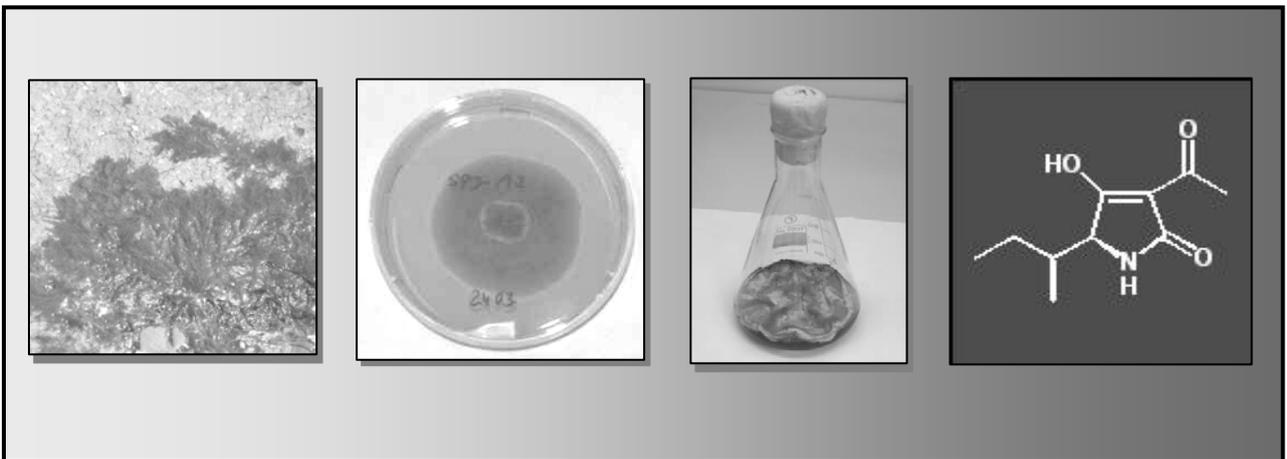


Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassozierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans



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

vorgelegt von
Franka Teuscher
aus Rostock

Düsseldorf, 2005

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch

Koreferent: Dr. Rainer Ebel, Juniorprofessor

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2005

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. P. Proksch

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

Bei Herrn Prof. Dr. P. Proksch möchte ich mich ganz herzlich für die sehr interessante und
vielseitige Themenstellung bedanken. Besonderen Dank auch für die wissenschaftliche
Betreuung, die sehr guten Arbeitsbedingungen und die Ermöglichung der
Forschungsaufenthalte in China und Indien.

Herrn Dr. R. Ebel danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates sowie die
wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotionszeit.

1. Einleitung

1.1.	Naturstoffe als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe	1
1.2.	Naturstoffe mariner Herkunft	2
1.3.	Bioaktive Naturstoffe aus marinen Pilzen	3
1.4.	Bioaktive Naturstoffe aus endophytischen Pilzen	5
1.5.	Quellen mariner endophytischer Pilze und Pilze mariner Herkunft	7
1.6.	Zielsetzung dieser Arbeit	12

2. Material und Methoden

		14
2.1.	Marine Algen und Mangroven als Quelle für die Isolierung endophytischer Pilze	14
2.1.1.	Sammlung des Materials- Beschreibung der Sammelplätze	14
2.1.2.	Gesammelte Spezies	15
2.1.2.1.	Marine Algen Vizhinyam (Indien)	15
2.1.2.2.	Marine Algen Qingdao (China)	15
2.1.2.3.	Mangrovenspezies aus Hainan (China)	16
2.1.2.4.	Taxonomie der untersuchten marinen Pilze sowie ihrer Wirtspflanzen	17
2.1.3.	Isolierung der Endophyten aus den Wirtspflanzen und Anlage von Flüssigkulturen	20
2.1.4.	Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	21
2.1.5.	Extraktion der Standkulturen	22
2.1.6.	Extraktion des Algenmaterials zum Vergleich der Inhaltsstoffmuster	22
2.2.	Marine Schwämme als Quelle für die Isolierung assoziierter Pilze	23
2.2.1.	Sammlung des Materials - Beschreibung des Sammelplatzes	23
2.2.2.	Isolierung von <i>Alternaria alternata</i> (SPI-A2) aus <i>Axinella tenudigata</i> und Anlage von Flüssigkulturen	23
2.2.3.	Extraktion der Standkulturen	23
2.3.	Testung auf biologische Aktivität	25
2.3.1.	Allgemeine Toxizität	25
2.3.2.	Antibiotische und fungizide Aktivität	25
2.3.2.1.	Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	27
2.3.3.	Zytotoxizität	27
2.4.	Identifizierung der untersuchten Pilzstämmе	28
2.4.1.	Identifizierung durch morphologische Charakterisierung	28
2.4.2.	Identifizierung anhand der Pilz-DNA	29
2.4.2.1.	Isolierung der DNA	29

