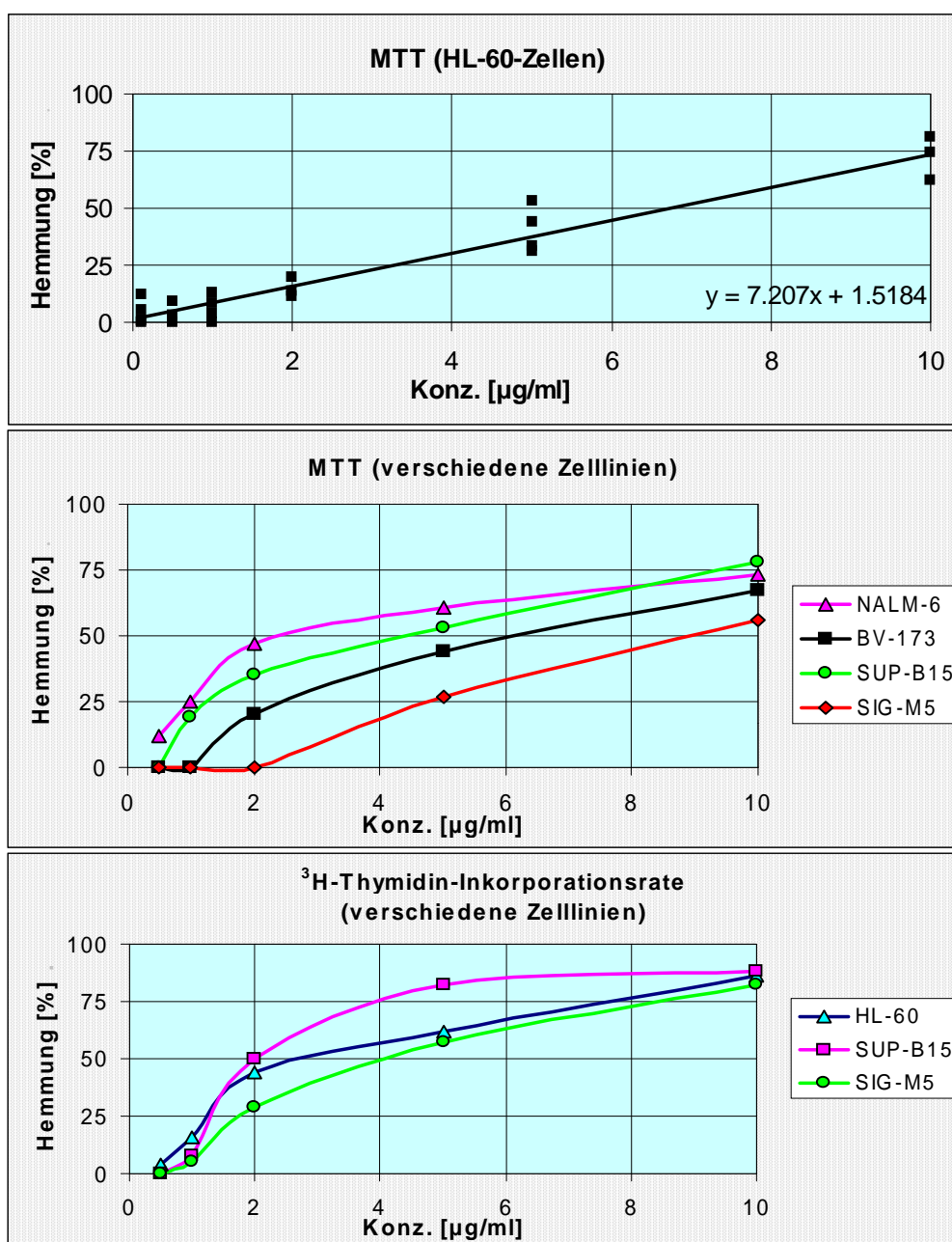


**Abb. E27:** Ergebnisse der Testung des Biscumarin-Derivats auf Zytotoxizität mit verschiedenen Zelllinien nach 48 Stunden.

Die Inkorporationsrate von radioaktiv markiertem Thymidin wurde durch die Behandlung der Zellen mit dem Biscumarin-Derivat in Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  zunächst nicht gehemmt, die Hemmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation

## Ergebnisse

stieg dann erst bei 15 µg/ml auf 30 % und schließlich bei 20 µg/ml auf 85 % an. Da über alle getesteten Konzentrationen hinweg von den Zellen Thymidin aufgenommen wurde und da sich die Inkorporationsrate erst bei hohen Konzentrationen verringerte, konnte davon ausgegangen werden, daß die <sup>3</sup>H-Thymidin-Aufnahme mit der Abnahme der Zellzahl korrelierte. Die Verbindung wirkt damit eher zytotoxisch als zytostatisch.



**Abb. E28:** Ergebnisse der Testung des Cycloaspeptids auf Zytotoxizität (nach 48 h).

Cycloaspeptid: Im MTT-Assay mit verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien (NALM-6, BV-173, SUP-B15, SIG-M5 und HL-60) lag die halbmaximale Hemmkonzentration des Cycloaspeptids nach 48 Stunden abhängig von der Zellart zwischen 2 und 9 µg/ml (**Abb. E28**).

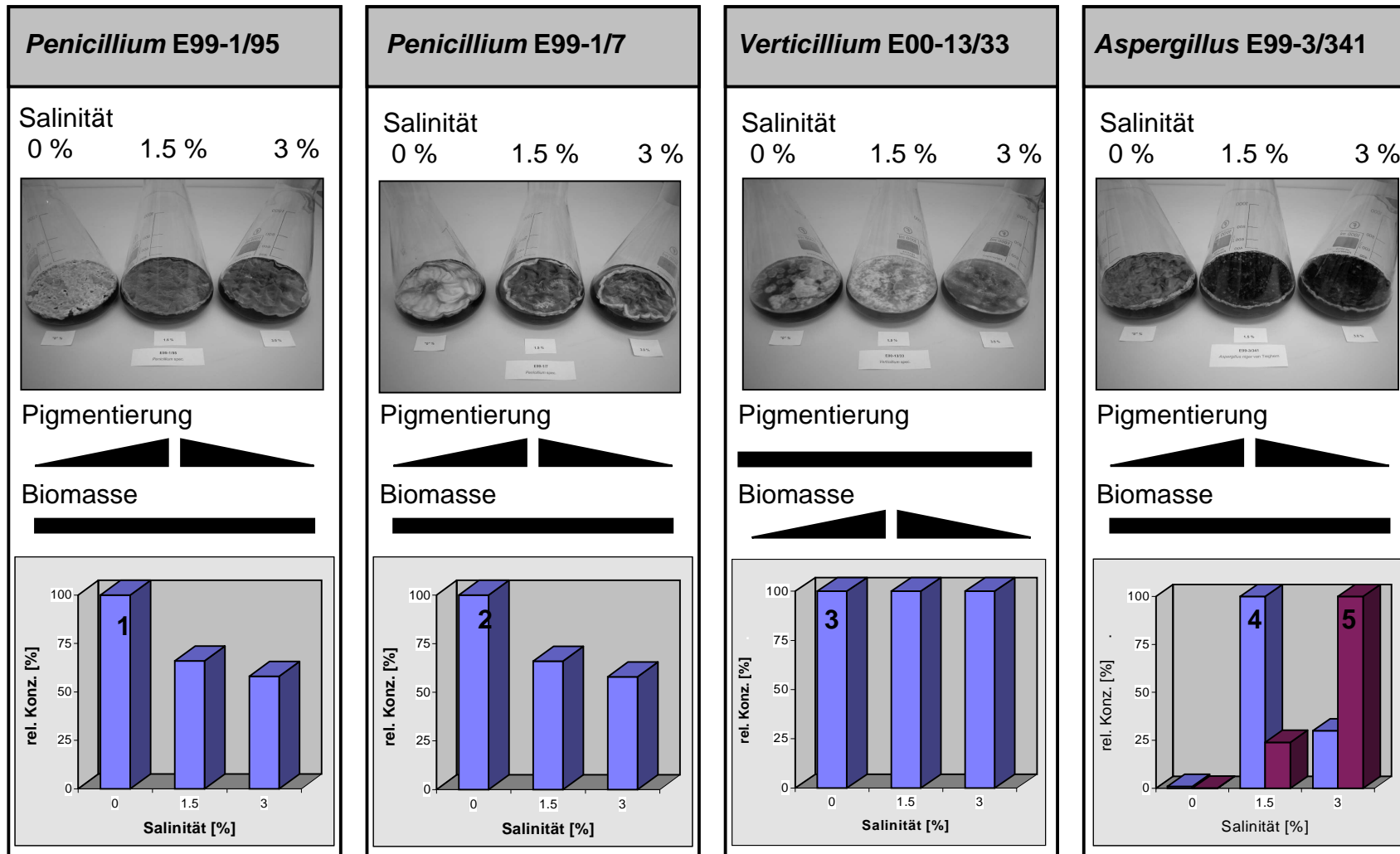
Für HL-60-Zellen wurden parallel vier Testreihen angesetzt. Aus den auf diese Weise ermittelten Datenpunkten wurde graphisch ein IC<sub>50</sub>-Wert von 6.7 µg/ml für das Cycloaspeptid ermittelt (**Abb. E28**).

Die Aufnahme von radioaktivem Thymidin durch HL-60-Zellen wurde bei einer Konzentration von 2 µg/ml mit 44 % stärker gehemmt als die Proliferation der Zellen (16%). Auch im weiteren Verlauf der Kurve war die Hemmung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation immer deutlich stärker als die Hemmung der Zellteilung. Dies traf auch für zwei weitere in diesem Zusammenhang untersuchte Zelllinien zu (SUP-B15 und SIG-M5), (**Abb. E28**). Diese Daten sprechen dafür, daß die Zellzahl in Abhängigkeit von der Aufnahmerate für Thymidin abnimmt. Es scheint, daß der hemmende Effekt des Cycloaspeptids auf die getesteten Zelllinien eher auf der Beeinflussung der Nukleinsäuren-Synthese beruht, als auf einer direkt toxischen Wirkung.

#### 3.3.4. Salinitätstests

Um zu überprüfen, inwieweit verschiedene Konzentrationen von Meersalz im Medium einen Einfluß auf die Kulturen der verschiedenen Pilzstämme haben wurden Salinitätstests durchgeführt (siehe auch 2.1.5.). Zur Auswertung wurden die Kulturen nach sechs Tagen zunächst optisch beurteilt. Nachdem anschließend die Biomasse (Abtropfgewicht) bestimmt worden war, wurden Mycel und Kulturbrühe der jeweiligen Anzucht extrahiert und die Extrakte untereinander verglichen.

Optische Beurteilung: Hierzu wurden die Kulturen mit verschiedenen Salzkonzentrationen unter den Aspekten Pigmentierung und Habitus miteinander verglichen. Die Pigmentierung war bei drei der vier untersuchten Pilzstämme bei den erhöhten Salzkonzentrationen stärker ausgeprägt, wobei die intensivste Färbung bei 1.5 % Salinität zu liegen schien. Nur bei den *Verticillium*-Kulturen konnte kein Unterschied in der Pigmentierung der Kulturen festgestellt werden (**Abb. E29**).



**Abb. E29:** Standkulturen von Pilzstämmen, die bei drei verschiedenen Konzentrationen von Meersalz im Medium angezogen wurden (1 = Cycloaspeptid, 2 = Citrinin, 3 = Indol-Derivate, 4 = Biscumarin-Derivat, 5 = Pyranopyrrole)

Der Habitus der *Penicillium*-Stämme veränderte sich mit zunehmender Salzkonzentration dahin gehend, daß sich das Mycel immer stärker aufwölbte und Falten warf. Bei den anderen Pilzstämmen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Biomasse: Bei drei der vier untersuchten Pilzstämmen hatte die Salzkonzentration des Mediums offensichtlich keinen Einfluß auf die produzierte Biomasse. Das Abtropfgewicht unterschied sich nicht signifikant. Bei der *Verticillium*-Kultur war die Biomasse bei der Salinitätsstufe 1.5 % am höchsten und das Abtropfgewicht war hier um 20 % größer als das der Mycelien, die bei den anderen Konzentrationen angezogen worden waren.

Sekundärmetabolite: Zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Unterschiede der Extrakte wurden jeweils nach semiquantitativen Kriterien HPLC-Proben hergestellt. Die qualitative Zuordnung wurde anhand der Retentionszeiten und UV-Spektren vorgenommen. Zur quantitativen Bestimmung wurden die Peakflächen miteinander verglichen.

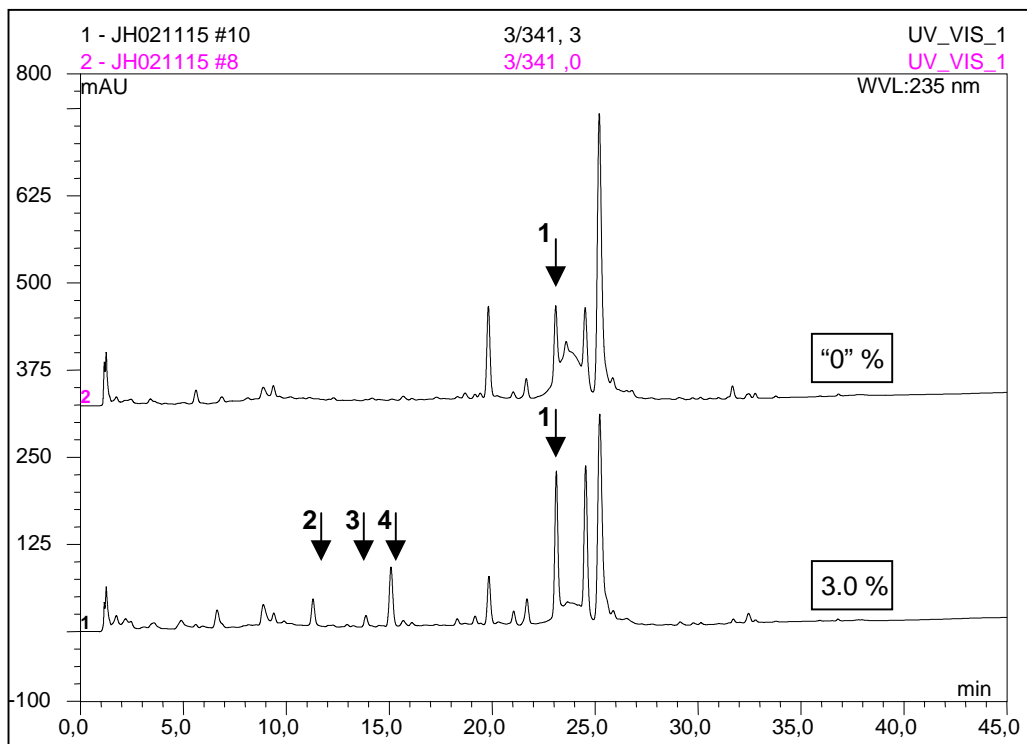
Bei den Extrakten der *Verticillium*-Kultur fiel auf, daß ein Peak einer nicht näher charakterisierten Komponente bei den beiden niedrigen Salzkonzentrationen intensiver war. Ein Einfluß der Salzkonzentration auf die Bildung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Substanzen konnte nicht festgestellt werden.

Ebenfalls ein quantitativer Unterschied der Extrakte konnte bei der *Penicillium*-Kultur E99-1/7 nachgewiesen werden. Das von diesem Stamm gebildete Citrinin lag bei der niedrigsten Salinitätsstufe in höchster Konzentration vor. Der auf diese Konzentration bezogene relative Gehalt war für die mittlere Salzstufe 75 % und bei der höchsten Salzstufe nur noch 62 %.

Ähnlich verhielt es sich beim Cycloaspeptid aus dem *Penicillium*-Stamm E99-1/95. Im Medium ohne zusätzliches Meersalz wurde am meisten Cycloaspeptid gebildet, bei der nächsten Salinitätsstufe noch 2/3 davon und bei der höchsten Salzkonzentration nur noch halb so viel.

Besonders interessant war der Einfluß der Salzkonzentration im Medium auf die chemische Komposition der Extrakte der *Aspergillus*-Kulturen. Hier war der Gehalt an Biscumarin-Derivat bei der mittleren Salzkonzentration mit Abstand am höchsten.

## Ergebnisse



**Abb. E30:** HPLC-Chromatogramme der Extrakte von Kulturen des *Aspergillus-niger*-Stamms E99-3/341, die bei verschiedenen Konzentrationen von Meersalz im Medium angezogen worden waren ("0" und 3 %). 1 = Biscumarin-Derivat, 2 = Pyranopyrrol A, 3 = Pyranopyrrol C, 4 = Pyranopyrrol B

Während bei der höchsten Salinitätsstufe noch halb so viel Biscumarin bezogen auf den Gehalt bei 1.5 % vorlag, konnten im Medium ohne zusätzliches Salz nur Spuren dieser Verbindung nachgewiesen werden (2 % relativer Gehalt). Noch bemerkenswerter aber war, daß in den Extrakten der Meersalz-freien Kulturen keine Pyranopyrrole nachgewiesen werden konnten. Dagegen waren bei 1.5 und 3.0 % Meersalz in der Kulturbrühe Pyranopyrrole zu finden, wobei hier zusätzlich noch erkennbar war, daß die Verdopplung der Salzkonzentration zu zwei- bis sechsmal höheren Gehalten an Pyranopyrrolen führte (**Abb. E30**).

## 4. Diskussion

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelten Ergebnisse präsentiert worden sind, werden im folgenden Abschnitt diese Daten unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- Haben sich die Erwartungen an die gesammelten Schwämme als gute Quelle für die Isolierung von Mikroorganismen erfüllt?
- Welche Schlüsse konnten aus dem Screening gezogen werden?
- Hat die zur Aufarbeitung der Pilzkulturen angewendete Strategie zum gewünschten Ziel geführt?
- Welche Qualität haben die isolierten Verbindungen mit Blick auf chemische Diversität, Neuartigkeit und biologische Aktivität?
- Welchen Einfluß hat der Faktor Salz auf die Produktion von Sekundärmetaboliten durch Pilze?
- Wie sind schwamm-assoziierte Pilze als Quelle für neue Naturstoffe zu bewerten?

### 4.1. Schwämme als Quelle für marine Isolate von Mikroorganismen

Daß das Gewebe mariner Schwämme eine reichhaltige Quelle für die Isolierung von Mikroorganismen sein kann, war, wie bereits in der Einleitung erwähnt, schon bekannt, bevor die Tätigkeiten im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden. Trotz allem galt es zu bestätigen, daß unser Ansatz und unser Aufarbeitungsprotokoll zur Isolierung von Mikroorganismen aus Schwämmen erfolgreich sein würde. Tatsächlich wurden viele hundert Stämme von Pilzen und Bakterien aus dem Gewebe der verschiedenen Schwammarten isoliert. Im Elektronenmikroskop konnte nur die Existenz von Bakterien nachgewiesen werden. Auch intensive Bemühungen eines kooperierenden Projektpartners führten zwar zur Identifizierung von Mycelien in den Sponginfasern von *Axinella damicornis* (mündliche Mitteilung: Stefan Steffens, Marine Mykologie, AWI Bremerhaven), es sollte sich jedoch später durch Markierung mit bakterienselektiven DNA-Sonden herausstellen, daß es sich um das Mycel eines fädig wachsenden Actinomyceten handelte.



Dennoch scheint es äußerst unwahrscheinlich, daß es sich bei den über 400 isolierten Pilzstämmen ausschließlich um Kontaminationen handelt, zumal bei der Probenahme und Probenaufarbeitung extrem sorgfältig vorgegangen wurde und die zur Kontrolle aufgestellten Luftkeimplatten keine Besiedlung zeigten. Außerdem konnte mehrfach beobachtet werden, wie Hyphen aus Gewebeproben aus dem Inneren von Schwämmen herauswuchsen, um sich auf der Agarplatte anschließend auszubreiten. Von daher muß davon ausgegangen werden, daß Pilze zumindest im Stadium des latenten Lebens im Schwammgewebe vorliegen.

Meerwasser, das von einem Schwamm ausgestoßen wird, ist weitestgehend keimfrei und für Bakterien gilt, daß ihre Zahl im Schwammgewebe um zwei bis drei Größenordnungen höher ist als im Umgebungswasser (mündliche Mitteilung: Dr. Ute Hentschel, Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg). Vermutlich werden Pilzsporen ebenso wie Bakterien im Schwamminnenen zu einem gewissen Anteil verdaut - ein Teil liegt aber offensichtlich immer in keimfähigem Zustand im Schwammgewebe vor. Ein Schwamm fungiert also wie ein natürlicher Filter, der im Meer vorkommende Pilzsporen aus dem Wasser kämmt und in seinem Inneren bis zu einem Grade anreichert, bei dem eine einfache und effektive Isolierung möglich wird. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang vor allem, daß ein Schwamm große Mengen an Umgebungswasser durch seine Wasserleitungsbahnen schleust. So setzt ein etwa fußballgroßer Schwamm täglich 3000 Liter Meerwasser um - eine Filtrierleistung, die mit technischem Gerät nur sehr aufwendig zu erreichen ist.