2.4.2.2. Amplifizierung der DNA mittels PCR	30
2.4.2.3. Auftrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4.2.4. Reinigung des PCR-Produktes	31
2.4.2.5. Sequenzierung der DNA	31
2.4.2.6. Verwendete Geräte/Chemikalien	32
2.5. Isolierung der Naturstoffe aus den Pilzen	32
2.5.1. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)	32
2.5.2. Säulenchromatographie (SC)	33
2.5.3. Semipräparative HPLC	33
2.5.4. Flüssig/Flüssig-Verteilungs-Chromatographie (FCPC)	34
2.5.5. Dünnschichtchromatographie (DC)	34
2.5.6. Analytische HPLC	35
2.5.7. HPLC-MS	35
2.6. Identifizierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe	37
2.6.1. UV-Vis-Spektroskopie	37
2.6.2. Massenspektrometrie (MS)	37
2.6.3. NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	38
2.6.4. Optische Drehung	39
2.6.5. Bestimmung der absoluten Konfiguration von Aminosäuren	40
2.7. Verwendete Geräte und Chemikalien	41
2.7.1. Geräte	41
2.7.2. Chemikalien	41
3. Ergebnisse	
	<hr/>
	44
3.1. Ergebnisse der Bearbeitung der algenassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)	44
3.1.1. Screening auf Bioaktivität	44
3.1.2. Inhaltsstoffe aus <i>Aspergillus niger</i> (ENI-P2, ENI-D1)	45
Pyranonigrin A, B, C	45
Fonsecin	48
3.1.3. Inhaltsstoffe aus <i>Fusarium semitectum</i> var. <i>majus</i> (ENI-P9)	50
Desoxyfusapyron	50
Fusapyron	52
3.1.4. Inhaltsstoffe aus <i>Aspergillus terreus</i> (ENI-P5)	56
Dihydrogeodin	57
3.1.5. Inhaltsstoffe aus ENI-P4	61
3.1.6. (+)-Abscisinsäure	61
3.1.7. Inhaltsstoffe aus <i>Eurotium amstellodami</i> (ENI-C1)	63

Paxillin	64
3.1.8. Inhaltsstoffe aus <i>Aspergillus sydowii</i> (ENI-A1)	64
Hydroxysydonsäure	68
Sydonsäure	72
Sydowsäure	75
S15	79
S16	85
3.2. Ergebnisse der Bearbeitung der algenassoziierten Pilze aus Qingdao (China)	90
3.2.1. Screening auf Bioaktivität	90
3.2.2. Inhaltsstoffe aus <i>Alternaria tenuissima</i> (QEN-4)	91
Tenuazonsäure	91
3.2.3. Inhaltsstoffe aus <i>Chaetomium globosum</i> (QEN-2)	91
Aureonitol	91
3.2.4. Inhaltsstoffe aus <i>Cladosporium</i> sp. (QEN-6)	95
Viridicatol	95
Viridicatin	99
Cyclopenol	102
3.2.5. Inhaltsstoffe aus <i>Chaetomium globosum</i> (QEN-11)	105
Neoechinulin A	105
Cladosporin	108
5'-Hydroxyasperentin-8-methylether	112
4'-Hydroxyasperentin	114
5'-Hydroxyasperentin	116
Asperentin-8-methylether	117
3.3. Ergebnisse der Bearbeitung der mangrovenassoziierten Pilze aus Hainan (China)	119
3.3.1. Screening auf Bioaktivität	119
3.4. Ergebnisse der Bearbeitung der schwammassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)	120
3.4.1. Screening auf Bioaktivität	120
3.4.2. Inhaltsstoffe aus <i>Alternaria alternata</i> (SPI-A2)	121
Tenuazonsäure	121
Djalonenson	125
Alternariol	127
3.5. Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Stoffwechsel mariner Pilze	129
3.5.1. Einfluss der Wirt-Endophyt-Wechselwirkung auf die Bildung von Sekundärstoffen	129
3.5.2. Einfluss des Zusatzes von getrockneter Wirtspflanze zum Kulturmedium auf das Wachstum	130
3.5.3. Einfluss der Salinität auf die Bildung von Sekundärstoffen	130
3.5.4. Die Bildung von Sekundärstoffen in Abhängigkeit von der Zeit	135