## **4.2. Das Screening nach neuen biologisch aktiven Naturstoffen**

In das Screening wurden keine unbearbeiteten Rohextrakte integriert, sondern die Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung. Dadurch, daß Meersalz und extrem lipophile Bestandteile in nicht unbeachtlicher Menge weitestgehend entfernt wurden, reicherten sich die Sekundärstoffe der Extrakte an und die Qualität der Proben wurde so deutlich gesteigert. Die lipophilen Bestandteile der Cyclohexanphase hätten sonst das Lösen der Extrakte für die Testung in wässrigen Assays unnötig erschwert und Natriumchlorid kann im MTT-Assay in hohen Konzentrationen zu falsch-positiven Signalen führen.

Das Screening hat sich in dieser Versuchsanordnung gut bewährt, obwohl es mit vier Testsystemen relativ breit angelegt und damit auch sehr zeitaufwendig war. So wäre zum Beispiel ohne das *brine shrimp* assay der Extrakt des Cycloaspeptid-produzierenden Stamms E99-1/95 im Screening nicht aufgefallen. Wichtig war außerdem, jeweils festzustellen, ob ein Extrakt mit zytotoxischer Wirkung auch einen Effekt auf die Nauplien von *Artemia salina* hat. Da auf die Ergebnisse des MTT-Assays bei der Zentaris AG in der Regel mehrere Woche gewartet werden mußte, war es essentiell, ein eigenes, mit dem Test auf Zytotoxizität korrelierendes Assay für die bioassay-gestützte Fraktionierung zu haben.

Obwohl im biologischen Screening viele Schwammextrakte interessante Ergebnisse lieferten und auch ihre HPLC-Chromatogramme vielversprechend waren, wurden sie nicht für eine weitere Aufarbeitung in Betracht gezogen. Die gesammelten Schwammarten kommen im Mittelmeer häufig vor und sind von vielen Arbeitsgruppen - vor allem aus Anrainerstaaten - chemisch bereits sehr gut untersucht worden. Weniger intensiv untersuchte Arten sind in der Regel seltener, von sehr kleinem Wuchs oder schwerer zugänglich (größere Tiefen, Höhlen) und können dadurch nur mit viel Aufwand in hinreichenden Mengen gesammelt werden. Da auch die sorgfältige Probenahme zwecks Isolierung von marinen Isolaten von Mikroorganismen sehr zeitaufwendig ist und im Rahmen des BMBF-Projekts höhere Priorität hatte, mußte auf die Sammlung solcher Schwämme verzichtet werden.

Die Zahl der Extrakte von Bakterienkulturen mit biologischer Aktivität war relativ gering. Vor allem aber die sehr geringen Ausbeuten der Extraktion und die geringe chemische Diversität der Proben führten schließlich dazu, daß keiner der Bakterienstämme für eine Anzucht in großem Maßstab zur Naturstoffisolierung in Betracht gezogen wurde. Da die Kultivierung der Bakterien durch die Projektpartner in Kiel bzw. Würzburg durchgeführt wurde, konnte auf die Kulturbedingungen nur bedingt Einfluß genommen werden. Vermutlich waren die Parameter bei der Anzucht nicht hinreichend für die Produktion von Sekundärstoffen optimiert worden - vor allem die relativ kurze Kulturdauer von lediglich einer Woche könnte ein Grund hierfür sein.

Die durchschnittliche Kulturdauer von Pilzanzuchten lag zwischen zwei und drei Wochen und das Wachstum der Kultur wurde erst dann gestoppt, wenn die Glucose

im Medium verbraucht war. Viele der resultierenden Extrakte waren in einem oder mehreren der Bioassays aktiv, die Extraktmengen lagen zwischen 30 und 300 mg pro Liter Kulturvolumen und die HPLC-Chromatogramme versprachen eine hohe chemische Diversität. Aus diesem Pool wurden die vier vielversprechendsten Stämme ausgewählt, um von ihnen eine Großkultur anzulegen.

Bei drei der vier Großanzuchten von Pilzkulturen entsprach die chemische Zusammensetzung der Extrakte dem chemischen Profil der Extrakte des jeweiligen Stammes aus dem Screening. Bei E00-1/7 war im Extrakt der Großkultur aber nur noch eine der ursprünglich sieben Hauptverbindungen vertreten. Dieser Stamm hatte beim Hochskalieren des Kulturvolumens anscheinend seine Sekundärstoffwechselfähigkeit modifiziert, obwohl sich die Anzuchtbedingungen nicht verändert hatten. Hierbei muß allerdings beachtet werden, daß die Screening-Kultur direkt mit einem Ausstich aus der Agarplatte der Stammkultur beimpft wurde, während zur Inokulation der Großkultur eine Zwischenanzucht in Flüssigmedium angelegt worden war. In dieser Phase könnte eventuell eine Modifikation stattgefunden haben.

#### **4.3. Biologische Aktivität und chemische Diversität der isolierten Naturstoffe**

Aus den Großkulturen der vier untersuchten Pilzstämmen wurden sechs bekannte und neun neue Naturstoffe isoliert, darunter ein zyklisches Pentapeptid, ein klassisches Polyketid, ein Phenyllessigsäure-Derivat, ein Terphenylchinon, ein dimeres Cumarin, ein Diketopiperazin, ein Pyrazinopyrrolindol, Benzylpyridine und neuartige Pyranopyrrole.

Am effektivsten verlief die Fraktionierung der Extrakte mit einer Trennkaskade aus Flüssig-Flüssig-Verteilung gefolgt von Mitteldruck- oder Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel, anschließender Säulenchromatographie auf Sephadex-LH20 und schließlich Feintrennung mit RP-18-Material auf Lobarsäulen oder mit der semipräparativen HPLC. Alle isolierten Reinsubstanzen wurden nachweislich von den jeweiligen Pilzstämmen gebildet und sind auch nicht erst nach der Passage über die verschiedenen Trennsysteme als Artefakte entstanden. Im Rohextrakt konnten alle isolierten Verbindungen per HPLC-DAD bzw. -MS nachgewiesen werden. Im Extrakt eines unbeimpften Kontrollmediums dagegen konnten diese Substanzen

nicht aufgefunden gemacht werden. Die Fraktionierung wurde jeweils konsequent begleitet von der Testung der Fraktionen im *brine shrimp* assay. Für die beiden *Penicillium*-Kulturen E99-1/95 und E99-1/7 konnten so das Cycloaspeptid bzw. das Citrinin als die wirksamen Prinzipien der Extrakte identifiziert werden. Die für die zytotoxische Wirkung des Extrakts der *Verticillium*-Anzucht verantwortliche Verbindung ist das Leptosin. Aus dem Extrakt von *Aspergillus niger* wurden zwei Verbindungen mit biologischer Aktivität isoliert, die zwar nicht im *brine shrimp* assay aktiv waren, dafür aber die Wirkung des Rohextrakts auf Insekten und Krebszellen erklären.

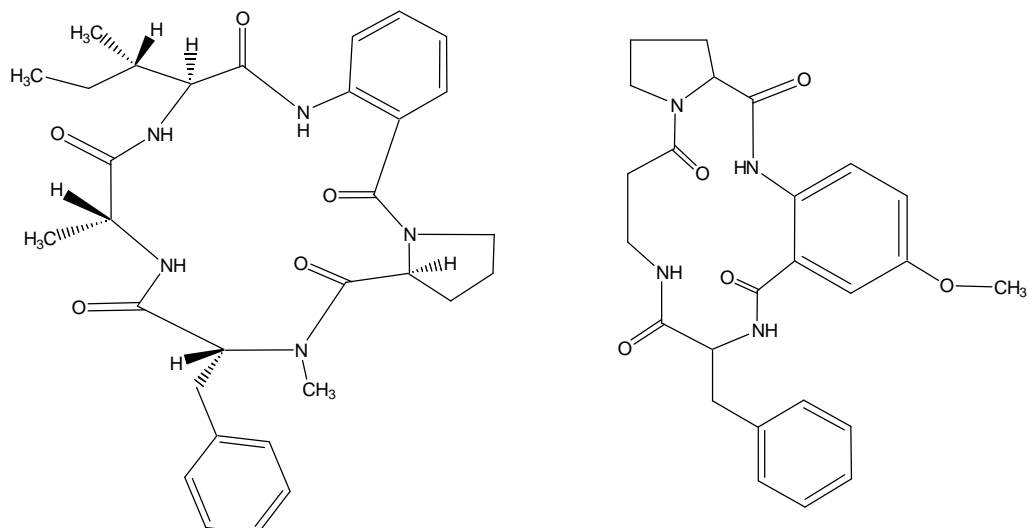
#### 4.3.1. Cycloaspeptid aus *Penicillium* sp. (E99-1/95)

Die Gattung *Penicillium* ist mit über 200 Vertretern eine der größten im Pilzreich. Aus verschiedenen *Penicillium*-Arten wurden bisher über 800 strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen isoliert.

Cycloaspeptid: Cycloaspeptid A wurde von Kobayashi *et al.* 1986 zum ersten Mal aus dem Chloroform-Extrakt einer Standkultur eines *Aspergillus*-Stamms isoliert. Die Pilzkultur stammte seinerzeit aus einer Bodenprobe die im westlichen Nepal gezogen worden war. Neben dem Cycloaspeptid A wurden auch die Mono-des-N-methyl-Derivate dieser Verbindung isoliert.

Insgesamt sind über 900 zyklische Peptide aus der Natur bekannt. Der größte Anteil dieser Verbindungen wird von Mikroorganismen gebildet, aber auch aus Pflanzen und marinen Invertebraten sind bereits viele Cyclopeptide isoliert worden [Chapman and Hall, 2002]. Aus Vertretern der Gattung *Penicillium* sind bislang sieben zyklische Peptide bekannt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß von einer *Penicillium*-Kultur Cycloaspeptid produziert wird.

Anthranilsäure und ihre Derivate kommen häufig in den Extrakten von Pilzkulturen vor - etwas seltener auch als Bestandteil von Diketopiperazinen (z.B. im Extrakt von *Penicillium cyclopium* [Bracken *et al.*, 1954]). Als Baustein in zyklischen Peptiden ist Anthranilsäure sehr selten und sonst nur noch in den Avellaninen A und B aus dem Pilz *Hamigera avellana* [Yamazaki *et al.*, 1987], und als Methoxy-Derivat in Aspercolorin aus *Aspergillus versicolor* [Aucamp *et al.*, 1969] beschrieben worden (**Abb. D1**).



**Abb. D1:** Strukturformeln der zyklischen Peptide Avellanin und Aspercolorin.

Biologische Aktivität von Cycloaspeptid: In der bisher einzigen Publikation über das Cycloaspeptid wird erwähnt, daß diese Verbindung weder antifungal noch antibakteriell wirkt. Da viele zyklische Peptide aber für ihre zytotoxische Wirkung bekannt sind, und da auch eine Aktivität des Cycloaspeptids im *brine shrimp* assay feststellbar war, wurde die Substanz an verschiedenen Zelllinien getestet. Tatsächlich gab es im MTT-Assay mit humanen Leukämie-Zellen positive Signale und die halbmaximale Hemmkonzentration des Cycloaspeptids lag abhängig von der Zellart zwischen 2 und 9 µg/ml.

Der Verdacht, daß die Verbindung im Vergleich mit dem Cycloaspeptid aus der Literatur aufgrund einer anderen Stereochemie biologisch aktiv ist, hat sich nicht erhärtet. Sowohl der Drehwert als auch die Ergebnisse der Derivatisierung nach der Marfey-Methode sprachen dafür, daß beide Verbindungen die gleiche absolute Konfiguration haben.

Damit konnte zum ersten Mal die Hemmwirkung von Cycloaspeptid auf Krebszellen beschrieben werden, wobei der Vergleich der Kurven des MTT-Assays und der <sup>3</sup>H-Thymidin-Aufnahme dafür spricht, daß es sich um einen zytostatischen Effekt handelt.

#### 4.3.2. Inhaltsstoffe aus *Penicillium* sp. (E99-1/7)

Aus dem Extrakt der *Penicillium*-Kultur E99-1/7 wurden zwei Verbindungen isoliert, deren Kohlenstoffgerüst in der Natur häufig zu finden ist. Eine der beiden Verbindungen ist dennoch ein neuer Naturstoff mit nicht ganz gewöhnlichen Strukturmerkmalen.

Phenylelessigsäureamid: Das Phenylelessigsäureamid ist ein chloriertes Amid einer aromatischen Carbonsäure. Im "Dictionary of Natural Products" [Chapman and Hall, 2002] finden sich über 80 Derivate der Phenylelessigsäure, davon liegen 31 Verbindungen als Phenylelessigsäureamid vor. Die Carbonsäureamid-Funktion ist charakteristisch für mikrobielle Naturstoffe (1300 Verbindungen mit Carbonsäureamid-Gruppe aus Mikroorganismen [Antibase, 2002]), während nur einige wenige Verbindungen aus Pflanzen und Tieren dieses Strukturmerkmal haben [Chapman and Hall, 2002].

Die Substitution eines Aromaten mit Chlor findet sich ebenfalls deutlich häufiger bei Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen als in den Extrakten anderer Organismen. Die Kombination aus einem *para*-Hydroxyphenyl mit einem Chlor-Substituenten in *meta*-Stellung taucht in Mikroorganismen ca. 250 mal auf. Darunter ist auch die 3-Chloro-4-hydroxyphenyl-essigsäure aus dem Pilz *Marasmius palmivorus* [Gribble *et al.*, 1996]. Das Carboxylamid dieser Verbindung wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit als neuer Naturstoff zum ersten Mal isoliert.

Citrinin: Das Citrinin ist ein 1946 erstmals beschriebenes Polyketid [Wyllie *et al.*, 1946], das von verschiedenen Pilzen gebildet werden kann, darunter *Penicillium citrinum* sowie verschiedene *Penicillium*-, *Aspergillus*-, *Candida*- und *Monascus*-Arten. Allein aus der Gattung *Penicillium* sind 89 Benzopyran-Derivate bekannt. Damit ist das Benzopyran-Gerüst des Citrinins kein außergewöhnliches Strukturmerkmal und kommt auch sonst in der Natur sehr häufig vor.

Citrinin ist eine sehr intensiv untersuchte Verbindung und kann käuflich erworben werden.

Biologische Aktivität von Citrinin: Aus der Literatur ist bekannt, daß Citrinin die Haut reizt, daß es ein hohes carcinogenes und teratogenes Potential hat und daß es hepato- und nephrotoxisch wirkt [Barber *et al.*, 1987 und Chapman and Hall, 2002]. Von ökologischer Relevanz für den Pilz ist zusätzlich die Funktion der Verbindung als UV-Schutz (Absorptionsmaximum bei 319 nm) z.B. in der äußersten Schicht der Sporen von *Penicillium verrucosum* [Stormer *et al.*, 1998].

Die Behandlung verschiedener Zelllinien mit Citrinin am DSMZ lieferte IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 20 und 30 µg/ml.

#### **4.3.3. Inhaltsstoffe aus *Aspergillus niger* (E99-3/341)**

Aus diesem Extrakt wurden insgesamt acht Verbindungen isoliert, von denen sieben neue Naturstoffe darstellen. Zwei der neuen Naturstoffe waren biologisch aktiv, allerdings nicht im *brine shrimp assay*. Die Aktivität dieses Extrakts gegen die Nauplien von *A. salina* ging bei drei von vier aktiven VLC-Fractionen auf Höhe der Sephadex-Trennung verloren, in einem Fall erst bei der Trennung mit der präparativen HPLC.

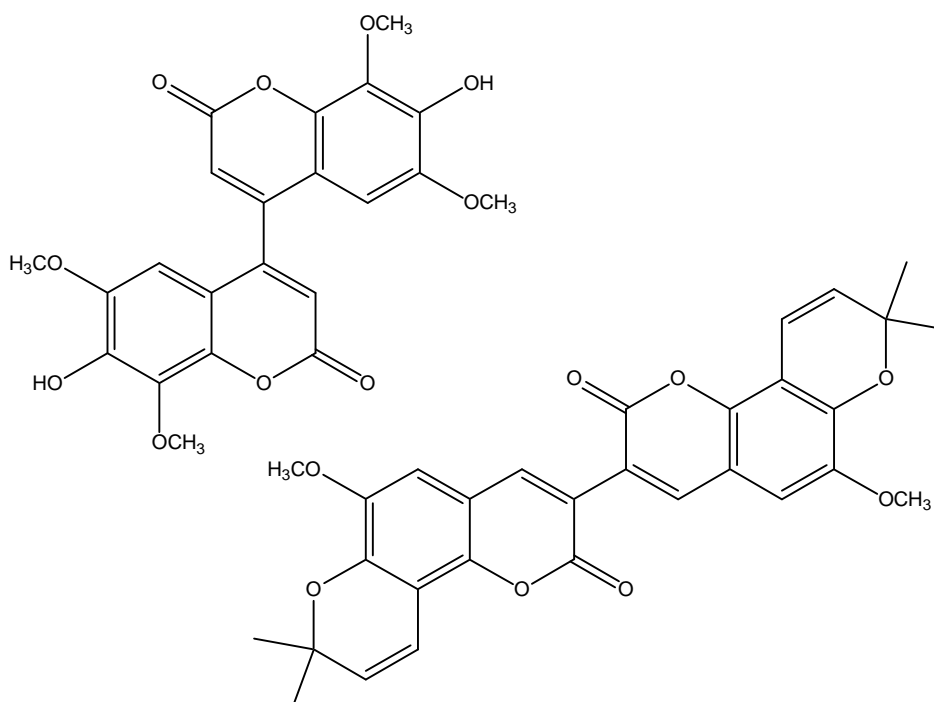
Die schwache antibiotische Aktivität wurde bei der Fraktionierung des Extrakts nicht weiter verfolgt. Im Agarplattendiffusionstest konnte diese Wirkung des Extrakts durch keine der isolierten Verbindungen erklärt werden.

Cycloleucomelon: Terphenylchinone sind Verbindungen, die nur in Pilzen und Flechten vorkommen. Von bisher insgesamt 38 beschriebenen Terphenylen liegen 18 Derivate als Chinone vor. Eine dieser Verbindungen ist das braune Pigment Cycloleucomelon. Dieser Naturstoff wurde bisher aus den Basidiomyceten *Boletopsis leucomelaena* (Rußgrauer Porling oder "Kurotake"), *Paxillus atrotomentosus* (Samtfußkrempling), *Thelephora ganbajun* (Gan-Ba-Jun) und *Anthracoephyllum* sp. (Blätterpilz) isoliert [Jägers *et al.*, 1987, Besl *et al.*, 1989, Hu *et al.*, 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte Cycloleucomelon zum ersten Mal aus einem Ascomyceten isoliert werden.

Biscumarin-Derivat: Im "Dictionary of Natural Products" [Chapman and Hall, 2002] finden sich über 2500 Naturstoffe, in deren Molekül ein Cumarin-Gerüst enthalten ist.

Bei etwa 100 Verbindungen sind sogar zwei Cumarin-Einheiten pro Molekül zu finden. Doch bei lediglich einem Drittel dieser Verbindungen sind die Cumarin-Einheiten auch direkt miteinander verknüpft.

Dazu gehören die 8,8'-verknüpften Kotanine, die 6,6'-verknüpften Isokotanine [Laakso *et al.*, 1994], die 6,8'-verknüpften Deseritorine [Rizzacasa *et al.*, 1988] sowie das 3,8'-verknüpfte Aflavarin [Tepaske *et al.*, 1992] und 7-O-Desmethyl-3,8'-bisiderin [Nozwawa *et al.*, 1994], bei denen die Verknüpfung entweder zwischen den beiden Phenylringen oder zwischen dem Phenylring der einen und dem Lactonring der anderen Cumarin-Einheit vorliegt. Alle diese Biscumarine stammen aus Kulturen von terrestrischen Isolaten von *Aspergillus*- und *Emericella*-Arten. Für sie wurde postuliert, daß sie über den Polyketid-Stoffwechsel biosynthetisiert werden [Tepaske *et al.*, 1992].



**Abb. D2:** Strukturformeln der Biscumarine Biisofraxidin und Toddasiatin.

Nur bei zwei Biscumarinen besteht eine Verknüpfung zwischen den beiden Lactonringen. Die eine Verbindung ist das 4,4'-Biisofraxidin, isoliert aus Wurzelkulturen von *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae), [Panichayupakaranant *et al.*, 1998], (**Abb. D2**). Die andere Verbindung ist das 3,3'-verknüpfte Toddasiatin aus



der Wurzel von *Toddalia asiatica* (Rutaceae), [Tsai *et al.*, 1996], (**Abb. D2**). Von dieser Verbindung existieren allerdings keine  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten.

Die 6,6'-, 8,8'- und 3,8'-Biscumarine sind aufgrund ihrer axialen Chiralität optisch aktiv. In den Publikationen von Biisofraxidin und Toddasiatin sind keine Drehwerte angegeben. Für das 3,3'-Biscumarin aus E99-3/341 konnte weder mit dem Polarimeter noch mit dem CD-Spektrometer eine optische Aktivität nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß entweder für die beiden Cumarin-Einheiten der Verbindung die freie Rotation um die Verknüpfungsachse sterisch möglich ist oder daß die Verbindung zwar axial chiral ist aber als Racemat vorliegt.

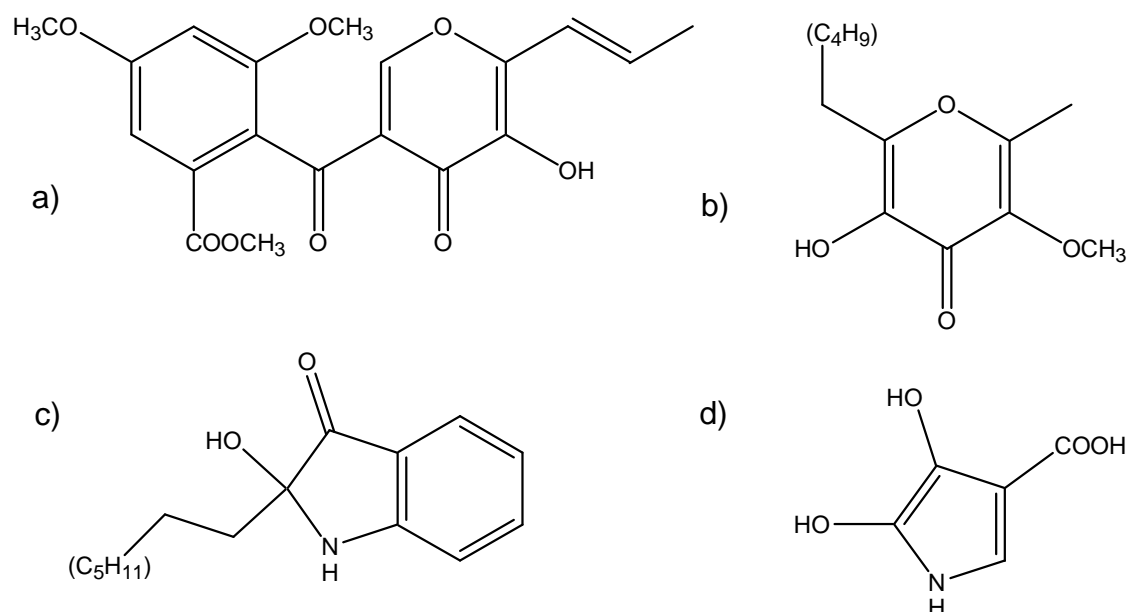
Um diese Frage klären zu können, müßte man die eventuell vorliegenden Enantiomere über eine chirale Säule trennen und ihre optische Aktivität bestimmen. Falls die Enantiomeren wieder racemisieren, könnte man den gleichen Ansatz mit dem permethylierten Derivat durchführen. Grund für die Rotationsfreiheit könnte nämlich sein, daß die hydroxylierte Untereinheit spontan tautomerisiert. Beim Übergang von dem einem zum anderen Tautomer könnte vorübergehend die freie Rotation möglich sein. Durch die Permethylierung wären die Enantiomeren sterisch fixiert und könnten nach der Passage über eine chirale Säule optisch vermessen werden. Leider konnten aus Zeitgründen die hierfür erforderlichen Experimente nicht durchgeführt werden.

Fest steht allerdings, daß mit dem aus der *Aspergillus*-Kultur E99-3/341 isolierten Biscumarin-Derivat zum ersten Mal  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten für ein 3,3'-verknüpftes Biscumarin vorliegen. Außerdem konnte die 3,3'-Verknüpfung - und die Verknüpfung der Cumarin-Einheiten zwischen den beiden Lactonringen überhaupt - das erste Mal für Biscumarine aus Pilzkulturen beschrieben werden.

Pyranopyrrole: Die zwei Substrukturen der Pyranopyrrole,  $\gamma$ -Pyranon-Ring und Pyrrol-Ring, sind für sich genommen gängige Strukturelemente in den verschiedensten Naturstoffen. Präzisiert man die Substruktursuche nach  $\gamma$ -Pyranonen durch Einbeziehung der Substituenten, reduziert sich die Trefferzahl in den Datenbanken [Chapman and Hall, 2002] schnell von zunächst acht ungesättigten 2-Propenyl- $\gamma$ -pyranonen auf drei Verbindungen mit einem Sauerstoffsubstituenten in Position 3. Eine dieser Verbindungen ist das 3-Hydroxyfunicon [Merlini *et al.*, 1970], (**Abb. D3**).  $\gamma$ -Pyranone mit einem Stickstoffatom in

*ortho*-Stellung zur Ketogruppe gibt es laut Datenbanken nicht. Dafür gibt es 14  $\gamma$ -Pyranone mit zwei Sauerstoffsubstituenten in den Positionen 3 und 5 (z.B. **Abb. D3**, [Kodera *et al.*, 1989]). Geht man von einem solchen  $\gamma$ -Pyranon aus und postuliert zunächst die Bildung eines Furanrings, könnte bei einer späteren Modifikation der Sauerstoff durch ein Stickstoffmolekül ersetzt werden und der Furanring würde zum Pyrrolring.

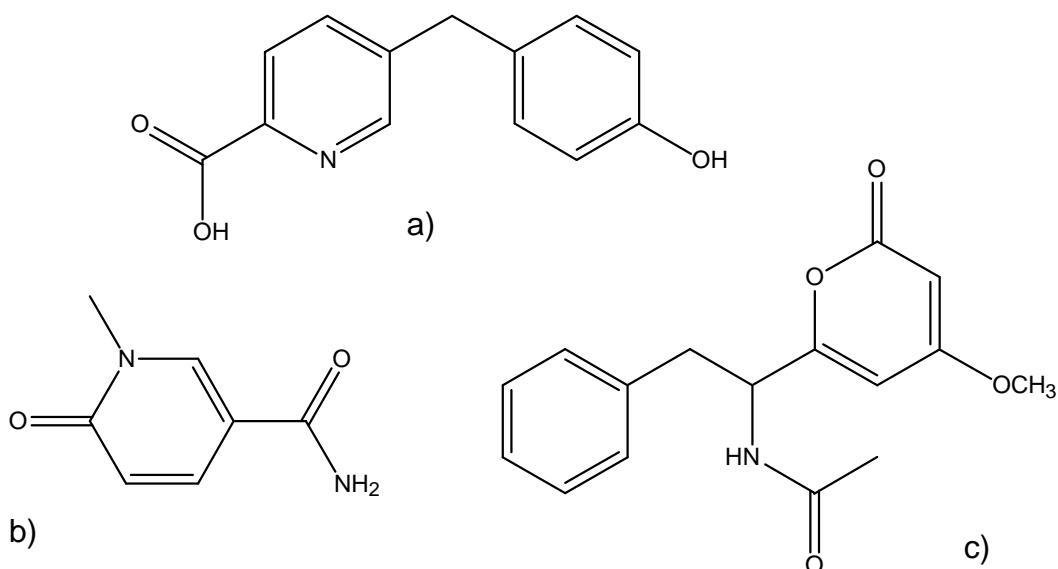
In **Abb. D3** sind zwei Beispiele von Verbindungen dargestellt die einen Pyrrolring haben, der dem der Pyranopyrrole A [Bhakuni *et al.*, 1991] bzw. B und C [Zhou *et al.*, 1989] ähnlich ist. Wie diese Beispiele sind auch die meisten anderen in den Datenbanken gefundenen strukturell relevanten Pyrrole, Derivate des Indols oder bestehen lediglich aus einem Pyrrolring. Da es sich bei den Pyranopyrrolen um Naturstoffe handelt, die eine neuartige Gerüststruktur haben, sind in der Literatur keine Referenzverbindungen mit einer höheren strukturellen Übereinstimmung verfügbar.



**Abb. D3:** Referenzsubstanzen für die Pyranopyrrole aus dem "Dictionary of Natural Products" [Chapman and Hall, 2002]. a) Merlini *et al.*, 1970, b) Kodera *et al.*, 1989, c) Bhakuni *et al.*, 1991 und d) Zhou *et al.*, 1989.

**Benzyropyridine:** Ein  $\alpha$ -Pyridinonring kommt als Substruktur in vielen Naturstoffen und in vielen verschiedenen Organismen vor. Benzylreste finden sich ebenfalls sehr häufig, allerdings vorwiegend in Sekundärmetaboliten, die aus Mikroorganismen isoliert wurden. Diese Strukturelemente und eine zusätzliche Carboxamidgruppe sind

im Benzylpyridin A zu einem neuen Naturstoff miteinander kombiniert. Vergleichbare Verbindungen aus der Literatur variieren in Anzahl und Anordnung der Substituenten am Pyridinonring. Zum Beispiel ist die Phenopicolinsäure aus einer Kultur des Pilzes *Paecilomyces* sp. zwar mit einem Benzylrest und einer Carbonsäuregruppe substituiert, allerdings in anderen Positionen als die Benzylpyridine [Nakamura *et al.*, 1975]. Zudem liegt hier statt einem Pyridinon- ein Pyridin-Ring vor. Das Nudiflorin aus den Blättern der Euphorbiacee *Trewia nudiflora* unterscheidet sich nur durch die Methylierung des Pyridin-Stickstoffs und das Fehlen des Benzylsubstituenten [Buurman *et al.*, 1986], (**Abb. D4**).



**Abb. D4:** Referenzsubstanzen für die Benzylpyridine aus dem "Dictionary of Natural Products" [Chapman and Hall, 2002]. a) Nakamura *et al.*, 1975, b) Buurman *et al.*, 1986, d) Varoglu *et al.*, 2000.

Für Benzylpyridin B gelten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit die selben Anmerkungen wie für Benzylpyridin A. Zusätzlich ist bei dieser Verbindung interessant, daß der Teil der Struktur, der vom Benzylpyridin A abweicht, große Übereinstimmungen mit der Struktur des Pyrophens hat (**Abb. D4**). Pyrophen ist eine Verbindung, die sowohl aus der Kultur eines terrestrischen *Aspergillus-niger*-Stamms als auch aus der Kultur eines schwamm-assoziierten *Aspergillus-niger*-Stamms isoliert wurde [Barnes *et al.*, 1990 und Varoglu *et al.*, 2000]. Durch die Verknüpfung des an sich schon neuen  $\alpha$ -Pyridinonrings mit einem  $\alpha$ -Pyranonring und einem weiteren Benzylrest handelt es sich bei Benzylpyridin B um einen neuen tetrazyklischen Naturstoff.

Aus verschiedenen Extrakten von *Aspergillus-niger*-Kulturen sind bereits über 70 Verbindungen in der Literatur beschrieben worden, darunter Benzochromene, Isoflavone, zyklische Peptide, Phenalene sowie die bereits erwähnten Biscumarine und das Pyrophen. Das Inhaltsstoffspektrum dieser Pilzart konnte mit den aus E99-3/341 isolierten Verbindungen um das Terphenylchinon Cylcoleucomelon, die Benzylpyridine und die neuartigen Pyranopyrrole erweitert werden.

Biologische Aktivität der Verbindungen aus E99-3/341: Die stark insektizide Wirkung des Extrakts im Fraßversuch mit *Spodoptera littoralis* ließ sich zu einem Teil auf die fraßhemmende Wirkung des Pyranopyrrols A zurückführen. Diese Verbindung kommt mit einem Peakflächenanteil von 20 % im HPLC-Chromatogramm des Extrakts und damit in beträchtlicher Konzentration vor (siehe Chromatogramme der Rohextrakte im Anhang). Sicherlich spielten zusätzlich aber auch synergistische Effekte mit anderen Komponenten des Extrakts eine Rolle. Zum Beispiel könnte die moderat zytotoxische Wirkung des Biscumarin-Derivats den insektiziden Effekt des Pyranopyrrols A verstärkt haben. Auch diese Substanz war in großer Menge im Rohextrakt enthalten (Peakflächenanteil = 16 %, siehe Chromatogramme der Rohextrakte im Anhang) und ist damit wohl auch zumindest zum Teil verantwortlich für die leicht zytotoxische Aktivität des Extrakts im Screening.

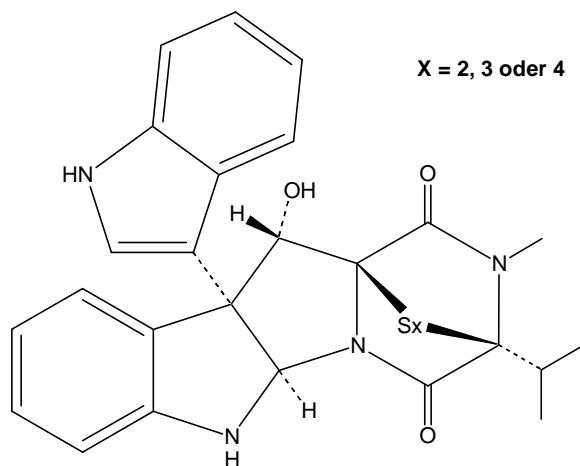
Obwohl in der Literatur für 6,6'- und 3,8'-Biscumarine mit vergleichbarem Substitutionsmuster eine fraßhemmende Wirkung von 20 - 60 % (bei 100 ppm) auf fungivore Insekten beschrieben ist [Laakso *et al.*, 1994 und TePaske *et al.*, 1992], konnte ein solcher Effekt für das aus der *Aspergillus*-Kultur isolierte 3,3'-Biscumarin-Derivat auf *S. littoralis* nicht festgestellt werden. Abgesehen von der unterschiedlichen Verknüpfung der Verbindungen reagieren die Larven der polyphagen Baumwolleneule vermutlich auch nicht so empfindlich auf diese Substanzklasse wie der in den anderen Arbeitsgruppen eingesetzte Nahrungsspezialist *Carpophilus hemipterus*.

Unabhängig von der Verknüpfung weist das 3,8'-verknüpfte Aflavarin mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 7.5 und 55.0 µg/ml im Test mit Lungen- und Brustkarzinomzellen [TePaske *et al.*, 1992] ebenso wie das 3,3'-Biscumarin aus E99-3/341 eine moderate Zytotoxizität auf.

#### 4.3.4. Inhaltsstoffe aus *Verticillium cf. cinnabarinum* (E00-13/33)

Die aus der Kultur von E00-13/33 isolierten Indole sind als Intermediate zwischen primärem und sekundärem Stoffwechsel in der Natur ubiquitär. Auch die Gruppe der Diketopiperazine ist mit über 500 registrierten Vertretern im „Dictionary of Natural Products“ sehr stark repräsentiert. Die im isolierten Diketopiperazin JH0639E enthaltenen Aminosäuren Tryptophan und Alanin sind hierbei mit jeweils über 60 Derivaten sehr häufig auftauchende Bausteine. Drei Viertel der bisher in der Literatur beschriebenen Diketopiperazine wurden aus Mikroorganismen isoliert [Chapman and Hall, 2002]. Grundsätzlich sind sie aber als Abbauprodukte von Peptiden keine klassischen Sekundärmetabolite und können prinzipiell von jedem Organismus in kleinen Mengen gebildet werden [Faulkner *et al.*, 1993].

Im Gegensatz dazu sind die 88 bisher in der Literatur beschriebenen Pyrazinopyrrolindole nur aus Pilzen bekannt. In der Regel liegen diese Verbindungen in der dimeren Form vor, und bisher wurden lediglich drei monomere Pyrazinopyrrolindole beschrieben (Leptosine D, E und F, **Abb. D5**).



**Abb. D5:** Monomere Leptosine D, E und F aus *Leptosphaeria* sp. [Takahashi *et al.*, 1994].

Der Produzent dieser Leptosine war eine *Leptosphaeria*-Art, die von der marinen Alge *Sargassum tortile* isoliert worden war [Takahashi *et al.*, 1994]. Als Leptosin-Produzenten sind zehn verschiedene Pilzgattungen bekannt, darunter auch ein Vertreter der Gattung *Verticillium*. Das bisher einzige aus *Verticillium* bekannte Leptosin ist das dimere Verticillin A [Katagiri *et al.*, 1970].

Im Gegensatz zum Leptosin-Derivat JH0633X aus der *Verticillium*-Kultur E00-13/33 ist der Diketopiperazin-Ring der Leptosine D-F von einer Sulfidbrücke überspannt. Bei JH0633X wurde diese Sulfidbrücke aufgebrochen, und als Reste bleiben zwei Methylsulfanylgruppen am jeweiligen  $\alpha$ -Kohlenstoff erhalten. Damit ist das aus E00-13/33 isolierte Leptosin-Derivat das erste beschriebene monomere Leptosin ohne Sulfidbrücke.

Biologische Aktivität des Leptosins: Die antibiotische Aktivität des Extrakts des *Verticillium*-Stammes E00-13/33 wurde nicht weiter verfolgt. Stattdessen führte die biologische Aktivität im *brine shrimp assay* über mehrere Trennschritte zum Leptosin. Bei einer Konzentration von 100 ppm Leptosin überlebten nach 24 Stunden nur ein Viertel der Nauplien.

Deshalb wurde die Verbindung auch auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht. Da das Leptosin erst in den letzten Wochen der Labortätigkeit isoliert wurde, lagen die Ergebnisse der Testung auf Zytotoxizität zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit leider noch nicht vor. Die Leptosine sind aber bekannt für eine sehr starke zytotoxische Wirkung mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 2 und 86 ng/ml, getestet an P-388-Zellen. Dimere Leptosine wirken hier besonders stark (2 - 3 ng/ml). Monomere Leptosine mit einem Indol-Rest haben  $IC_{50}$ -Werte zwischen 44 und 86 ng/ml [Takahashi *et al.*, 1994]. Man kann also davon ausgehen, daß das isolierte, neue monomere Leptosin vermutlich eine zytotoxische Wirkung in dieser Größenordnung hat.

#### **4.4. “Marine Pilze” oder der Einfluß des Faktors Salz**

Als nach einer Woche die Inkubation der Pilzkulturen der vier untersuchten Stämme abgebrochen wurde, war der erste optische Eindruck, daß in drei von vier Fällen die Mycelien der Anzuchten auf meersalzhaltigem Medium weiter entwickelt waren als auf salzfreien Kontrollen. Vor allem die Pigmentierung schien hier deutlich ausgeprägter zu sein als bei den Kulturen, die auf Medium ohne zusätzlichem Meersalz angezogen worden waren. Lediglich bei der *Verticillium*-Kultur war keine

unterschiedlich intensive Färbung feststellbar. Für die drei anderen Pilzstämme schien das Salzoptimum zwischen 1.5 und 3.0 % zu liegen. Das würde auch den Angaben von Ritchie entsprechen, der seinerzeit für zwei marine Pilzisolat bei 25° C ein Salinitätsoptimum zwischen 1.9 und 2.3 % ermittelt hat [Ritchie, 1957].

Bei Betrachtung der Biomasse konnte hierfür allerdings keine Bestätigung gefunden werden. Die drei Kulturen, die optisch weiter entwickelt schienen, zeigten bei den verschiedenen Salzkonzentrationen keine Unterschiede hinsichtlich der gebildeten Biomasse. Diese drei Stämme waren äußerst schnell gewachsen und vermutlich waren die Mycelien, nachdem sie bei allen Salinitätsstufen die Oberfläche des Nährmediums im Erlenmeyerkolben komplett bedeckt hatten an ihre Wachstumsgrenze gestoßen. Bei der *Verticillium*-Kultur war das Abtropfgewicht des Mycels bei 1.5 % Salz im Medium um 20 % größer im Vergleich zu den beiden anderen Ansätzen.

Der größte Effekt des Faktors Salz war bei der Analyse der Extrakte feststellbar. Bei der *Verticillium*-Kultur war bei „0“ und 1.5% eine zusätzliche, nicht identifizierte Verbindung im Extrakt enthalten. Ansonsten waren keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede feststellbar. Aufgrund der deutlich höheren Biomasse bei 1.5 % Meersalz im Medium läßt sich für diesen Pilzstamm dennoch vermuten, daß sein Salinitätsoptimum in diesem Bereich liegt.

Die beiden *Penicillium*-Stämme schienen äußerlich weiter entwickelt, je höher die Salzkonzentration im Medium war. Der Gehalt der Hauptkomponente ihrer Extrakte nahm allerdings gleichzeitig ab. Dennoch ist dies nicht unbedingt widersprüchlich. Citrinin bzw. Cycloaspeptid werden offensichtlich bereits in sehr frühem Entwicklungsstadium in hohen Konzentrationen gebildet. Je weiter sich die Kulturen entwickeln, und vor allem, wenn sie an ihre Wachstumsgrenze stoßen, scheint die Hauptverbindung weiter metabolisiert zu werden.

Das Salinitätsoptimum für beide *Penicillium*-Stämme liegt im Hinblick auf die Produktion von Citrinin bzw. Cycloaspeptid damit eher bei „0“ % Salz. Die stärkere Ausdifferenzierung des Mycels wird durch Zugabe von Meersalz eventuell induziert, vielleicht aber auch nur beschleunigt.

Besonders bemerkenswert war der Einfluß des Faktors Salz auf die chemische Zusammensetzung der Extrakte des *Aspergillus*-Stamms. Das Salzoptimum für die Produktion des Biscumarins lag offensichtlich bei 1.5 %. Während bei den Anzuchten ohne zusätzliches Salz das Biscumarin-Derivat noch in kleinen Mengen nachweisbar war, schien die Produktion der Pyranopyrrole durch Salz induzierbar zu sein. Ein solcher Effekt wurde schon für das in der Einleitung bereits vorgestellte Trichoharzin beschrieben [Kobayashi *et al.*, 1993].

Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Pyranopyrrole in einem späteren Entwicklungsstadium der Kultur auch ohne die Zugabe von Meersalz gebildet worden wären. Aufschluß darüber könnten allerdings nur Langzeit-Kultivierungen auf verschiedenen Salzniveaus liefern. Fest steht, daß die Ausdifferenzierung des Mycels und die Bildung des Biscumarins sowie der Pyranopyrrole durch Zugabe von Meersalz vielleicht beschleunigt, eventuell sogar induziert wird.