3.5.5. Vergleich der Bioaktivitäten mariner Pilze der gemäßigten und tropischen Klimate	138
---	-----

3.6. Bestimmung der absoluten Konfiguration der Schwamminhaltsstoffe Callyaerin A-F	141
--	------------

3.6.1. Bestimmung der biologischen Aktivität von Callyaerin A-F	145
---	-----

4. Diskussion

146

4.1. Algen, Schwämme und Mangroven als Quelle mariner Pilze	146
--	------------

4.2. Marine Pilze als Produzenten chemisch diverser, bioaktiver Naturstoffe	148
--	------------

4.2.1. Naturstoffe der Gattung <i>Aspergillus</i>	149
---	-----

4.2.2. Naturstoffe der Gattung <i>Fusarium</i>	154
--	-----

4.2.3. Inhaltsstoffe von ENI-P4	155
---------------------------------	-----

4.2.4. Naturstoffe der Gattung <i>Chaetomium</i>	155
--	-----

4.2.5. Naturstoffe der Gattung <i>Cladosporium</i>	157
--	-----

4.2.6. Naturstoffe der Gattung <i>Alternaria</i>	159
--	-----

4.3. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Stoffwechsel mariner Pilze	161
--	------------

4.4. Einfluss des Klimafaktors auf die Bioaktivität mariner Pilze	163
--	------------

4.5. Endophyten und Pilze mariner Herkunft als Produzenten oder Mitproduzenten von Naturstoffen aus marinen Algen und Schwämmen?	164
---	------------

5. Zusammenfassung

166

6. Literaturverzeichnis

171

7. Abkürzungen

178

1. Einleitung

1.2. Naturstoffe als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe

Seit Jahrtausenden werden Naturstoffe bereits in der traditionellen Medizin angewendet. Klinische, pharmakologische und chemische Untersuchungen derartiger Heilmittel, die hauptsächlich aus Pflanzen gewonnen wurden, führten zur Entdeckung der ersten und bis heute gebrauchten Arzneimittel wie Aspirin, Digitoxin, Morphin, Chinin und Pilocarpin [Butler 2004]. Zunehmende Resistenzbildung, das Wiederaufleben und die Ausbreitung von Krankheiten lassen heute die große Notwendigkeit der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Methoden zu ihrer Bekämpfung erkennen. Dabei sind Naturstoffe nach wie vor nicht wegzudenkende Leitstrukturen.

Gentechnik, Biokombinatorik, Synthesechemie und computergestützte Wirkstoffentwicklung haben besonders in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, werden aber das Ergebnis von jahrmillionenlangen Evolutionsprozessen nicht vollständig ersetzen können.

Aufgrund vielfältiger Selektionsprozesse im Laufe der Evolution zeigen Naturstoffe aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und marinen Organismen unvergleichbar große Diversität in Struktur und pharmakologischer Wirkung, die noch immer unzureichend untersucht ist. Die Suche nach neuen Arzneimitteln aus Naturstoffen kann heute durch ein umfassendes Wissen biologischer Wirkmechanismen effizienter gestaltet werden in Hinblick auf Spezifität und Effizienz der Wirkung, mögliche Nebenwirkungen und die wachsende Gefahr der Resistenzbildung [Knight 2003].

Dementsprechend stellen Naturstoffe und von Naturstoffen abgeleitete Wirkstoffe fortwährend einen bedeutenden Anteil unter den neu entwickelten Arzneimitteln dar. So betrug der Anteil an Naturstoffen unter den 100 meistverkauften Arzneimitteln im September 2002 weltweit 17% mit einem Marktwert von 28.9 Milliarden US\$ [Knight 2003]. Seit 1998 haben sich mindestens 21 neue Naturstoffe und von Naturstoffen abgeleitete Wirkstoffe auf dem europäischen, US-amerikanischen und japanischen Markt etabliert (Abb.I1) [Butler 2005].

Handelsname	Leitstruktur	Indikation	Handelsname	Leitstruktur	Indikation
Xenical ®	Lipstatin	Gewichtsreduktion	Funguard ®	FR901379	Antimykotikum
Wincef ®	Cephalosporin	Antibiotikum	Calsed ®	Doxorubicin	Zytostatikum
Synercid ®	Streptogramin A,B	Antibiotikum	Omegacin ®	Thienamycin	Antibiotikum
Valstar ®	Doxorubicin	Zytostatikum	Orfadin ®	Leptospermon	Antityrosinämikum
Adele, Adehl ®	Forskolin	Kardiotonikum	Zavesca ®	1-Deoxy-nojirimycin	anti-Gaucher-Therapeutikum
Artemotil ®	Artemisinin	Malaria-Therapeutikum	Myfortic ®	Mycophenolsäure	Immunosuppressivum
Invanz TM	Thienamycin	Antibiotikum	Crestor ®	Mevastatin	Lipidsenker
Cancidas ®	Pneumocandin	Antimykotikum	Livalo ®	Mevastatin	Lipidsenker
Ketek ®	Erythromycin	Antibiotikum	Cubicin TM	Daptomycin	Antibiotikum
Elidel ®	Ascomycin	Therapie von atop.Dermatitis	Certican TM	Sirolimus	Immunosuppressivum
Reminyl ®	Galantamin	Alzheimer-Therapeutikum			