Die untersuchten Pilzstämme haben also gezeigt, daß sie zwar auf den Faktor Salz reagieren, daß sie aber gleichzeitig gegenüber Salzkonzentrationen von bis zu 3 % halotolerant sind. Ein Beweis dafür, daß diese Pilzstämme an das marine Habitat angepaßt sind und folglich auch als marine Stämme zu bezeichnen sind, konnten die durchgeführten Salinitätstests sicher nicht liefern. Allerdings scheint dies alleine durch die Kultivierung bei verschiedenen Salzkonzentrationen auch nur bedingt möglich zu sein. Die Obergrenze der Salinitätstoleranz liegt auch für viele Pilze terrestrischen Ursprungs mit bis zu 20 % erstaunlich hoch, während es marine Pilz-Isolate gibt, die in Kultur ein Optimum von 0.8 - 1.0 % Salz im Medium haben, und die ab 3 % ihr Wachstum einstellen [Siepmann, 1962]. Um genauere Aussagen machen zu können, müßten hier zusätzlich noch Temperatur-Versuche und Anzuchten auf verschiedenen marinen und terrestrischen Kohlenstoffquellen (z.B. Carrageenan bzw. Cellulose) durchgeführt werden.

Von Jones wurde die hemmende Wirkung von erhöhten Konzentrationen an Natrium-Ionen auf die Glucose-Aufnahme-Rate von Pilzkulturen bereits diskutiert [Jones, 1976]. Sei es durch Förderung oder Hemmung des Wachstums, als osmotischer Streßfaktor oder durch die direkte Beeinflussung von Enzymen durch erhöhte Ionenkonzentrationen, fest steht, daß in den Salinitätstests deutlich wurde, daß der



Faktor Salz einen erheblichen Einfluß auf die Quantität und die Qualität der produzierten Sekundärmetaboliten haben kann. Die Salinität des Kulturmediums ist folglich ein bedeutender Parameter für die Kultivierung von Pilzen im Rahmen eines Naturstoffscreenings und kann dazu dienen, die chemische Diversität von Pilzinhaltsstoffen zu erhöhen.

#### **4.5. Schwammassoziierte Pilze als Quelle für neue Naturstoffe**

Isolate von *Aspergillus niger* van Thiegem sind sowohl aus terrestrischem als auch aus marinem Material bekannt. So wurden Stämme dieser Art unter anderem auch aus den Samen der Roten Mangrove, aus Meerwasserproben und aus benthischen Sedimenten isoliert [Jones, 1976]. Diese Pilzart kann demzufolge aus marinen Proben isoliert werden, ist aber nicht obligat marin.

Die bearbeiteten Pilzstämme aus den Gattungen *Penicillium* und *Verticillium* wurden nicht bis zur Art bestimmt. Daher konnte hier eine Entscheidung, ob obligat oder fakultativ marin, auf der Ebene der Arten nicht getroffen werden. Allerdings sind Vertreter beider Gattungen sowohl auf dem Land als auch im Meer zu finden [Jones, 1965 und Johnson]. Die Gattungen *Penicillium* und *Verticillium* sind daher als fakultativ marin einzustufen.

Allgemein gehören die bearbeiteten Pilzstämme zu den großen Pilzgattungen mit jeweils 40 (*Verticillium*), 185 (*Aspergillus*) bzw. 223 Arten (*Penicillium*), [Kirk *et al.*, 2001]. Die Isolierung von Mikroorganismen aus marinen Schwämmen und die anschließende Selektion der hinsichtlich Inhaltsstoffmuster und biologischer Aktivität interessantesten Stämme lieferte also keine Vertreter außergewöhnlicher bzw. obligat mariner Pilzgattungen. Dieses Phänomen tritt bei der Arbeit mit marinen Pilzen-Isolaten häufig auf. Obligat marine Pilze wachsen sehr langsam und werden bei der Inkulturnahme durch die schneller wachsenden fakultativ marinen Pilze verdrängt. So kommt es auch, daß die im marinen Habitat beobachteten Pilzstämme oft nicht mit den aus dem beobachteten Material isolierten Pilzstämmen identisch sind [Kohlmeyer *et al.*, 1979].

Obwohl die bearbeiteten Pilze aus Gattungen stammten, aus denen bereits eine Vielzahl von Inhaltsstoffen beschrieben war, stellte sich heraus, daß zwei der isolierten Pilzstämme, *Verticillium cf cinnabarinum* (E00-13/33) und *Aspergillus niger* (E99-3/341), in Salzwasserkultur zur Bildung neuer Naturstoffe in der Lage waren. Sowohl die bekannten als auch die neuen Naturstoffe enthielten Strukturelemente, die sowohl aus terrestrischen als auch aus marinen Pilzisolaten bekannt waren.

Auffällig war allerdings die neuartige Struktur der Pyranopyrrole durch die Verknüpfung von Pyranon- und Pyrrol-Ring, die bisher bei Naturstoffen nicht bekannt war. Besonders bemerkenswert ist hierbei, daß dieser Verbindungstyp nur in den Anzuchten nachgewiesen werden konnte, die Meersalz enthielten.

Auch wenn nicht nachgewiesen werden konnte, daß nur die Zugabe von Meersalz die Biosynthese der Pyranopyrrole induzieren kann, so konnte doch gezeigt werden, daß der im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ansatz, die Isolierung schwamm-assoziiertes Pilze und die Anzucht der Isolate in Salzwasserkultur, auch im Hinblick auf zukünftige Arbeiten vielversprechend ist.

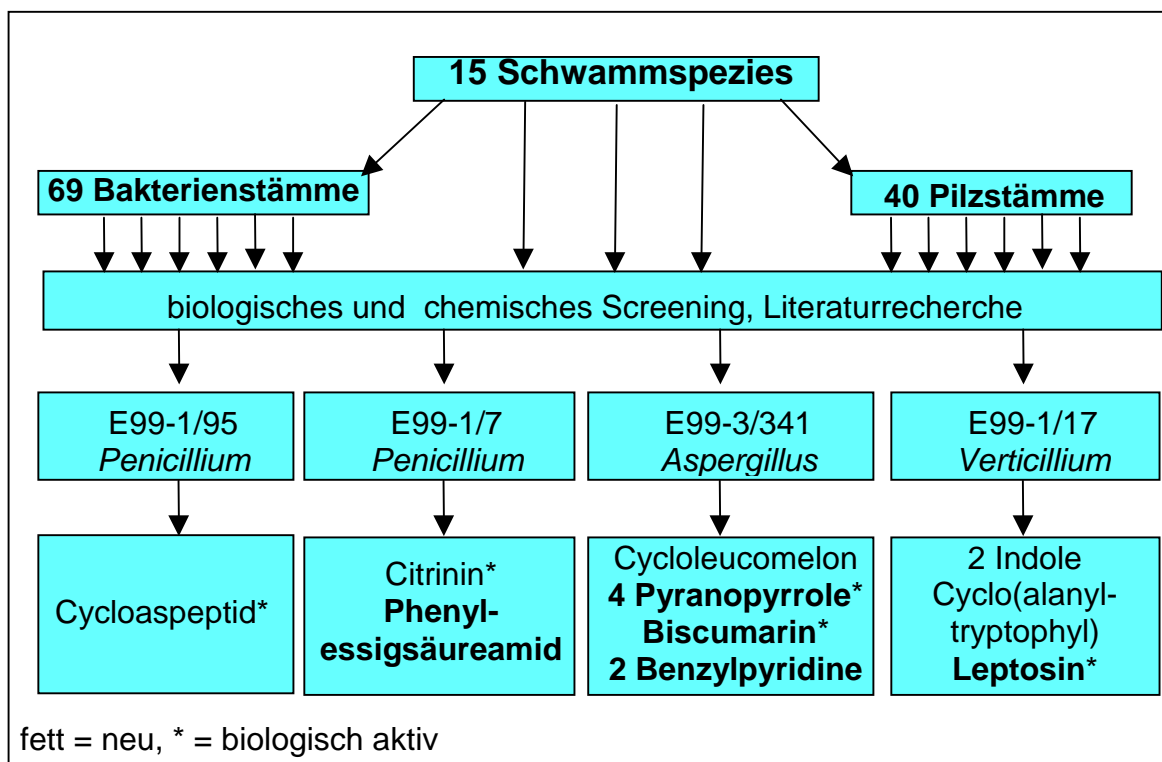
## 5. Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen bietet die Natur unvergleichliche Ressourcen an chemisch-struktureller Vielfalt, kombiniert mit biologischer Aktivität. Seit der Entdeckung des Penicillins 1928 gewannen Pilze als Produzenten von Antibiotika und anderen pharmakologisch aktiven Naturstoffen mehr und mehr an Bedeutung. Obwohl terrestrische Pilze nach wie vor intensiv untersucht werden, nahm aufgrund der Replikation von bekannten Verbindungen die Zahl der aus ihnen isolierten, neuen Naturstoffe in den letzten Jahren ab, und Naturstoffchemiker haben daher ihre Suche nach neuen Naturstoff-Ressourcen unter anderem auf die Mikroflora der Meere ausgeweitet.

Marine Makroorganismen werden bereits seit ca. 25 Jahren sehr intensiv untersucht. Das Interesse an marinen Pilzen nahm erst in den letzten zehn Jahren mehr und mehr zu. Der Vorteil des mikrobiellen Ansatzes der marinen Naturstoffforschung liegt in der guten Umweltverträglichkeit der Methode und der Möglichkeit der Fermentation in großem Maßstab zur Gewinnung von genügend Substanz für die klinische Prüfung und spätere Anwendung von potentiellen Arzneistoffen.

Aus marinen Schwämmen können Bakterien und Pilze in großer Zahl isoliert werden, um anschließend in Kultur genommen zu werden. Auf diese Weise wurden aus marinen Pilz-Isolaten bereits viele neue Naturstoffe mit vielversprechender biologischer Aktivität isoliert. Strukturell sind diese Verbindungen zum Teil ähnlich, einige sogar identisch mit den Inhaltsstoffen terrestrischer Pilze, andere wiederum weisen ungewöhnliche Strukturmerkmale auf.

Das chemische Potential der assoziierten Mikroflora mediterraner Schwämme wurde im Rahmen dieser Arbeit, die Teil des BMBF-Verbundprojektes „Bioaktive Naturstoffe: Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“ war, erstmals eingehend untersucht. Auf zwei Sammelexkursionen auf der Insel Elba in Italien wurden 15 Schwammspezies gesammelt und vor Ort zwecks Isolierung der assoziierten Mikroflora bearbeitet. Die gesammelten Schwämme sowie die Kulturen von über 100 Mikroorganismen wurden extrahiert und die Extrakte in vier Testsystemen auf ihre biologische Aktivität hin untersucht.



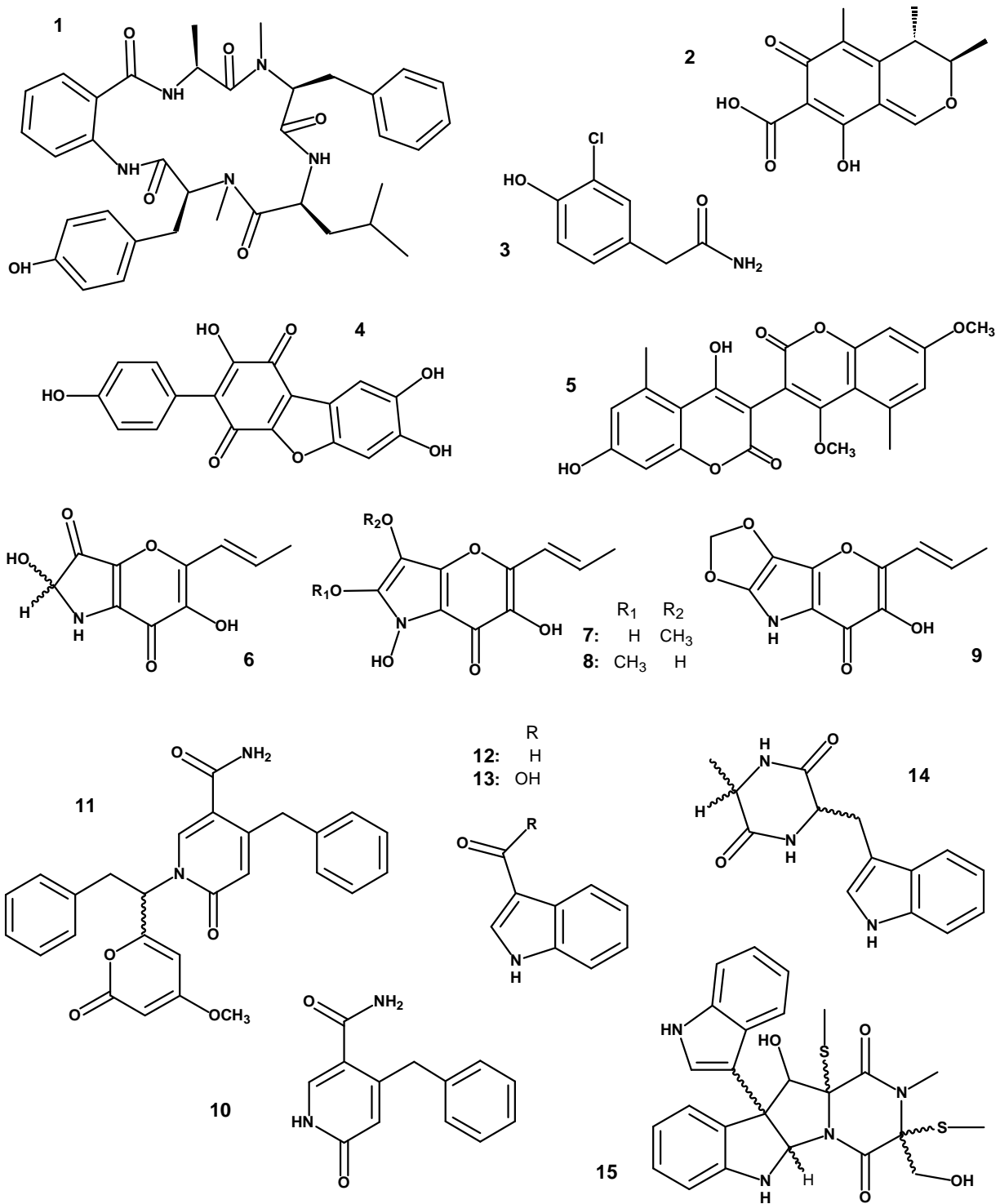
**Abb. Z1:** Screening nach biologisch aktiven Naturstoffen.

Insgesamt wurden so die Extrakte von 15 Schwammspezies, 69 Bakterienstämmen und 40 Pilzstämmen untersucht. Unter Berücksichtigung der biologischen Aktivität und chemischen Diversität der Extrakte, der Extraktmengen und des verfügbaren biologischen Materials wurden vier Pilzstämme ausgewählt, um sie in großem Volumen in Standkultur auf Salzmedium anzuziehen. Aus den Extrakten dieser Kulturen wurden durch bioassay-geleitete Fraktionierung 15 Naturstoffe isoliert, identifiziert, ihre Struktur aufgeklärt und anschließend ihre biologische Aktivität charakterisiert (**Abb. Z1 und Z2**).

Auf diese Weise wurde aus dem *Penicillium*-Stamm E99-1/95 das bekannte zyklische Pentapeptid Cycloaspeptid **1** isoliert. Für diese Verbindung konnte zum ersten Mal eine moderat zytotoxische Wirkung beschrieben werden ( $IC_{50}$ -Werte je nach Zelllinie = 2 - 9  $\mu\text{g/ml}$ ).

Aus einer zweiten *Penicillium*-Kultur (E99-1/7) wurden das bekannte zytotoxische Pilzpigment Citrinin **2** und ein neues, chloriertes Phenyllessigsäureamid **3** isoliert.

## Zusammenfassung



**Abb. Z2:** Aus Kulturen schwamm-assoziiierter Pilze des Mittelmeeres isolierte Naturstoffe.

Aus dem Extrakt einer Kultur von *Aspergillus niger* (E99-3/341) wurden insgesamt acht Naturstoffe isoliert. Der einzige bekannte Naturstoff aus dem Extrakt dieses Pilzes war das Terphenylchinon Cycloleucomelon **4**. Diese Verbindung wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus einem Ascomyceten isoliert.

Zu den neuen Naturstoffen zählten ein Biscumarin-Derivat **5**, vier Pyranopyrrole **6 - 9** und zwei Benzylpyridine **10, 11**. Das Biscumarin-Derivat ist erst das zweite, 3,3'-verknüpfte Biscumarin, das aus der Natur bekannt ist. Zum ersten Mal konnten hier <sup>13</sup>C-NMR-Daten für ein auf diese Weise verknüpftes Biscumarin präsentiert werden. Im Zytotoxizitätstest gegen verschiedene Zelllinien wirkte diese Verbindung schwach antiproliferativ bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 µg/ml.

Die vier Pyranopyrrole sind neue Naturstoffe mit einer ungewöhnlichen Verknüpfung eines 2-Propenyl-γ-pyranons mit einem Pyrrolring. In Kultivierungsexperimenten des *Aspergillus*-Stamms E99-3/341 auf Medien mit verschiedenen Salzkonzentrationen konnte gezeigt werden, daß diese Verbindungen offensichtlich bevorzugt in Salzwasserkultur gebildet werden. Pyranopyrrol A wirkt bei einer Konzentration von 100 ppm im Futterstück fraßhemmend auf die frischgeschlüpften Raupen von *Spodoptera littoralis*.

Der Extrakt einer Kultur von *Verticillium cf. cinnabarinum* (E00-13/33) enthielt unter anderem zwei gewöhnliche Indol-Derivate **12, 13** und ein Diketopiperazin **14** aus Tryptophan und Alanin. Darüberhinaus wurde aus diesem Extrakt ein neues Leptosin-Derivat **15** isoliert. Hierbei handelt es sich um das erste beschriebene monomere Leptosin, bei dem keine Sulfidbrücke im Diketopiperazin-Ring vorliegt. Verbindungen dieses Typs sind bekannt für ihre starke zytotoxische Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 44 - 86 ng/ml.

Insgesamt wurden aus den Kulturen von vier verschiedenen schwamm-assoziierten Pilzstämmen 15 Verbindungen isoliert. Fünf dieser Verbindungen fielen in einem der eingesetzten Biotests durch ihre biologische Aktivität auf. Neun Verbindungen wurden als neue Naturstoffe im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Damit konnte gezeigt werden, daß der im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ansatz, die Isolierung schwamm-assoziiierter Pilze und die Anzucht der Isolate in Salzwasserkultur, auch im Hinblick auf zukünftige Arbeiten vielversprechend ist.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abbott, W.S. (1925) *J. Econ. Ent.* **18**, 265
- Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spectra (1992), Sigma Aldrich
- Anchel, H. Hervey, A. and Robbins, W.J. (1950) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **36**, 570
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W. and Schramm, G. (1977) *J. Antibiot.* **30**, 806
- Antibase (2002) *A database of natural compounds from microorganisms and higher fungi*, CD-ROM, Wiley-VCH, Berlin
- Araya-Maturana, R., Delgado-Castro, T., Cardona, W. and Weiss-Lopez, B. E. (2001) *Current Organic Chemistry* **5**, 253
- Aucamp, P.J. and Holzapfel, C.W. (1969) *J. S. Afr. Chem. Inst.* **22**, 35
- Barber, J., Cornford, J.L., Howard, T. D. and Sharples, D. (1987) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2743
- Barnes, C.L., Steiner, J.R., Torres, E., Pacheco, R. and Marquez, H. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 292
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Truck, M. (1966) *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493
- Besl, H., Bresinsky, A., Geigenmüller, G., Herrmann, R., Kilpert, C. and Steglich, W. (1989) *Liebigs Ann. Chem.*, 803
- Bhakuni (1991) *Phytochem.* **30**, 3159
- Biabani, M.A.F. and Laatsch, H. (1998) *J. prakt. Chem.* **340**, 589
- Borel, J.F., Kis, Z.L. and Beveridge, T. (1995) in *The history of anti-inflammatory drugs*, Merluzzi, V.J. and Adams, J. (Eds.), Birkhäuser, Boston.
- Bowling, C.C. (1967) *Ann. Ent. Soc. Am.* **60**, 1215
- Bracken, A., Pocker, A. and Raistrick, H. (1954) *Biochem. J.* **57**, 587
- Broza, M. and Sneh, B. (1980) *J. Appl. Entomol.* **90**, 526
- Buurman, D.J. (1986) *J. Het. Chem.* **23**, 1015
- Cabrera, G.M. and Selders, A.M. (1997) *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* **85**, 193
- Coll, J.C. and Bowden, B.F. (1986) *J. Nat. Prod.* **49**, 934
- Cragg, G.M. (1998) *J. Nat. Prod.* **60**, 52



## Literaturverzeichnis

- Crews, P., Rodriguez, J. and Jaspars, M. (1998) *Organic Structure Analysis*, Oxford University Press, New York
- Chapman and Hall/CRC (2002) *DNP - Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Hampden Data Services, Boca Raton, USA
- Cui, C.B. (1996) *Tetrahedron* **52**, 12651
- Dekker (1987) *Phytochem.* **26**, 1845
- Dimetry, N.Z. (1970) *J. Appl. Entomol.* **66**, 408
- Dixon, B. (1995) *Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Drexler, H.G., Dirks, W. MacLeod, R.A.F., Quentmeier, H., Steube K.G. and Uphoff, C.C. (1999) *DSMZ catalogue of Human and Animal Cell Lines*, 7. Aufl., DSMZ, Braunschweig
- Drouhet, E. and Dupont, B. (1978) *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.* **7** (2), 165
- Faulkner, D.J., He, H.-Y., Unson, M.D. and Bewley, C.A. (1993) *Gazzetta Chimica Italiana* **123**, 301
- Fölmann, W. (2000) *Mycotoxin Research* **16A**, 123
- Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. and Hentschel, U. (1999) *Marine Biol.* **134**, 461
- Gawaad, A.A.A. and El-Gayar, F.H. (1974) *Zeitschr. angew. Entomologie* **75**, 295
- Gertz, C., (1989) *HPLC, Tips und Tricks*, Kemmerling GmbH
- Gribble, G.W. (1996) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **68**, 201
- Harvey, A. (2000) *DDT* **5**, 294
- Henkel, T. (1999) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **38**, 643
- Hesse, M., Meier, H. and Zeeh, B. (1991) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart
- Hu (2001) *Z. Naturforsch., C* **56**, 983
- Jaensch, et al. (1989) *Phytochem.* **28**, 3497
- Jägers, E., Hillen-Maske, E. and Steglich, W. (1987) *Z. Naturforsch., B* **42**, 1349, 1354
- Jaspars, M. (1999) *Chemistry and Industry* 51
- Johnson, T.B. and Sparrow, F.K. (1961) *Fungi in oceans and estuaries*, Hafner, New York
- Jones, E.B.G. (1976) *Recent Advances in Aquatic Mycology*, Elek Science, London, 153

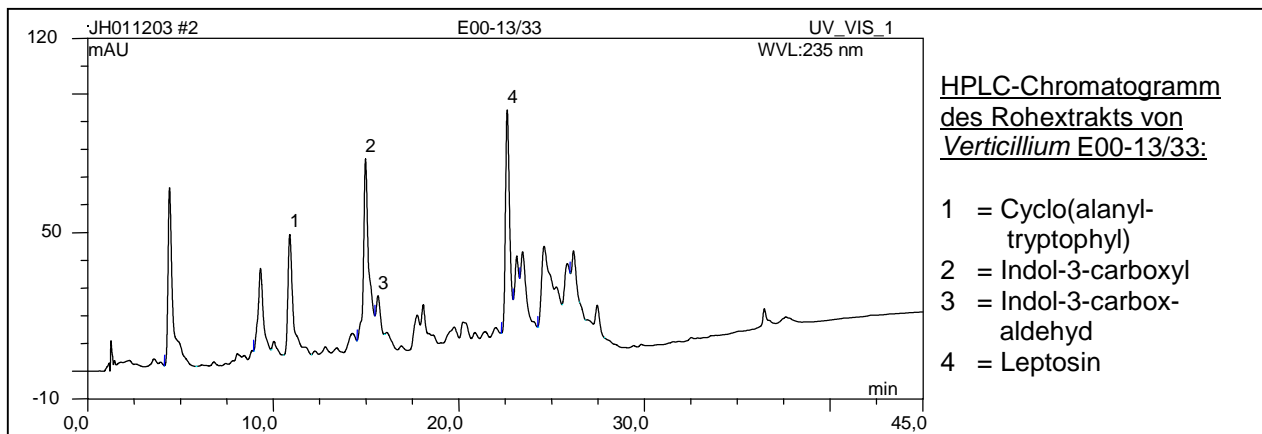
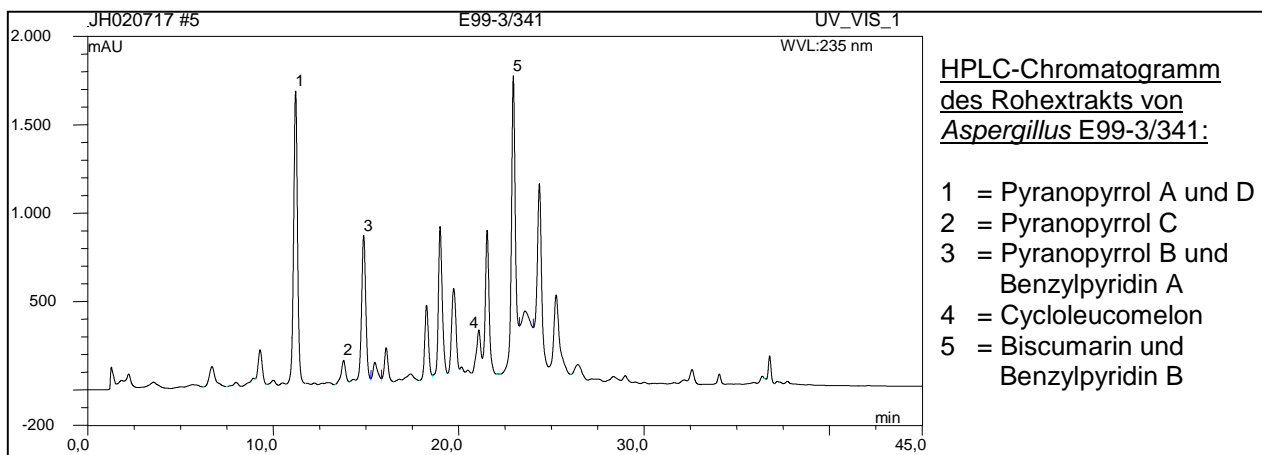
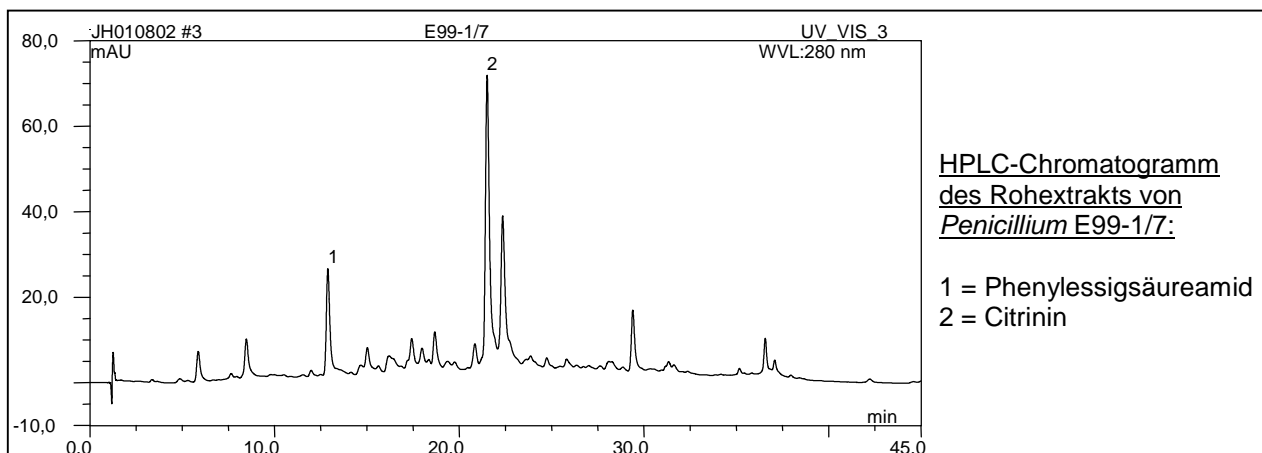
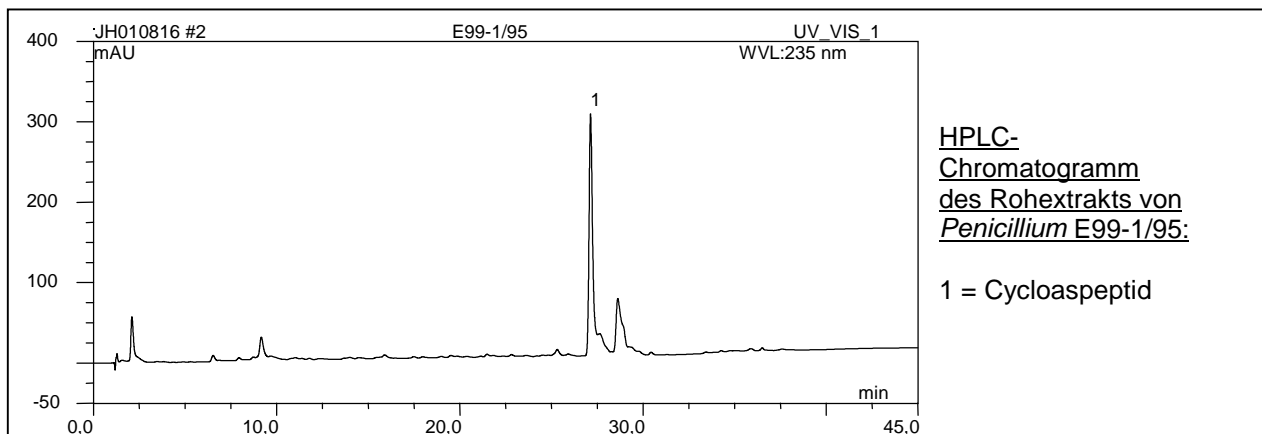
- Katagiri, K. (1970) *J. Antibiot., Ser B* **23**, 1859
- Kellner, R.L.L. (2001) *J. Insect Physiol.* **47**, 475
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Staplers, J.A. (2001) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*, 9. Aufl., CABI Bioscience
- Kobayashi, Samejima, S., Nakajima, S., Kawai, K.-I. and Udagawa, S.-I. (1986) *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1347
- Kobayashi, M., Uehara, ZH., Matsunami, K., Aoki, S. and Kitagawa, J. (1993) *Tetrahedron Lett.* **34**, 7925
- Kodama, K., Takahashi, H., and Kuwano, H. (1992) *Chem. Abstr.* **116**, 192623
- Kodera, *et al.* (1989) *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1656
- Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E. (1979) *Marine Mycology. The Higher Fungi*, Academic Press, New York
- Kohlmeyer, J. and Volkmann-Kohlmeyer, B. (1991) *Bot. Mar.* **34**, 1
- König, G. and Wright, A. (1996) *Planta Med.* **62**, 193
- Laakso, J.A., Narske, E.D. and Gloer, J.B. (1994) *J. Nat. Prod.* **57**, 128
- Liberra, K. and Lindequist, U. (1995) *Pharmazie* **50**, 583
- Marfey, P. (1984) *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 585
- Marston, A. and Hostettmann, K. (1991) *Natural Product Reports* **2**, 391
- MarinLit (2002) Department of Chemistry, University of Canterbury, NZ
- Merlini, L., Nasini, G. and Selva, A. (1970) *Tetrahedron* **26**, 2739
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. (1982) *Planta med.* **45**, 31
- Moussa, M.A. (1960) *Bull. Soc. Ent. Egypte* **44**, 241
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N. and Duckworth, A.R. (1999) *Journal of Biotechnology* **70**, 15
- Nakamura, T., Yasuda, K., Obayashi, A., Tanabe, O., Matsumura, S., Ueda, F. and Ohata, K. (1975) *J. Antibiot.* **28**, 477
- Nakashima, R. (1967) *Can. J. Chem.* **47**, 2069
- Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K.-I., Udagawa, S.-I. and Miyaji, M. (1993) *Phytochem.* **35**, 1049
- Okutani, K. (1977) *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **43**, 995

- Pahl, H.L., Kraus, B., Schulze-Osthoff, K., Dekker, T., Traenckner, E.B., Vogt, M., Myers, C., Warring, P., Mülbacher, A., Czernilofsky, A.P. and Baeuerle, P.A. (1996) *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1829
- Panichayupakaranant, P., Noguchi, H. and De-Eknamkul, W. (1998) *Planta Med.* **64**, 774
- Patel, V.F., Andis, S.L., Kennedy, J.H., Ray, J.E. and Schultz, M. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 2588
- Pietra, F. (1997) *Natural Products Report*, 453
- Pulitzer-Finali, G. (1983) *A collection of mediterranean Demospongiae (Porifera) with in appendix, a list of the demospongiae hitherto recorded from the Mediterranean Sea.* Annali Museo Civico di Storia Naturale Giacomo Doria, Genova, **84**, 445
- Poch, G.K. and Gloer, J.B. (1989a) *Tetrahedron Lett.* **27**, 5591
- Poch, G.K. and Gloer, J.B. (1989b) *J. Nat. Prod.* **52**, 257
- Pomponi, S.A. (1999) *Journal of Biotechnology* **70**, 5
- Proksch, P., Edrada, R.A. and Ebel, R. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 125
- Proll, G. (1998) *Schwämme (Porifera) im Litoral des Westmediterrans: Bestimmung und Kultivierung.* Studienarbeit, Biologisches Institut, Abteilung Zoologie, Universität Stuttgart
- Rahbaek, L., Christophersen, C., Frisvad, J., Bengaard, H.B., Larsen, S. and Rassing, B.R. (1997) *J. Nat. Prod.* **60**, 811
- Ray, G.C. and Grassle, J.F. (1991) *BioScience* **41**, 453
- Renner, M.K. (2000) *J.O.C.* **65**, 4843
- Riedl, R. (1983) *Flora und Fauna des Mittelmeeres*, Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin
- Ritchie, D. (1957) *American Journal of Botany* **44**, 870
- Rizzacasa, M.A. and Sargent, M.V. (1988) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2425
- Rösler, H.J. (1987) *Lehrbuch der Mineralogie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoff-Industrie, Leipzig
- Sauter, H., Steglich, W. and Anke, T. (1999) *Angew. Chem.* **111**, 1416
- Schaumann, K. (1998) Marine Pilze - Eine wenig erforschte Quelle für neue Naturstoffe, *10. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V.*, V8
- Schiehser, G.A., White, J.D., Matsumoto, J., Pezzanite, J.O. and Clardy, J. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 5587
- Schneider, G. (1990) *Arzneidrogen*, Wissenschaftsverlag, Mannheim
- Schupp, P., Eder, C., Proksch, P., Wray, V., Schneider, B., Herderich, M. and Paul, V. (1999) *J. Nat. Prod.* **62**, 959

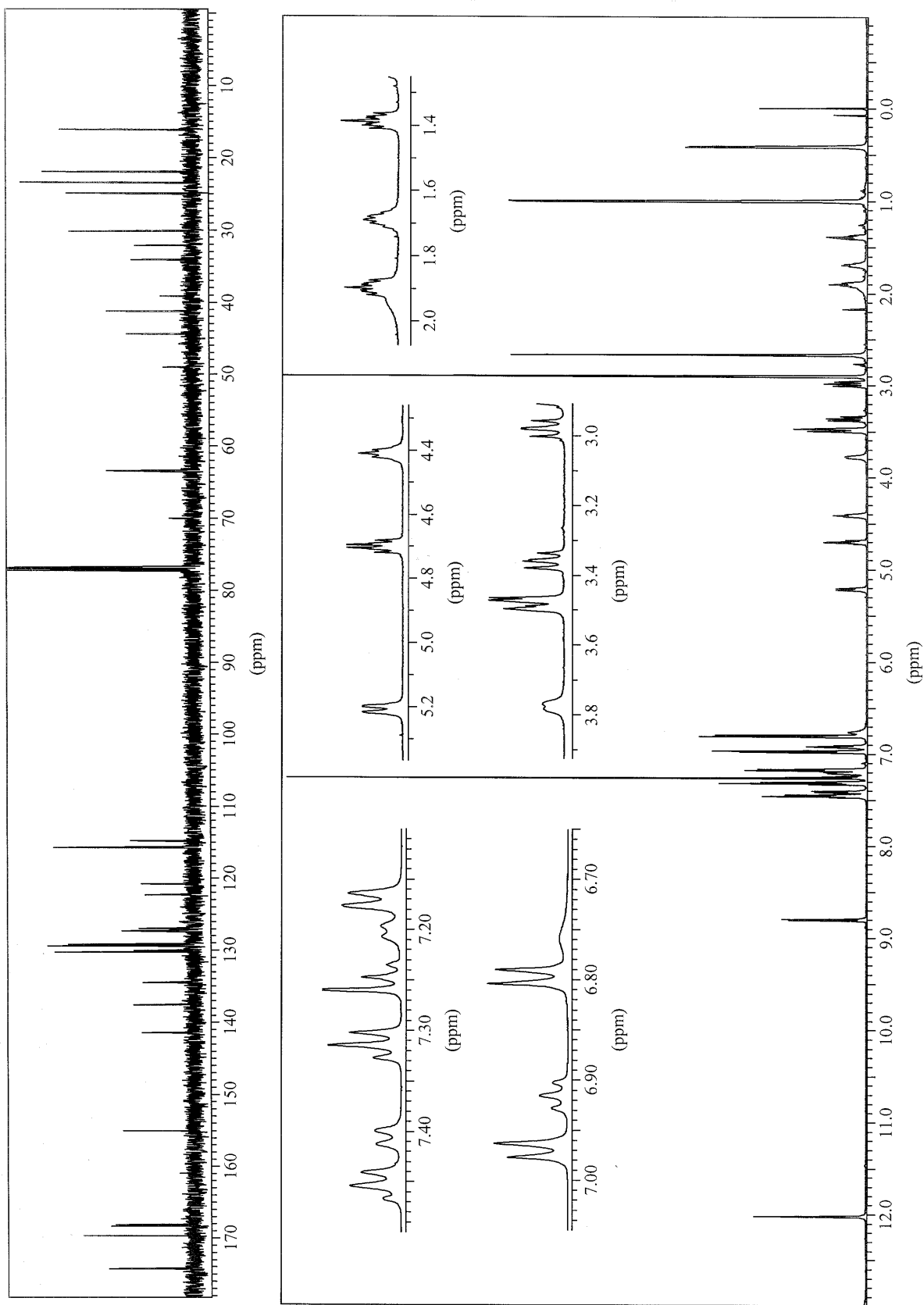
## Literaturverzeichnis

- Scudiero (1988) *Cancer Research* **48**, 4827
- Shorey, H.H., Hale, R.L. (1965) *J. Econ. Entomol.* **58**, 522
- Siepmann, R., Höhnk, W. (1962) *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven* **8**, 79
- Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. and Marinelli, F. (1999) *Journal of Biotechnology* **70**, 65 - 69.
- Srivastava, R.P., Proksch, P. (1991) *Entomol. Gener.* **15**, 265
- Steinegger, E. and Hänsel, R. (1992) *Pharmakognosie*, Springer-Verlag, Berlin
- Steube, K.G., Meyer, C., Proksch, P., Supriyono, A., Sumaryono, W. and Drexler, H.G. (1998) *Anticancer Res.* **18**, 129
- Stormer, F.C., Sandven, P., Huitfeldt, H.S., Eduard, W. and Skogstad, A. (1998) *Mycopathologia* **142**, 43
- Sugana, M. (1994), *J. Org. Chem.* **59**, 564
- Takahashi, C., Numata, A., Ito, Y., Matsumura, E., Araki, H., Iwaki, H. and Kushida, K. (1994) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1859
- TePaske, M.R., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. and Dowd, P.F. (1992) *J. Nat. Prod.* **55**, 1080
- Tsai, I.-L., Fang, S.-C., Ishikawa, T., Chang, C.-T. and Chen, I.-S. (1997) *Phytochem.* **44**, 1383
- Varoglu, M and Crews, P (2000) *J. Nat. Prod.* **63**, 41
- Wilkinson, D.R., Garrone, R. and Vacelet, J. (1984) *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**, 519
- Wyllie, J. (1946) *CA* **40**, 2190
- Yamazaki, M, Horie, Y., Bae, K., Maebayashi, Y., Jisai, Y. and Fujimoto, H. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 2122
- Zhou, J. (1989) *Zhiwu Xuebao* **31**, 878; *CA* **113**, 94757