Abb.I1: Von Naturstoffen abgeleitete Arzneimittel, die seit 1998 in den europäischen, US-amerikanischen oder japanischen Markt eingeführt wurden [Butler 2005]

1.2. Naturstoffe mariner Herkunft

Mit einem Anteil von 70% der Erdoberfläche sind die Ozeane der größte Lebensraum der Erde. Das marine Habitat stellt mit seinen besonderen Umgebungsbedingungen, wie dem hohen Salzgehalt, dem hohen Druck und den variablen pH-Werten besonders hohe Anforderungen an die Anpassungsfähigkeit der darin lebenden Organismen. Diese Tatsache führte ebenso wie die Notwendigkeit der Entwicklung chemischer Verteidigungsstrategien, um ein Überleben im marinen Lebensraum mit seiner großen Biodiversität zu sichern, im Laufe der Evolution zu einer exzellenten Anpassung der in diesem Habitat lebenden Organismen und damit auch zur Bildung neuer Sekundärstoffe, die sich oft von bekannten Strukturen terrestrischer Organismen abheben. Diese Sekundärstoffe besitzen somit ein besonders viel versprechendes Potential für die Entdeckung neuer Wirkstoffe dar [Bull 2000].

Bedeutende Erfolge der marinen Naturstoffforschung für den internationalen Arzneimittelmarkt stellen die Arzneistoffe Cephalosporin (Abb.I3), Cytarabin (Ara-C) und Vidarabin (Ara-A) sowie davon abgeleitete Derivate dar. Eine große Anzahl weiterer viel versprechender Wirkstoffe mariner Herkunft befindet sich momentan in der klinischen Prüfung (Abb.I2), zusätzliche in der präklinischen Prüfungsphase.

Leitstruktur	Quelle	Indikation
Didemnin B	<i>Trididemnum solidum</i> (Tunikat)	Zytostatikum
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia</i> (Mollusk)	Zytostatikum
Girollin	<i>Pseudaxinyssa cantharella</i> (Schwamm)	Zytostatikum
Bengamid-Derivat	<i>Jaspis</i> sp. (Schwamm)	Zytostatikum
Cryptophycine	<i>Nostoc</i> sp., <i>Dysidea arenaria</i> (Schwamm)	Zytostatikum
Bryostatin 1	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoon)	Zytostatikum
Cematodin, Synthatodin	synthet.. Dolastatin-Deriv.	Zytostatikum
Ecteinascidin 743	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (Tunikat)	Zytostatikum
Aplidin	<i>Aplidium albicans</i> (Tunikat)	Zytostatikum
Discodermolid	<i>Discodermia dissoluta</i> (Schwamm)	Zytostatikum
Kahalalid F	<i>Elysia rufescens</i> , <i>Bryopsis</i> sp.(Grünalge)	Zytostatikum
Spisulosin	<i>Spisua polynyma</i>	Zytostatikum
Halichondrin-B-Deriv.	<i>Lissodendoryx</i> sp. (Schwamm)	Zytostatikum
Agelasphin-Deriv.	<i>Agelas mauritanus</i> (Schwamm)	Zytostatikum
Squalamin	<i>Squalus acanthias</i> (Hai)	Zytostatikum
Neovastat	Haiknorpel	Zytostatikum
Hemiasterlin-Deriv.	<i>Cymbastella</i> sp. (Schwamm)	Zytostatikum
GTS-21	<i>Amphiponus lactifloreus</i> (mar. Wurm)	Alzheimer-Therapie
Manoalid	<i>Luffariaella variabilis</i> (Schwamm)	Antipsoriatikum
Contignasterol-Deriv.	<i>Petrosia contignata</i> (Schwamm)	Antiasthmatikum
IPL-512, IPL-550	576029-Derivat-Aventis	Antiasthmatikum
Ziconotid	<i>Conus magus</i> (Conusschnecke)	Analgetikum
Contulakin G	<i>Conus geographus</i> (Conusschnecke)	Analgetikum, Antiepileptikum

Abb.I2: Wirkstoffe mariner Herkunft im Stadium der klinischen Prüfung in Phase I-III
[Newman und Cragg 2004]

1.3. Bioaktive Naturstoffe aus marinen Pilzen

Die Naturstoffforschung auf dem Gebiet der Mikrobiologie wurde erstmalig durch die Entdeckung des Penicillins durch A.Fleming 1928 revolutioniert. Bis heute sind Penicillin und weitere Antibiotika mikrobieller Herkunft wie Streptomycin, Chloramphenicol, Chlortetracyclin, Cephalosporin, Erythromycin und Vancomycin bzw. deren Derivate vom Arzneimittelmarkt nicht wegzudenken [Butler 2004].

Mikroorganismen als Naturstoffproduzenten bieten den unschätzbaren Vorteil, dass ihre biotechnologische Fermentation für gewöhnlich in großen Mengen möglich ist und daher die Sekundärstoffgewinnung keine Ausbeutung natürlicher Ressourcen zur Folge hat. Zudem sind

derartige Methoden der Wirkstoffgewinnung mit vergleichsweise geringem Kostenaufwand durchführbar. Überdies können Mikroorganismen im Gegensatz zu Makroorganismen leichter genetisch manipuliert werden, so dass eine gezielte Beeinflussung der Wirkstoffproduktion oder pharmakologischer Eigenschaften der jeweiligen Wirkstoffe möglich wäre.

In dem vielfältigen Lebensraum des marinen Habitats (Kap.1.2) stellen Mikroorganismen einen beträchtlichen Anteil der Biomasse dar. Es gilt mittlerweile als erwiesen, dass Sekundärstoffe in marinen Makroorganismen zumindest teilweise von assoziierten Mikroorganismen gebildet werden [Haefner 2003]. So konnte beispielsweise für die aus einem indonesischen Tiefseeschwamm isolierten Naturstoffe Manzamin A und 8-Hydroxymanzamin A nachgewiesen werden, dass diese, unter Einhaltung bestimmter Kulturbedingungen, ebenfalls von einem mit diesem Schwamm assoziierten Mikroorganismus, *Micromonospora* sp., produziert wurden [Kasanah *et al.*, Yousaf *et al.* 2003].

Da sich besonders in der marinen Naturstoffforschung der Substanznachschub oft als schwerwiegendes Problem erwiesen hat, nicht zuletzt aufgrund der Schwierigkeit der Kultivierung mariner Makroorganismen, wie beispielsweise mariner Schwämme, stellen Mikroorganismen hier eine außerordentlich bedeutende Quelle für die Wirkstoffproduktion dar.

Bei marinen Pilzen handelt es sich um eine eher ökologisch denn taxonomisch definierte Gruppe von Mikroorganismen. Sie wachsen und sporulieren im marinen Habitat und können aus marinen Algen, höheren Pflanzen, Pflanzenteilen, Invertebraten, Fischen und Säugetieren isoliert werden [Jones 1976, Kohlmeyer 1979]. Es wird unterschieden zwischen obligat und fakultativ marinen Pilzen. Obligat marine Pilze leben und sporulieren ausschließlich im marinen und estuarinen Lebensraum, wohingegen fakultativ marine Pilze aus dem Süßwasser oder terrestrischen Milieu stammen, aber in der Lage sind, im marinen Habitat zu überleben und sich gegebenenfalls auch zu vermehren [Kohlmeyer 1979].

Die Suche nach neuen Wirkstoffen in marin assoziierten Pilzen führte bereits zur Entdeckung von 272 neuen Naturstoffen, darunter viele Strukturen mit neuartigen Kohlenstoffgerüsten und somit viel versprechend für die Entwicklung neuer Arzneistoffe [Bugni und Ireland 2004]. Unter den biologisch aktiven Sekundärstoffen, die aus marinen Pilzen isoliert wurden, finden sich vor allem solche mit antibakterieller, fungizider und zytotoxischer Wirksamkeit.

Aufgrund dieser Tatsache könnte man annehmen, dass derartige Wirkstoffe zur chemischen Verteidigung der Mikroorganismen beitragen [Liberra und Lindequist 1995].

Das erste und bisher bedeutendste Beispiel eines marinen Pilzes als Wirkstoffproduzent von therapeutischer Relevanz bildet der aus einer Meerwasserprobe isolierte Pilz *Acremonium chrysogenum* (heute als *Cephalosporium acremonium* bezeichnet). Die antibiotische Wirksamkeit dieses Pilzes konnte durch die Entdeckung von Cephalosporin C (Abb.I3) erklärt werden.