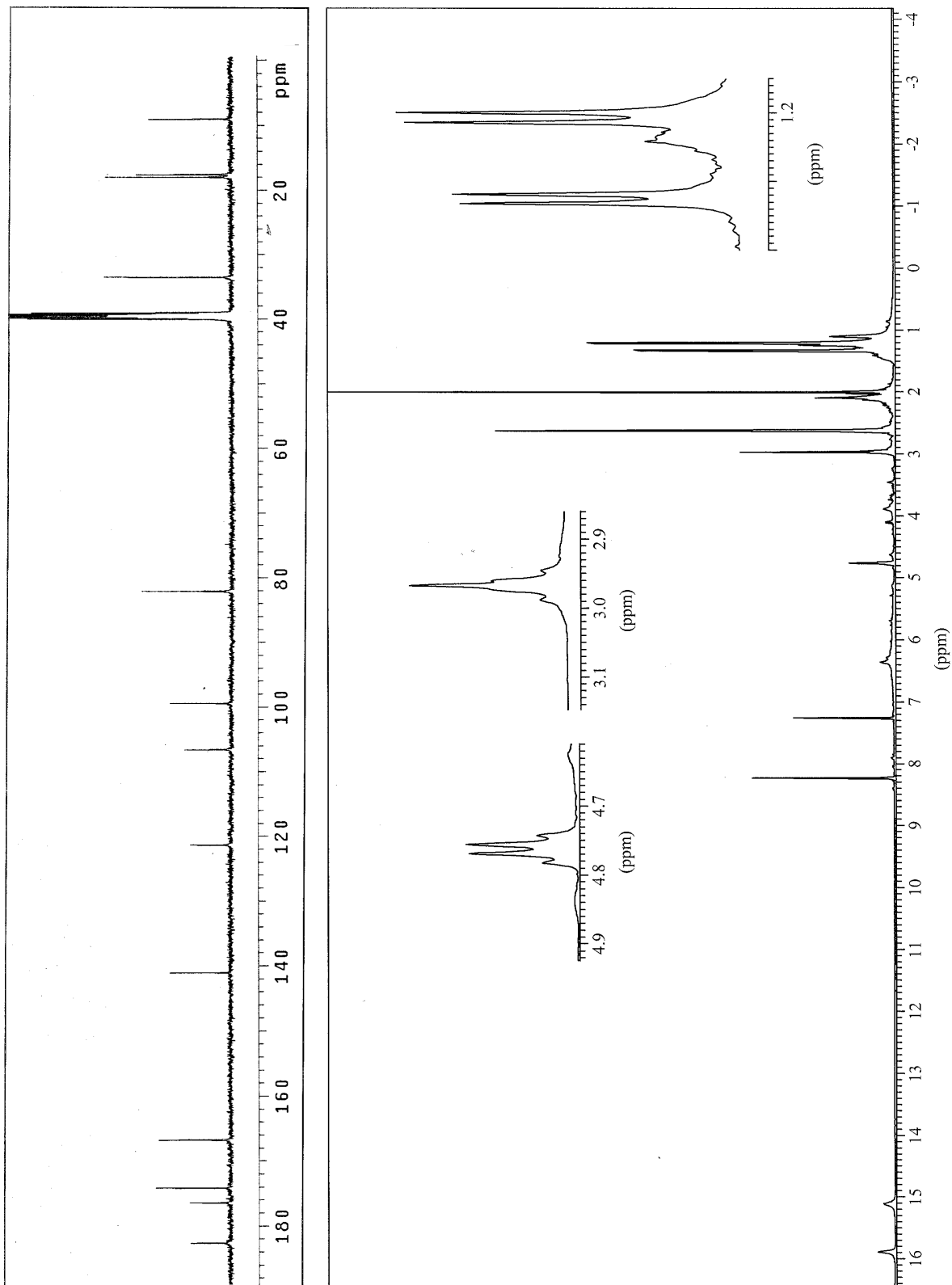
## 7. Anhang



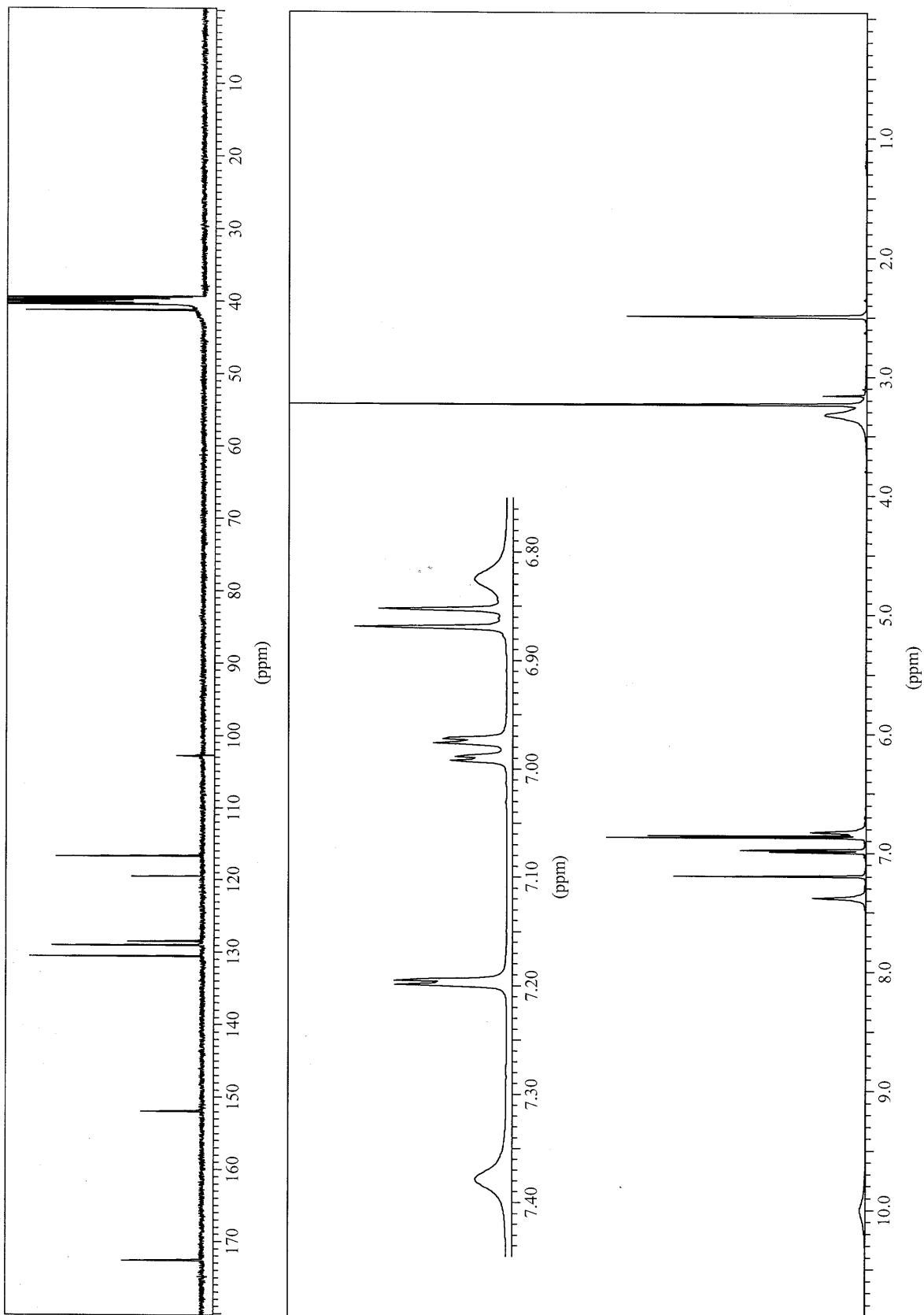
<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR von Cycloaszeptid A in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)



$^1\text{H}$ - (in  $\text{CDCl}_3$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{DMSO-d}_6$ ) von Citrinin (500 MHz)

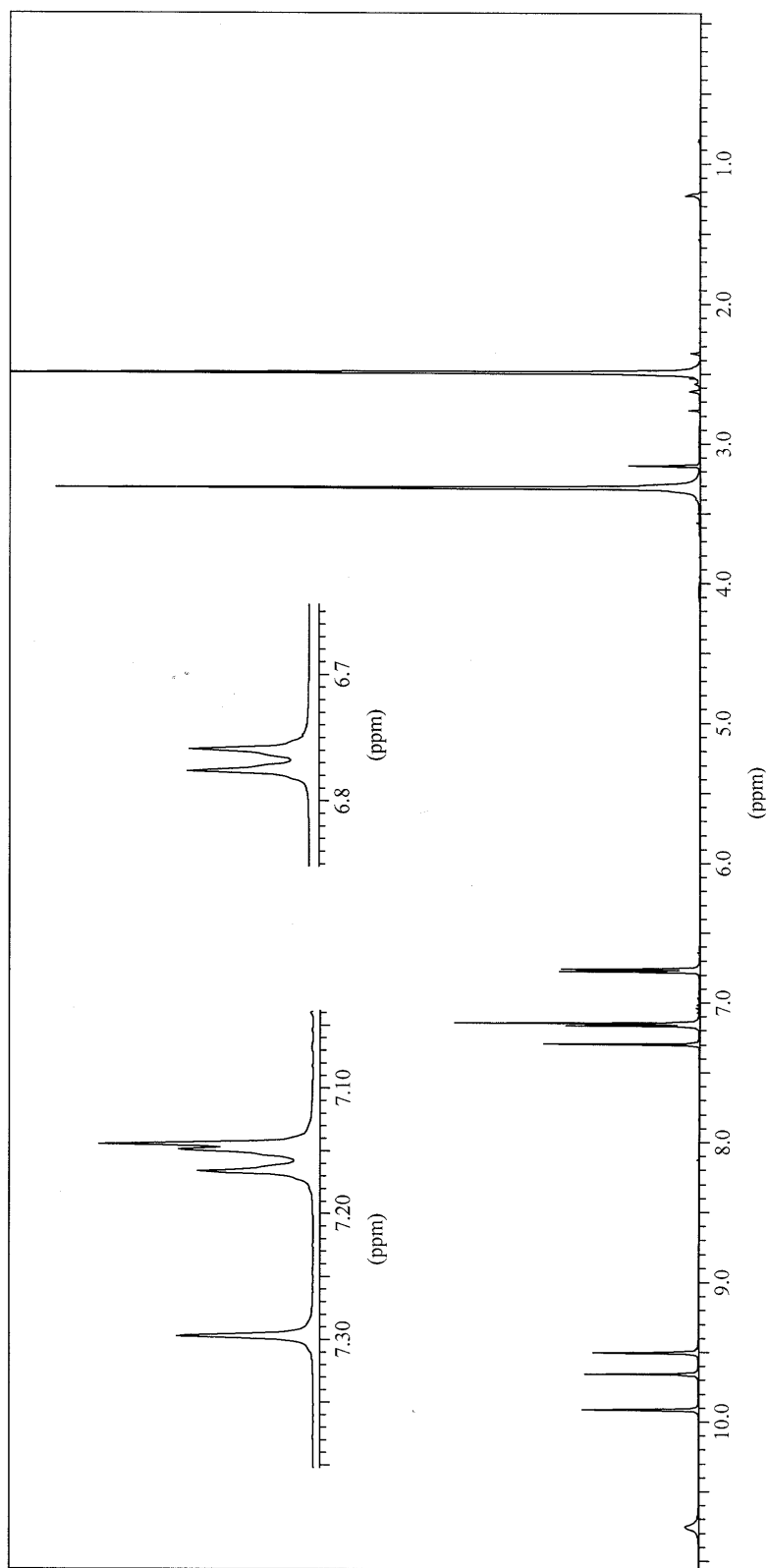
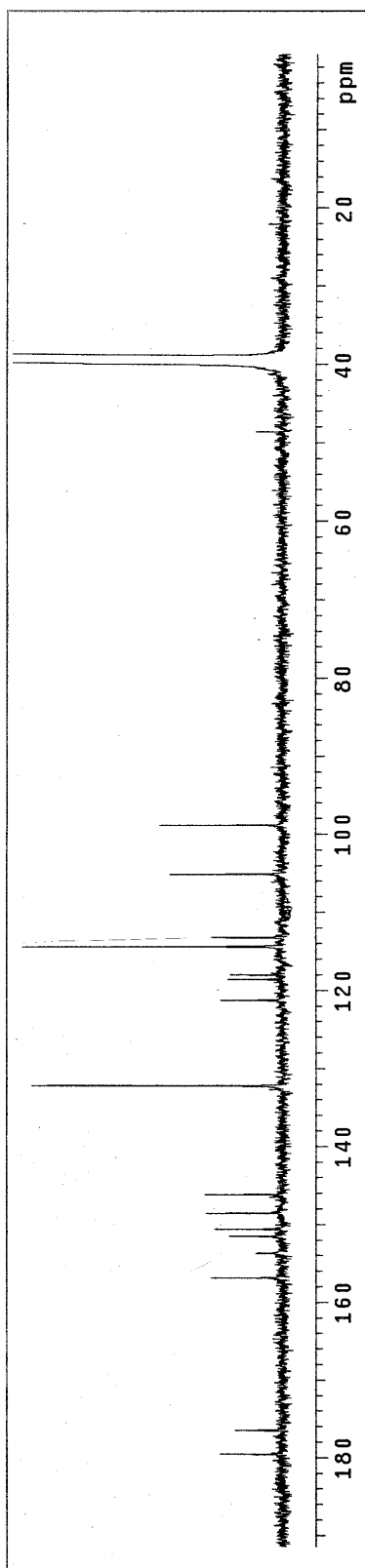


$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR des Phenyllessigsäureamids in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)

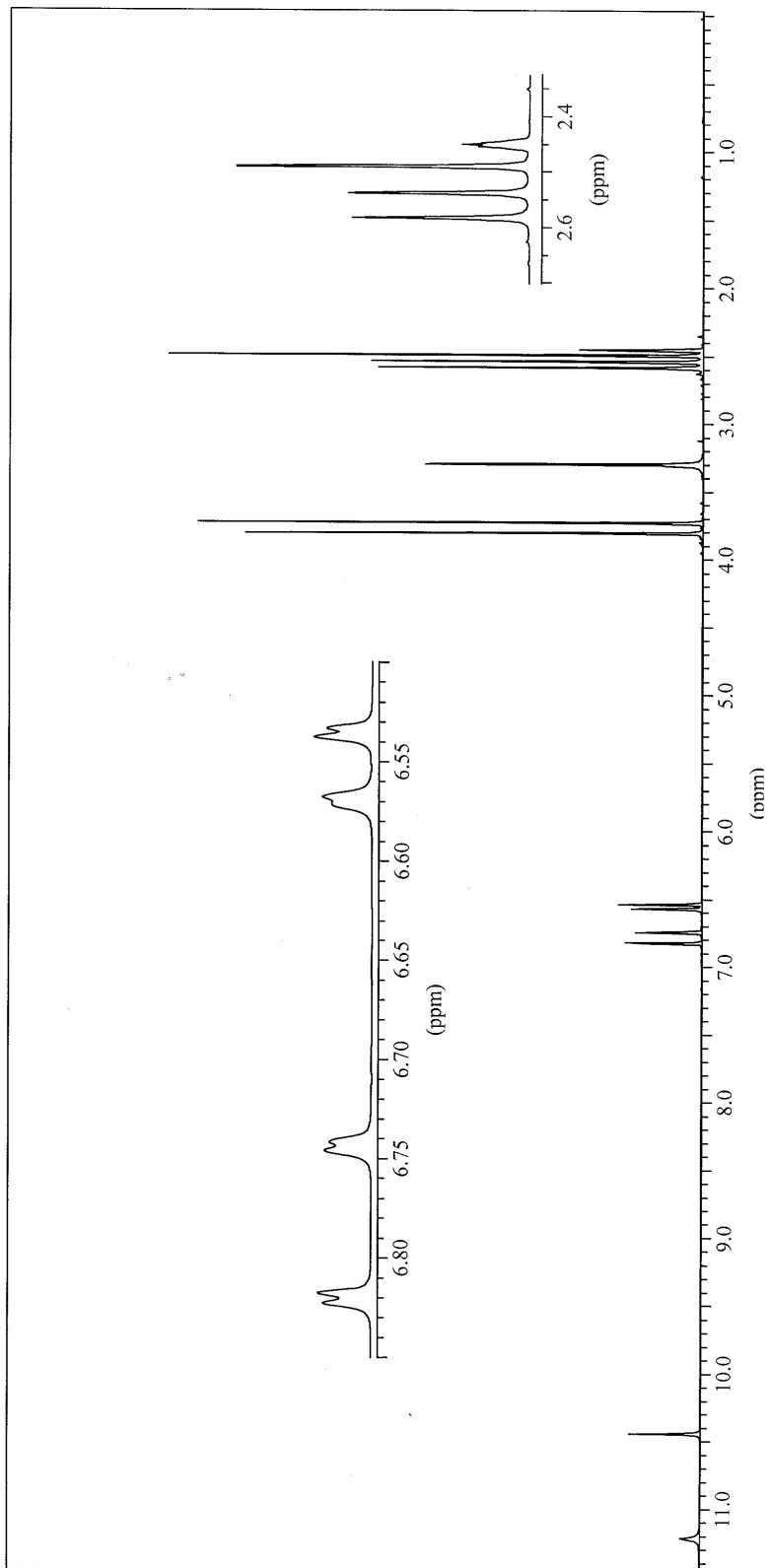
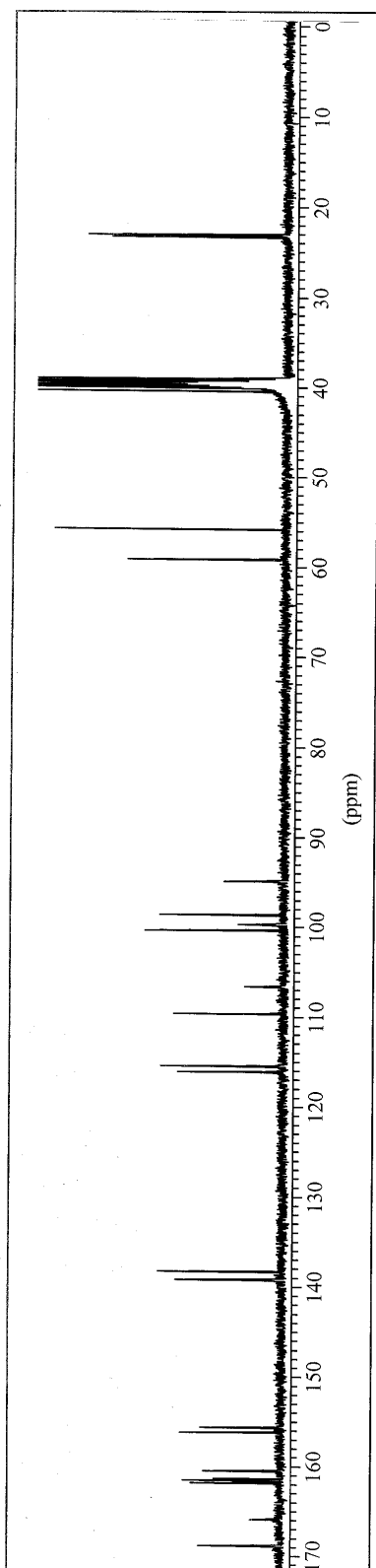




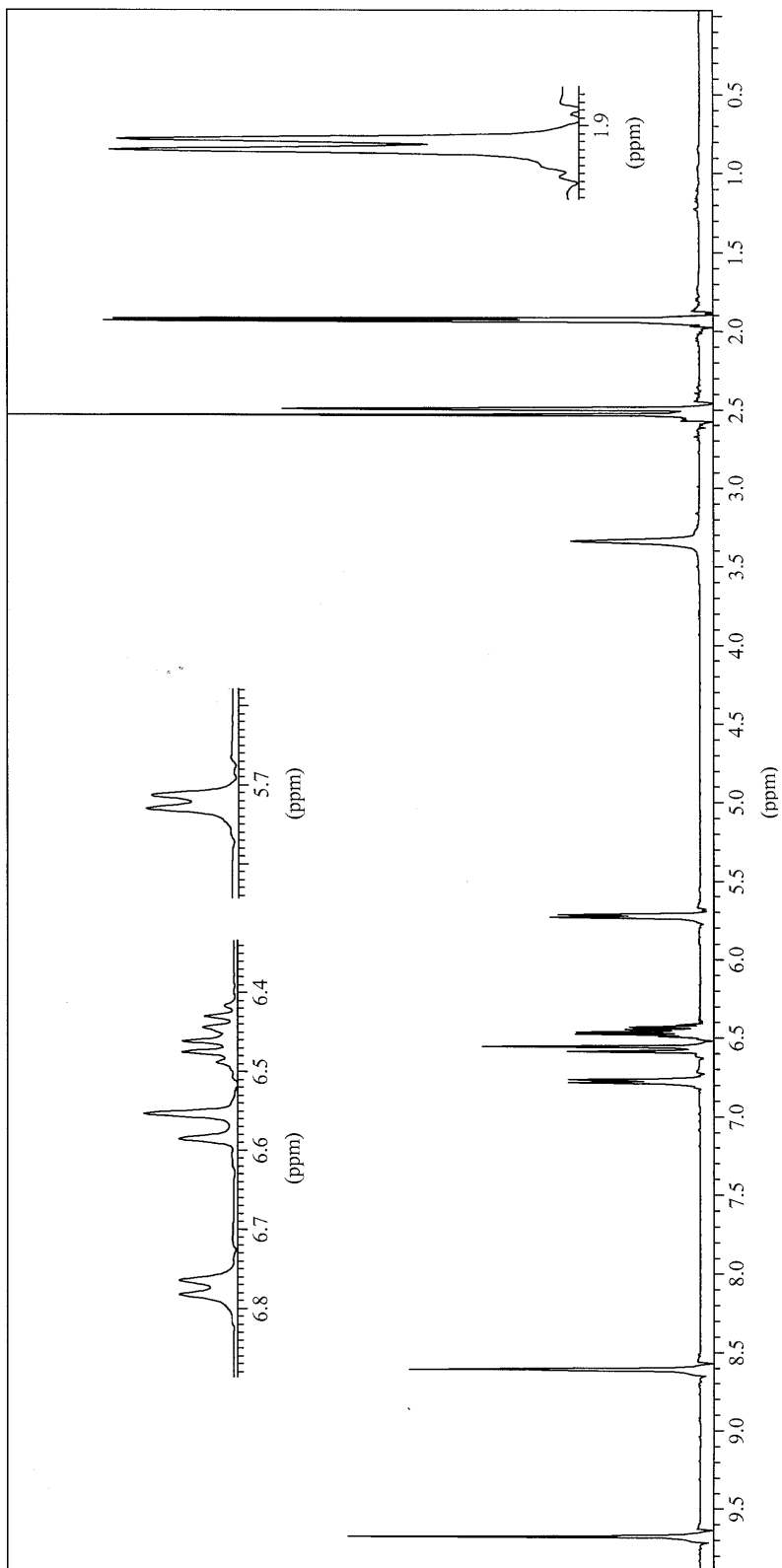
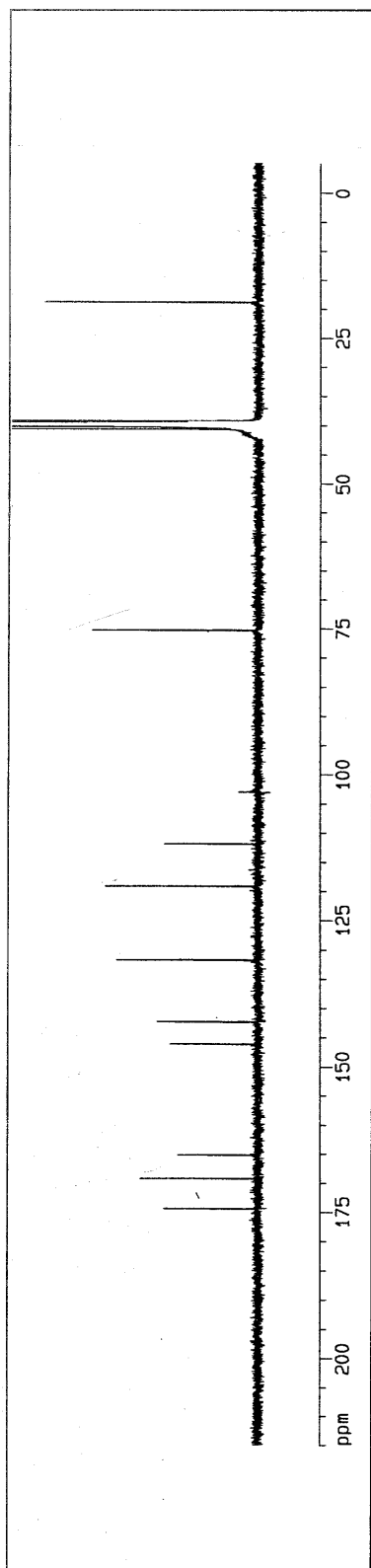
**$^1\text{H}$ - (in  $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (in  $\text{Aceton-d}_6$ )  
von Cycloleucomelon (500 MHz)**



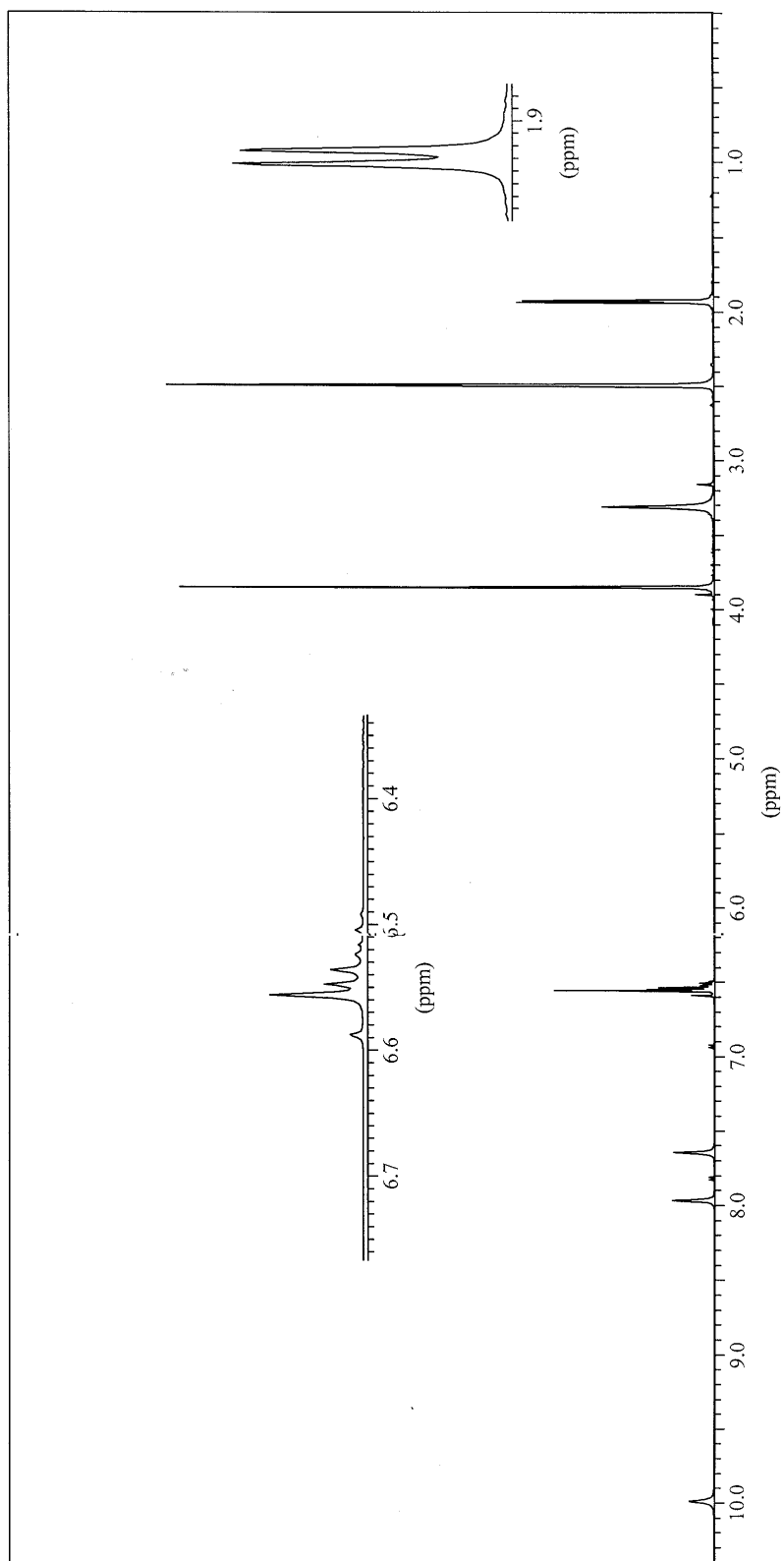
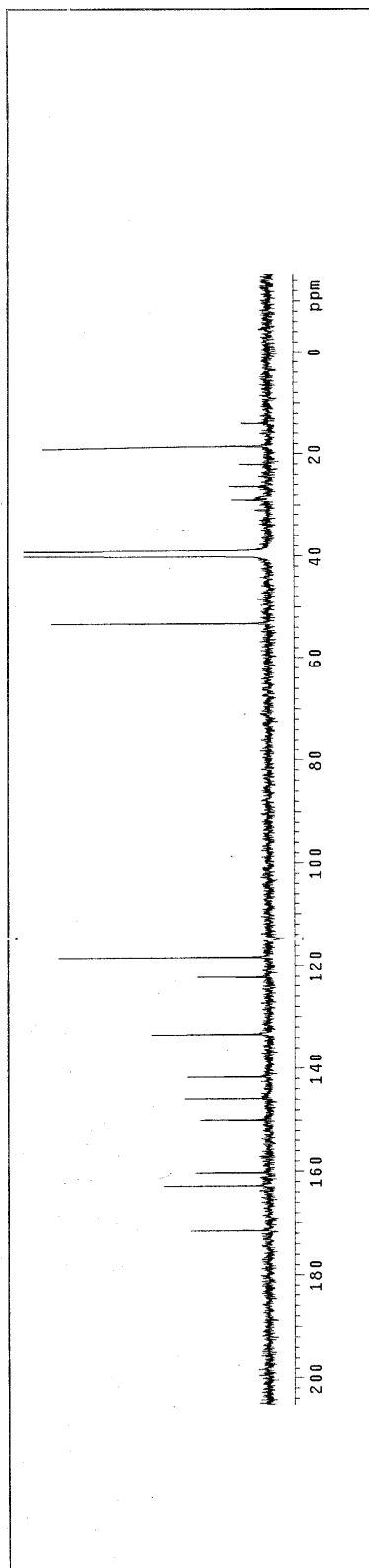
$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR des Biscumarin-Derivats in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)



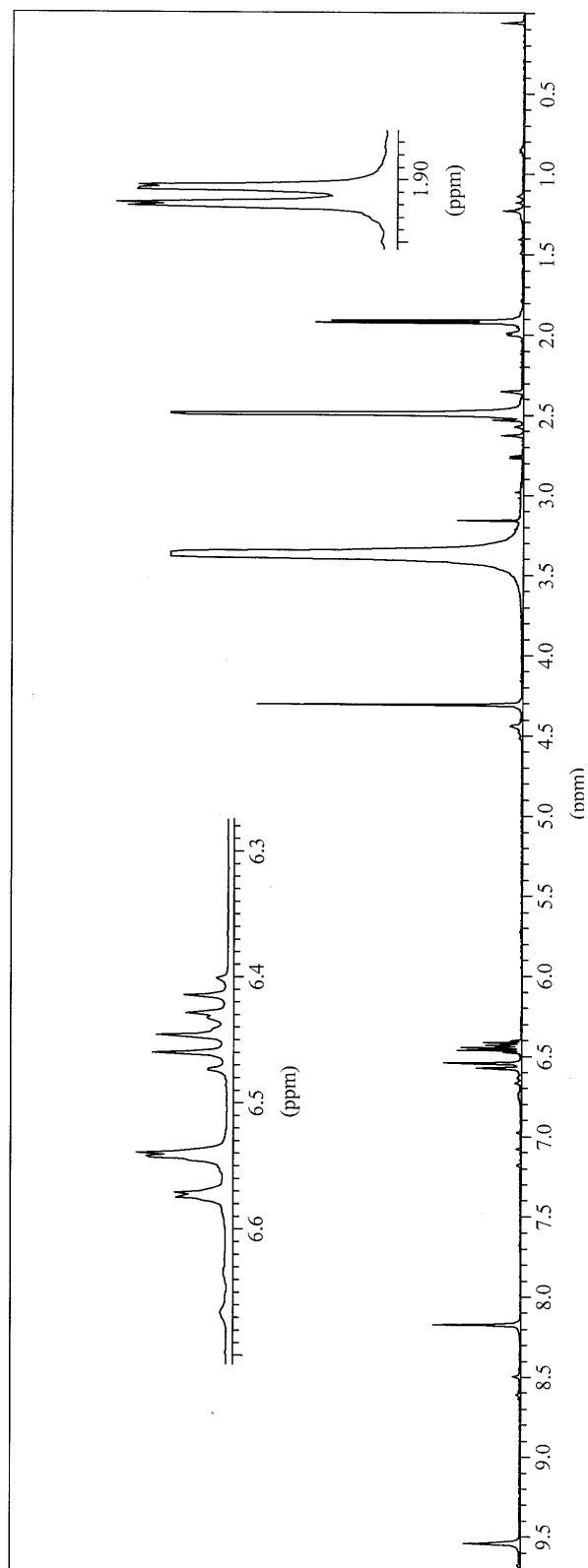
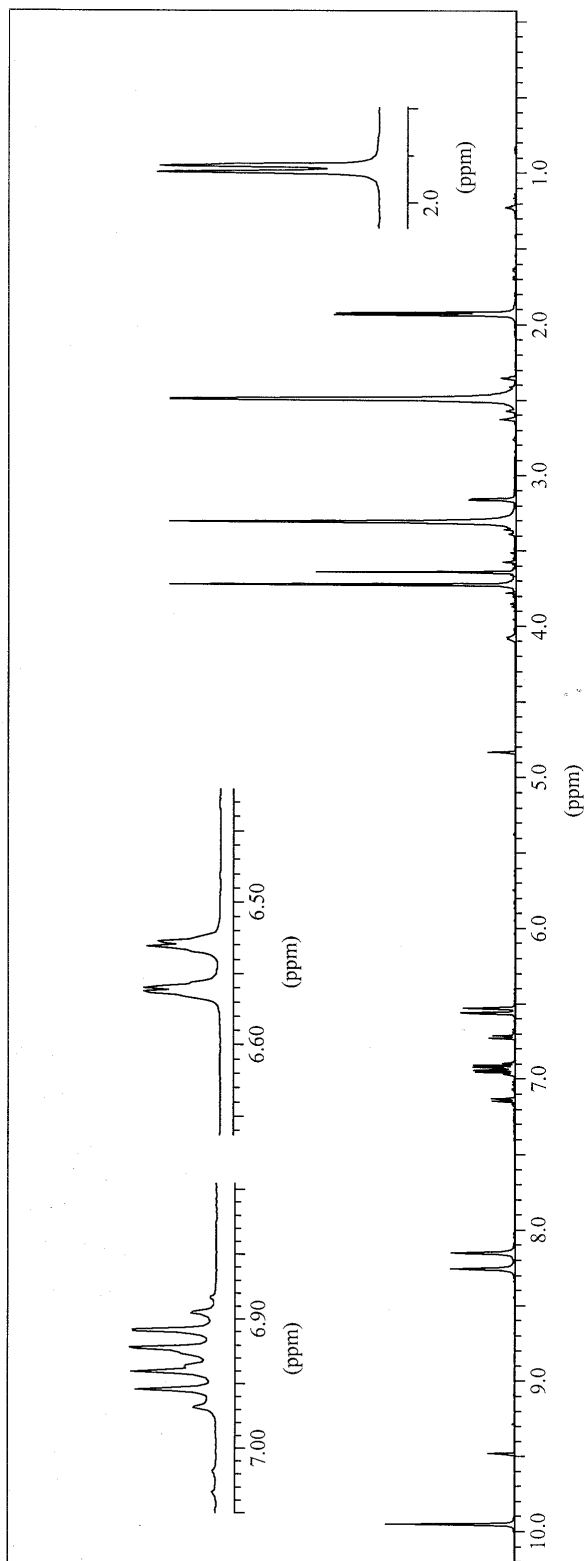
$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Pyranopyrrol A in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)



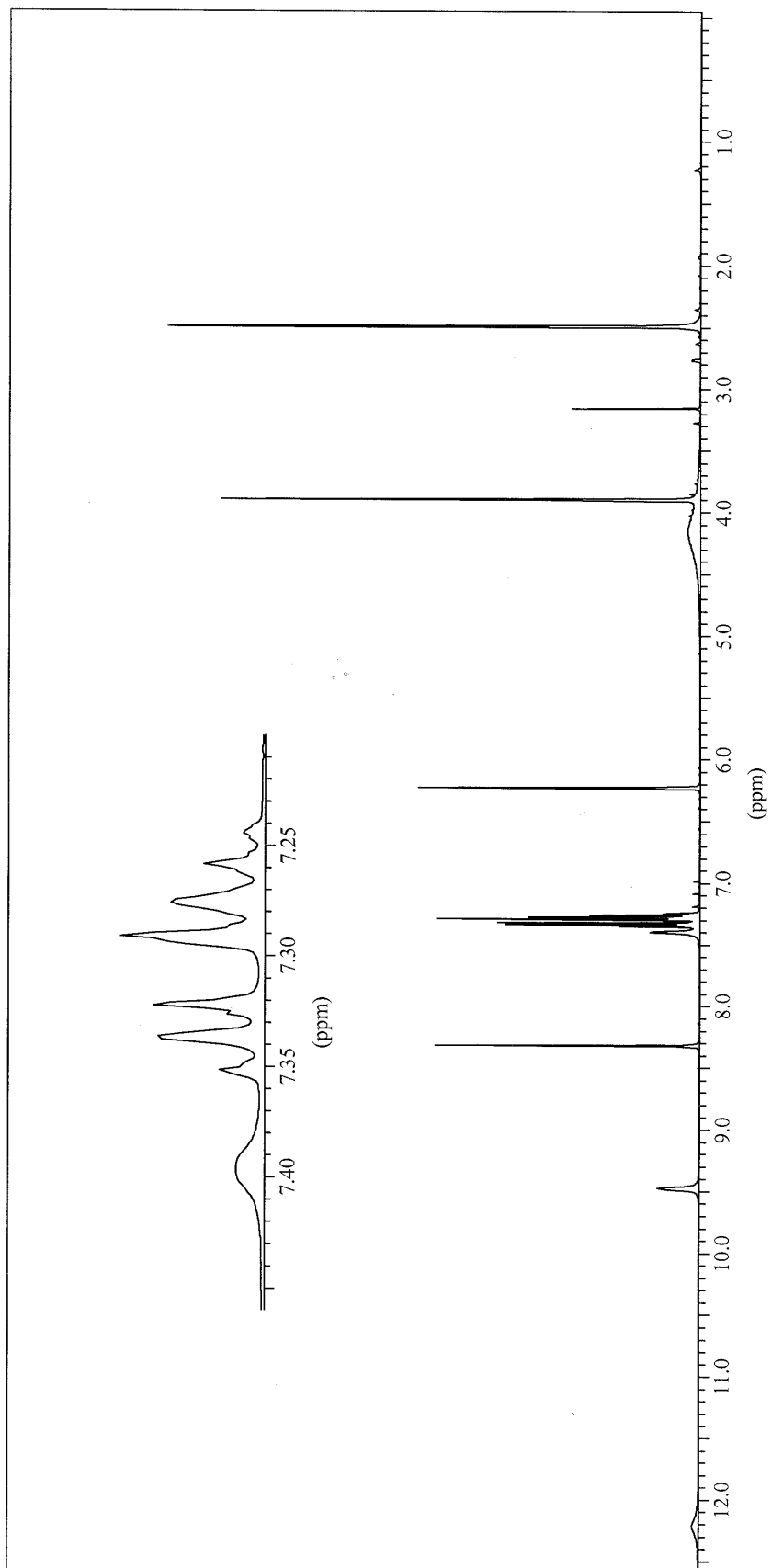
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Pyranopyrrol B in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)**



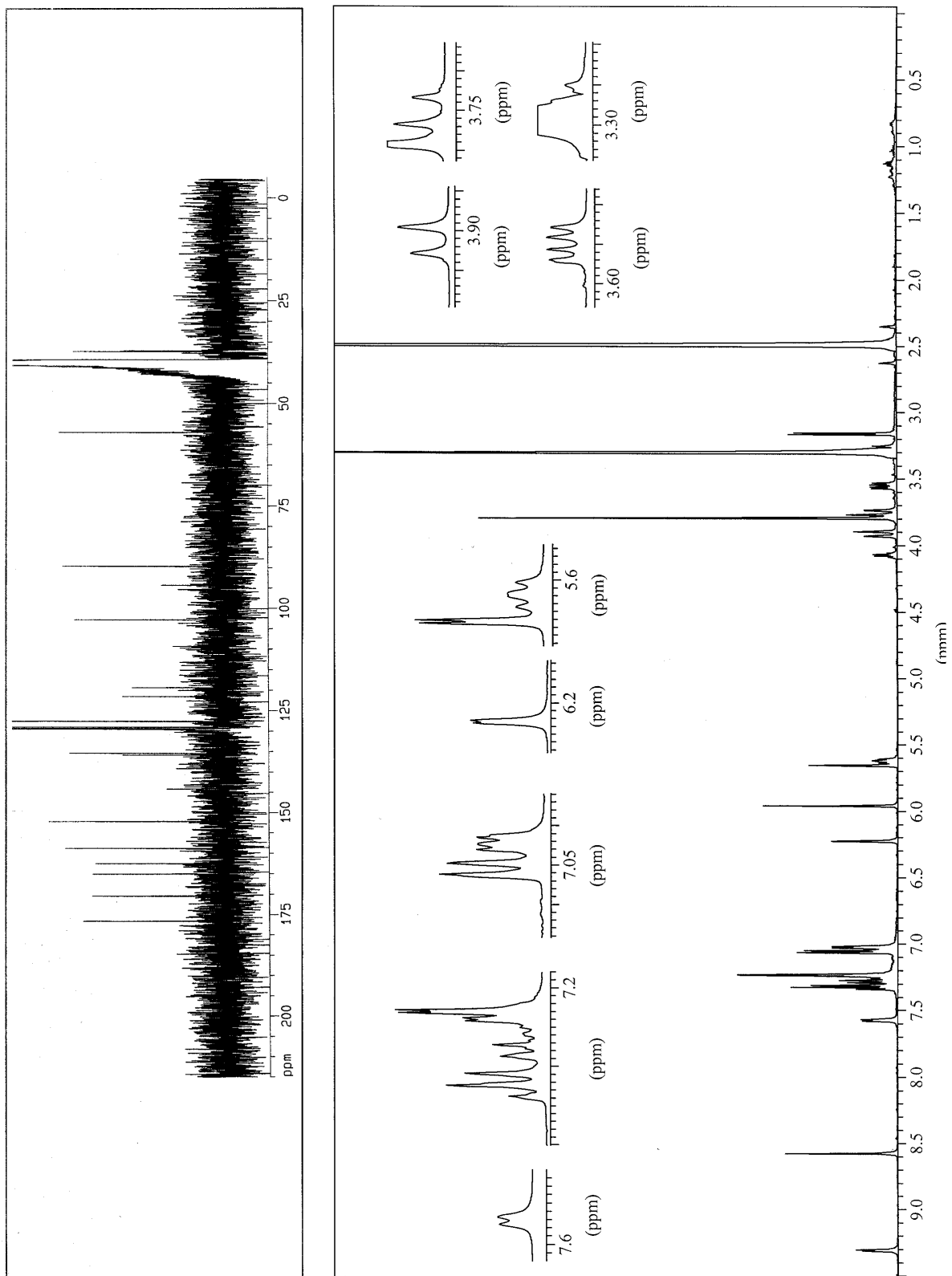
<sup>1</sup>H-NMR der Pyranopyrrole C (li.) und D (re.) in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)