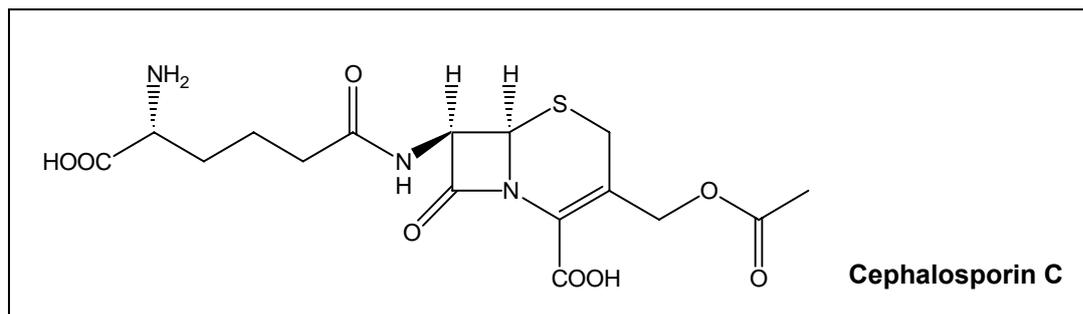


Abb.I3

1.4. Bioaktive Naturstoffe aus endophytischen Pilzen

Endophyten finden sich in nahezu allen Pflanzen. Es handelt sich hierbei um Bakterien oder Pilze, die ihren Lebenszyklus komplett oder partiell inter- und/oder intrazellulär im Gewebe gesunder Wirtspflanzen verbringen. Dabei werden Krankheitssymptome in der Wirtspflanze normalerweise nur unter „Stressbedingungen“ hervorgerufen. Das Verhältnis zwischen Wirt und Endophyt kann von latenter Phytopathogenese bis zu mutualistischer Symbiose reichen [Tan und Zou 2001].

Es gibt Hinweise darauf, dass der Anpassungsprozeß von Endophyten an ihre jeweiligen Wirtspflanzen bereits vor hunderten von Millionen Jahren begann, als die ersten Pflanzen die Erde bevölkerten. In versteinertem Pflanzengewebe konnten Anzeichen von assoziierten Mikroorganismen entdeckt werden [Taylor und Taylor 2000]. Aufgrund dieses Jahrtausenden andauernden Prozesses konnte eine optimale Anpassung des Stoffwechsels der Endophyten an die jeweiligen Wirte erfolgen. Im pflanzlichen Gewebe siedelnde Endophyten beziehen normalerweise lebensnotwendige Nährstoffe von der Wirtspflanze und tragen dafür möglicherweise durch die Produktion von Sekundärstoffen zum Schutz der Pflanze vor Pflanzenpathogenen, Insekten oder Fraßfeinden bei [Preszler *et al.* 1996; Zou und Tan 1999]. Durch Endophyten infizierte Pflanzen wachsen erwiesenermaßen oft schneller als nicht

infizierte. Ein möglicher Grund dafür könnte die durch Endophyten induzierte verbesserte Aufnahmefähigkeit der Pflanzen für die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor sein [Malinowski *et al.* 1999]. Weiterhin konnte die Freisetzung aller fünf Klassen von Pflanzenwachstumshormonen (Auxine, Abscisine, Ethylene, Gibbereline und Kinetine) durch endophytische Mikroorganismen nachgewiesen werden [Goodman *et al.* 1986]. Eine Entwicklung von Anpassungsmechanismen für den genetischen Transfer von Informationen zwischen Endophyt und Wirt ist denkbar. Aufgrund dieser komplizierten und immer noch unzureichend erforschten Assoziationen zwischen Endophyt und Wirt stellen endophytische Mikroorganismen eine viel versprechende Quelle neuer und ungewöhnlicher Naturstoffe dar [Strobel 2002]. So handelte es sich bei 51% der aus Endophyten isolierten, biologisch aktiven Sekundärstoffe um neue Naturstoffe [Strobel 2002].

Der bisher wahrscheinlich größte Fortschritt in der Endophytenforschung konnte 1993 durch die Entdeckung des endophytischen Pilzes *Taxomyces andreanae* in der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* erzielt werden, der sich als Taxol (Paclitaxel) produzierend erwies. Die zunächst umstrittenen Befunde wurden später durch ähnliche Berichte über weitere, Taxol-produzierende Endophyten sowohl aus weiteren Eiben-Arten als auch aus anderen Pflanzen gefestigt.