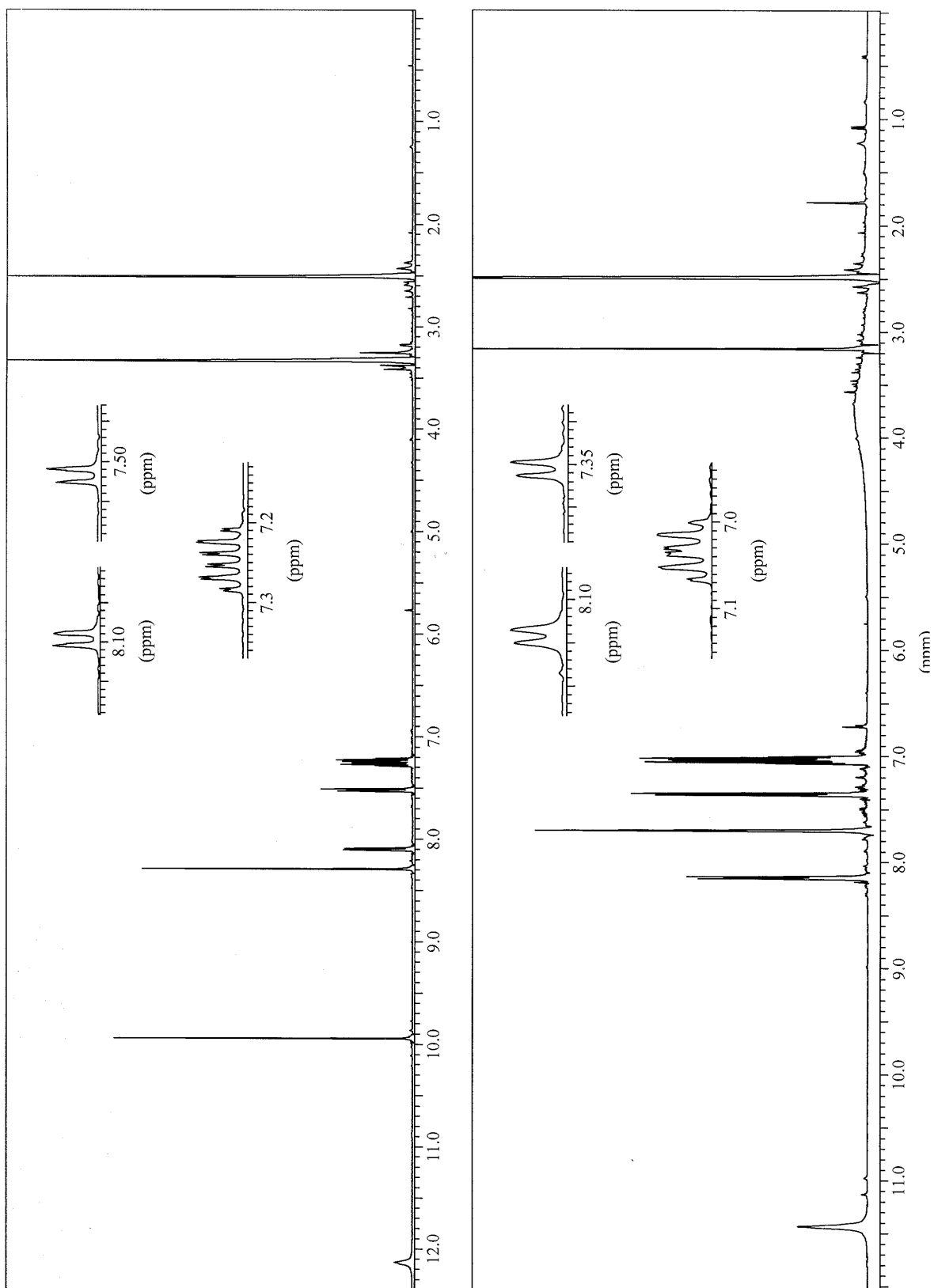


**<sup>1</sup>H-NMR von Benzylpyridin A in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)**



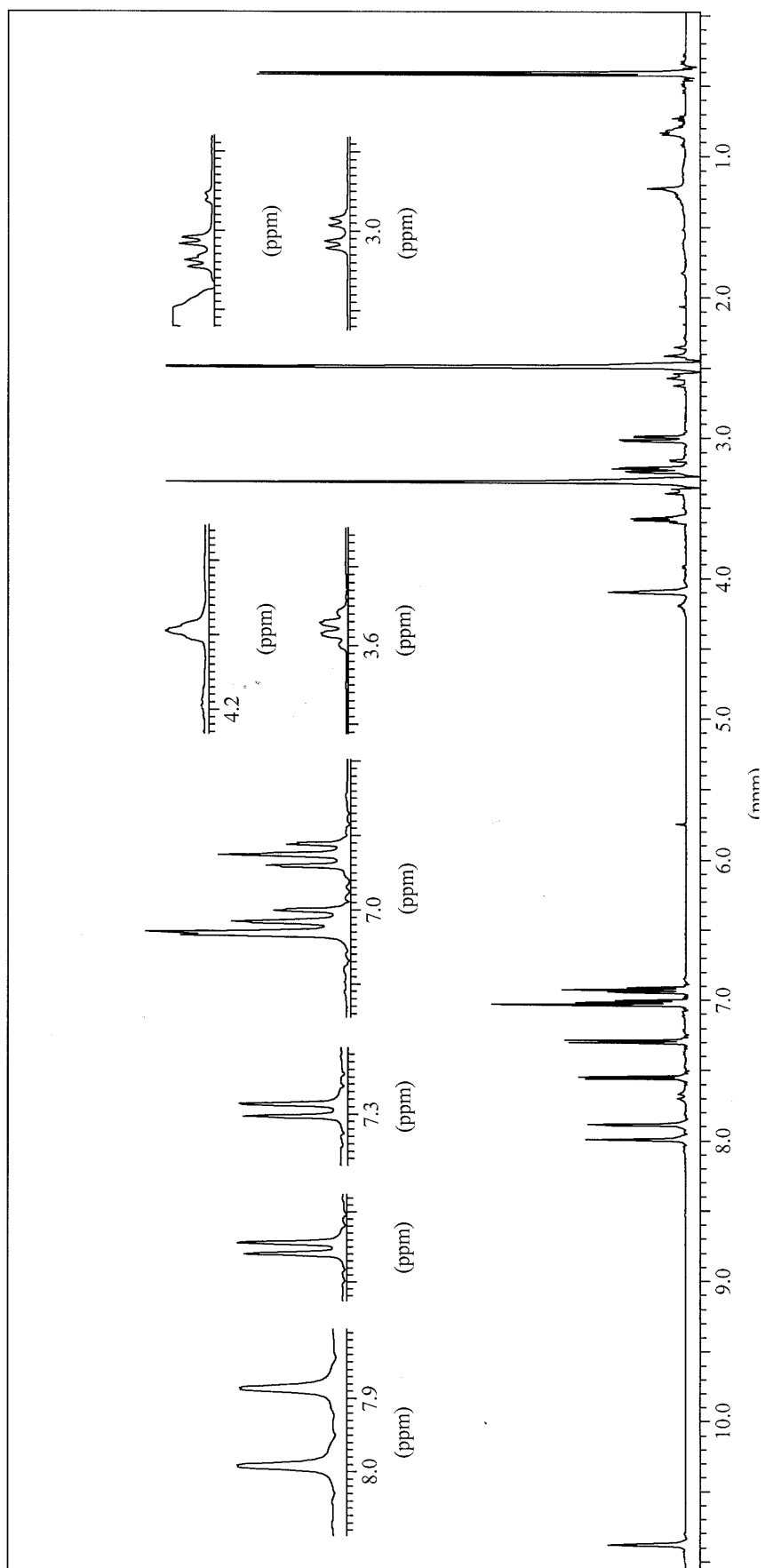
<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR von Benzylpyridin B in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)



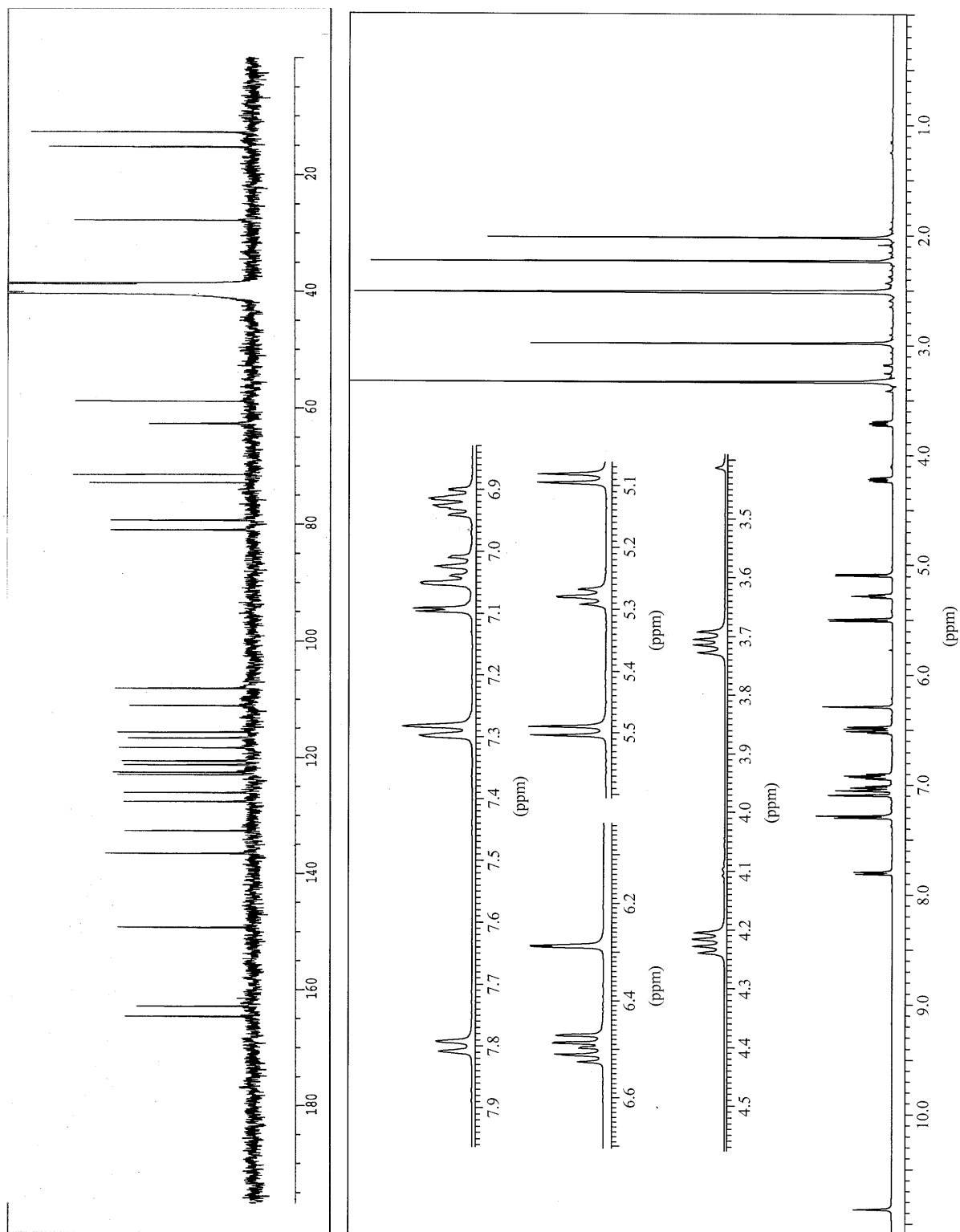
**$^1\text{H-NMR}$  der Indole A (links) und B (rechts) in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)**



<sup>1</sup>H-NMR von Cyclo(alanyltryptophyl) in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)



<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR des Leptosin-Derivats in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)



## 8. Abkürzungen

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Aceton-d <sub>6</sub>          | deuteriertes Aceton                                    |
| Abb                            | Abbildung  |
| b                              | breites NMR-Signal                                     |
| CDCl <sub>3</sub>              | deuteriertes Chloroform                                |
| CHCl <sub>3</sub>              | Chloroform   |
| COSY                           | Correlation Spectroscopy (i.d.R. ist H,H-COSY gemeint) |
| d                              | Dublett  |
| DC                             | Dünnschichtchromatographie                             |
| DEPT                           | Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer    |
| DMSO                           | Dimethylsulfoxid                                       |
| DMSO-d <sub>6</sub>            | deuteriertes Dimethylsulfoxid                          |
| DNA                            | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| DSMZ                           | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EI                             | Electron Impact Ionisation                             |
| ESI                            | Electrospray Ionisation                                |
| <i>et al.</i>                  | <i>et altera</i> (und andere)                          |
| EtOAc                          | Ethylacetat  |
| eV                             | Elektronenvolt   |
| Fa.                            | Firma  |
| FAB                            | Fast Atom Bombardment                                  |
| FG                             | Frischgewicht  |
| HMBC                           | Hetero Multinuclear Bond Coherence                     |
| HMQC                           | Hetero Multinuclear Quantum Coherence                  |
| HPLC                           | Hochleistungsflüssigchromatographie                    |
| HPLC-DAD                       | HPLC mit Diodenarray-Detektor                          |
| HPLC-UV                        | HPLC mit UV-Detektor                                   |
| HRMS                           | Hochauflösende Massenspektrometrie                     |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Schwefelsäure  |
| Hz                             | Hertz  |
| IC                             | Inhibitory Concentration                               |
| IR                             | Infrarot   |

## Abkürzungen

|                |  |
|----------------|--|
| LC-MS          | HPLC mit Massendetektor                      |
| Lsg            | Lösung                                       |
| m              | Multiplett                                   |
| M              | Molar  |
| MeOH           | Methanol                                     |
| min.           | Minute                                       |
| MPLC           | Mitteldruckflüssigchromatographie            |
| MS             | Massenspektrometrie                          |
| MTT            | Microculture Tetrazolium Assay               |
| m/z            | Masse pro Ladung                             |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear Factor of $\kappa$ B                 |
| ng             | Nanogramm                                    |
| nm             | Nanometer                                    |
| NMR            | Nuclear Magnetic Resonance                   |
| NOESY          | Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy |
| pH             | Wasserstoffionen-Exponent                    |
| ppm            | part per million                             |
| q              | Quartett                                     |
| rel. int.      | relative intensity                           |
| R <sub>f</sub> | Retentionsfaktor                             |
| RNA            | Ribonukleinsäure                             |
| RP             | Reversed Phase                               |
| SC             | Säulenchromatographie                        |
| s              | Singulett                                    |
| t              | Triplett                                     |
| Tab.           | Tabelle                                      |
| UV             | Ultraviolett                                 |
| Vgl            | Vergleich                                    |
| VLC            | Vakuumflüssigchromatographie                 |
| $\mu$ g        | Mikrogramm                                   |
| $\mu$ l        | Mikroliter                                   |
| $\mu$ M        | Mikromol                                     |



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sehr herzlich bedanken.

All meinen Kollegen und Kolleginnen am Institut danke ich für die Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima, anregende Diskussionen über Gott und die Welt, Postkarten aus aller Herren Länder, das montägliche Fußballtraining und diverse Pizza-, Raclette- und Grill-Abende.

Insbesondere möchte ich mich bedanken:

bei Hefni Effendi für die schöne Zeit in unserem gemeinsamen Labor mit Musik, Blumen und dem entwaffnendsten Lachen, daß ich je erlebt habe,

bei meinem "Doktorbruder" Rainer Ebel und bei RuAn Edrada für die vielen Momente, in denen sie mir weitergeholfen haben, wenn ich nicht mehr weiter wußte und bei Rainer im speziellen für die unvergesslichen Diskussionen über NMR-Spektren bzw. Fußball, Formel 1 und Politik,

bei den Exil-Würzburgern Raquel, Chaidir und Gernot, die mit mir gemeinsam den Umzug vom schönen Unterfranken ins fröhliche Rheinland gemeistert haben,

bei Franka dafür, daß sie die Marfey-Methode bei uns etabliert hat und für ihre große Hilfe bei der Anwendung dieser Methode auf Cycloaspeptid A,

bei Yvonne für die tatkräftige Unterstützung beim Screening und für die Isolierung des Citrinins und außerdem

bei meiner Lieblingskollegin und Freundin Bärbel für die schöne Zeit, die wir seit letztem Jahr haben und dafür, daß Du mich so toll unterstützt hast in den letzten Wochen und Monaten. Danke!!!

Desweiteren bedanke ich mich sehr herzlich:

bei unseren TAs unter anderem für den Lösungsmittelservice und speziell bei Waltraud für die Unterstützung beim Aufbau des neuen Instituts in Düsseldorf, bei Katja für ihren unermüdlichen Einsatz für diverse Vertragsverlängerungen und bei Frau Borstel für die Entwicklung der Aufnahmen aus der Transmissions-elektronenmikroskopie,

beim harten Kern des "Green Teams" bzw. "Ayam Kampung Teams": Carsten, Chaidir, Haofu, Jeep, Gernot, Gero, Yasman, Ziyad und allen anderen für viele schöne Stunden aufm Platz,

bei all denen, die an diesem Institut dazu bereit waren, ein wenig Verantwortung zu übernehmen und nicht nur an die eigene Arbeit zu denken, in dem Wissen, daß jeder etwas dazu beitragen muß, damit wir alle gute Arbeitsbedingungen haben,

bei meinem Patenonkel für die richtigen Tips in den wichtigen Momenten und für die vielen wertvollen Lehrbücher, die mir v.a. während der Prüfungsvorbereitung eine große Hilfe waren,

bei den externen Mitgliedern des Elba-Teams für schöne & produktive Exkursionen:

- Dr. Karsten und Heidrun Schaumann sowie Steffan Steffens (AWI, Bremerhaven)
- Rüdiger Stöhr und Vanessa Grabowski vom IFM in Kiel
- Markus Heubes und Gerhard Lang aus der OC der Uni Würzburg und vor allem

bei Ilka Friedrich, Christian Lott, Andreas Spohr und Boris Unger vom Institut für Meereswissenschaften in Fetovaia für die tolle Unterstützung und

bei Prof. Lin an der Peking University für 120 unvergessliche Tage in Peking, für seine für unsere Verhältnisse unvorstellbare Gastfreundschaft und dafür, daß er mir geduldig die ersten selbständigen Schritte in der Strukturaufklärung beigebracht hat.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bedanken:

bei Anja Friedrich sowie Prof. Krohne und Claudia Gehrig in der Elektronenmikroskopie der Uni Würzburg für die Hilfe bei der Anfertigung und dem Mikroskopieren der elektronenmikroskopischen Präparate,

bei Prof. van Soest an der Universität in Amsterdam für die Identifizierung der Schwämme,

bei Dr. V. Wray für von der GBF in Braunschweig für die Messung vieler NMR-Spektren und die Hilfe bei der Interpretation der Daten,

bei Dr. K. Steube von der DSMZ in Braunschweig für die Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests mit den Reinsubstanzen,

bei den Mitarbeitern des NMR-Services des Instituts für Anorganische und Strukturchemie I der Uni Düsseldorf für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und

beim BMBF und der Zentaris AG für die Finanzierung des Projekts "Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen".

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meinen Eltern bedanken. Meinem Vater dafür, daß er für mich 17 Jahre lang ein Vater war, wie man ihn sich nur wünschen kann und meiner Mutter dafür, daß sie, auch nachdem mein Vater gestorben war, mich immer darin bestärkt hat, meinen eigenen Weg zu gehen, daß sie mir für diesen Weg all das mitgegeben hat, was man unterwegs benötigt und dafür, daß sie, immer wenn es nötig war, die richtigen Worte gefunden hat, um mich wieder aufzumuntern. Vielen lieben Dank für alles!!!



## Lebenslauf

|                  |  |
|------------------|--|
| Name             | Jan Hiort  |
| Geburtsdatum     | 30.09.1973   |
| Geburtsort       | Marburg an der Lahn  |
| Adresse          | Gutenbergstrasse 102, 50823 Köln   |
| Schule           |  |
| 1979 - 1983      | Riederbergschule, Wiesbaden  |
| 1983 - 1992      | Leibnizschule, Wiesbaden; Abitur   |
| Ersatzdienst     |  |
| 1992 - 1993      | Johanniter-Unfall-Hilfe, Marburg; Rettungssanitäter  |
| Berufsausbildung |  |
| 1993 - 1995      | Studium der Biologie an der Technischen Universität in München   |
| 1995 - 1998      | Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg; Diplom   |
| Okt. - Nov. 1996 | Institut für Molekulare Biologie der Genetik am Max-Planck-Institut für Biochemie in München                                 |
| Jan. - Feb. 1997 | Institut für Metabolismusforschung der Bayer AG, Pflanzenschutzzentrum Monheim   |
| Mai - Juni 1997  | Analytisches Labor der MCM Klosterfrau GmbH & Co. in Köln  |
| 1998 - 1999      | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg          |
| 2000 - 2002      | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf            |
| März - Juni 2002 | Stipendium des CNCBD und Forschungsaufenthalt im National Key Laboratory for Biomimetic and Natural Drugs, Peking University |

Düsseldorf, den 18.12.2002

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation "Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres. Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung der biologischen Aktivität" selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des weiteren erkläre ich, daß ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf, den 18.12.2002

Jan Hiort