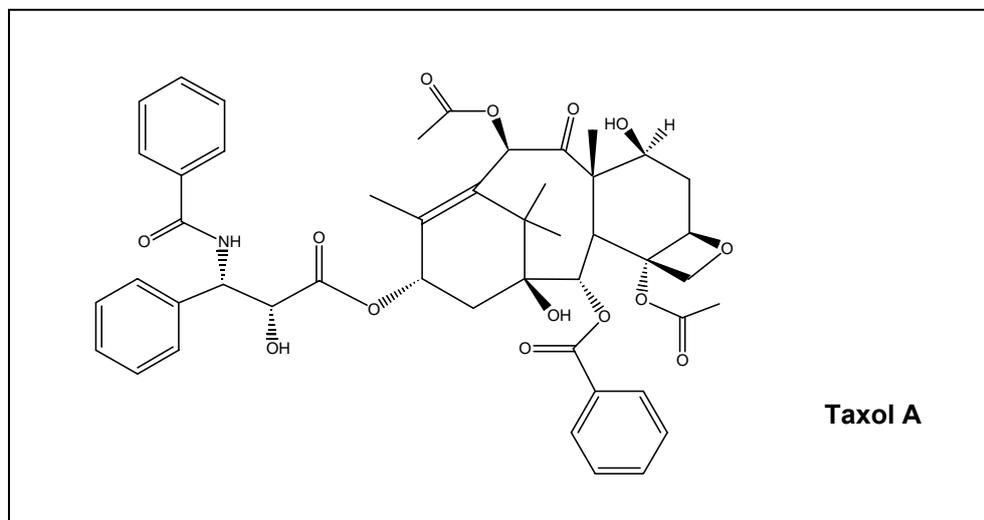


Abb.I4

Das Diterpenoid Taxol (Abb.I4) wurde 1969 erstmals aus der Rinde von *Taxus brevifolia* isoliert und stellt seit seiner Marktzulassung 1992 eines der wichtigsten Arzneimittel zur Behandlung bestimmter Tumore, v.a. Brustkrebs und Ovarialkarzinom, dar. Da für die Behandlung nur einer Patientin ca. 2 g Taxol erforderlich sind, was dem Gehalt von mindestens 12 Bäumen entspricht, gestaltet sich die Substanzgewinnung als sehr schwierig

und kostenaufwendig, besonders weil die natürlichen Ressourcen, d.h. die Bestände der in Nordamerika endemischen pazifischen Eibe, stark limitiert sind. Auch die partialsynthetische Gewinnung aus 10-Deacetyl-Baccatin III, das ebenfalls aus *Taxus brevifolia* stammt, konnte das Problem des Substanznachschiebs nur unzureichend lösen [Strobel 1996]. Die Entdeckung des Taxol produzierenden endophytischen Pilzes *Taxomyces andreanae* stellte somit einen großen Fortschritt dar. Obwohl die bislang durch biotechnologische Fermentation dieses Mikroorganismus gewonnenen Ausbeuten an Taxol noch relativ gering sind, könnten doch zukünftig ausreichende Mengen des Naturstoffes auf diese Weise produziert werden, ohne dass die Ausbeutung natürlicher Ressourcen erfolgen müsste.

Weitere bedeutende aus endophytischen Pilzen isolierte Sekundärstoffe stellen die antimykotisch aktiven Verbindungen Cryptocin, Cryptocandin und Jesteron dar [Strobel 2002]. Cryptocandin wurde aus *Cryptosporiopsis quercina* isoliert [Strobel *et al.* 1999]. Dieses Cyclopeptid ist strukturell den bekannten Antimykotika der Echinokandine und Pneumokandine verwandt und zeigt potente Bioaktivität gegen verschiedene pflanzenpathogene Pilze. Gegenwärtig wird es zusätzlich von der Pharmaindustrie auf seine Einsetzbarkeit gegen Erreger von Infektionen der Haut und Nägel beim Menschen geprüft. Cryptocin stellt eine ungewöhnliche Tetransäure dar und wird ebenfalls von *Cryptosporiopsis quercina* gebildet. Diese Substanz ist in hohem Maße aktiv gegen verschiedene pflanzenpathogene Pilze, insbesondere *Pyricularia oryzae*, einen bedeutenden Schädling der Reispflanze [Li *et al.* 2000]. Jesteron stammt aus *Pestalotiopsis jesteri* und ist ebenfalls antimykotisch aktiv [Li und Strobel 2001]. Dieses Cyclohexenonepoxid kann bereits auch mittels organischer Synthese gewonnen werden [Hu *et al.* 2001].

1.5. Quellen mariner endophytischer Pilze und Pilze mariner Herkunft

Bei marinen Pilzen die mit Makroorganismen assoziiert sind, spielen Adaptationsprozesse in verschiedener Hinsicht eine bedeutende Rolle. Sie unterliegen den besonderen Umgebungsbedingungen des marinen Habitats und stehen darüber hinaus in enger Wechselwirkung zu ihren Wirtsorganismen. Beide Anpassungsmechanismen erfordern die Bildung ungewöhnlicher Sekundärstoffe, so dass Pilze mariner Herkunft, die bisher noch verhältnismäßig wenig untersucht worden sind, als besonders aussichtsreich anzusehen sind auf der Suche nach neuen, pharmakologisch aktiven Naturstoffen.

Aus Abb.I.5 geht eindeutig hervor, dass dabei die bedeutendsten Ressourcen für endophytische Pilze und Pilze mariner Herkunft Algen und Schwämme darstellen. Für die mit marinen Algen assoziierten Mikroorganismen ist das Verhältnis der Anzahl an isolierten neuen Naturstoffen zur Gesamtmenge an isolierten Naturstoffen mit Abstand am größten [Bugni und Ireland 2004].

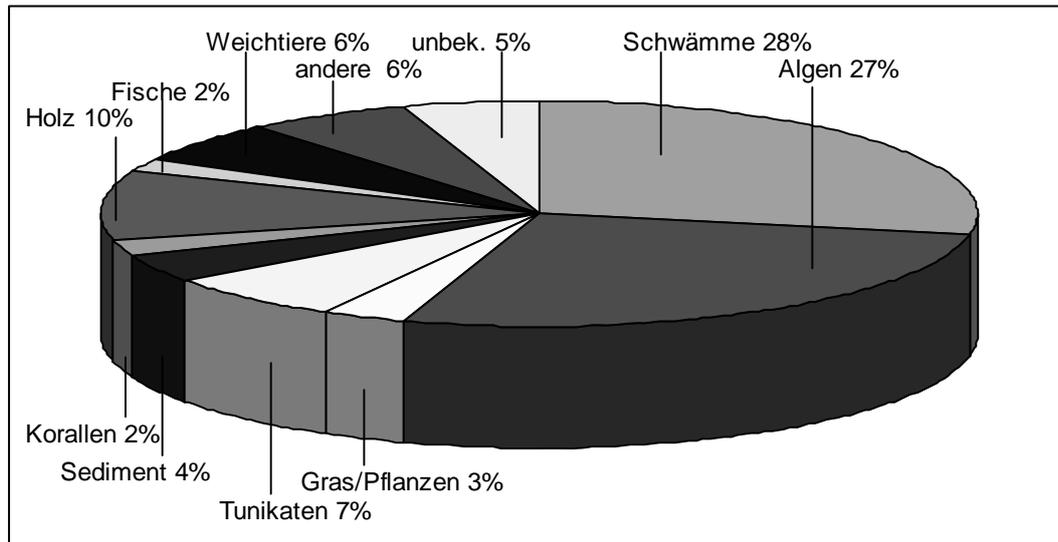


Abb.I5

Neue Naturstoffe aus marin assoziierten Pilzen in Abhängigkeit der Quellorganismen [Bugni und Ireland 2004]

A. Marine Algen

Pflanzen, die unter humiden Umgebungsbedingungen leben, wie Wasserpflanzen, sind besonders anfällig für den Befall durch pathogene Mikroorganismen und aus diesem Grunde auf die Entwicklung besonderer Verteidigungsstrategien angewiesen. Dies wird möglicherweise unter anderem durch symbiotische Wechselwirkungen mit endophytischen Pilzen gewährleistet, die als Quelle antibiotischer oder zytotoxischer Abwehrstoffe dienen können [Strobel 2002]. Marine Algen enthalten eine Vielzahl von Inhaltsstoffen, wie zahlreiche Polysaccharide, als potentielle Nährstoffe für Mikroorganismen und stellen somit ein bevorzugtes Habitat für marine Pilze dar [Biabani und Laatsch 1998]. Es ist bekannt, dass ein Drittel aller bekannten marinen Pilze mit Algen assoziiert sind [Kohlmeyer 1979].

Es konnte bereits eine Anzahl pharmakologisch aktiver potentieller Wirkstoffe aus algenassoziierten Pilzen isoliert werden. So wurde der stark zytotoxisch wirksame Naturstoff Leptosin J (Abb.I6) in dem mit der marinen Alge *Sargassum tortile* vergesellschafteten Pilz *Leptosphaeria* sp. entdeckt. Leptosin J ist mit einer ED₅₀ von 1.25 µg/ml gegen die

Leukämiezelllinie P388 aktiv [Takahashi *et al.* 1994]. Ascosalipyrrolidinon A stammt aus dem marinen Pilz *Ascochyta salicorniae*, assoziiert mit der Grünalge *Ulva* sp. Der Naturstoff erwies sich als antibiotisch aktiv sowie ebenfalls aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* [Osterhage *et al.* 2000]. Das ebenso gegen Malaria wirksame Drechslerin D mit einer IC_{50} kleiner als $5.1 \mu\text{g/ml}$ wurde aus dem mit der Rotalge *Liagora viscida* vergesellschafteten Pilz *Drechslera dematioidea* isoliert [Osterhage *et al.* 2002]. Der stark antibiotisch wirksame Naturstoff Pestalon stammt aus *Pestalotia* sp., assoziiert mit der Braunalge *Rosenvingea* sp. [Cueto *et al.* 2001].

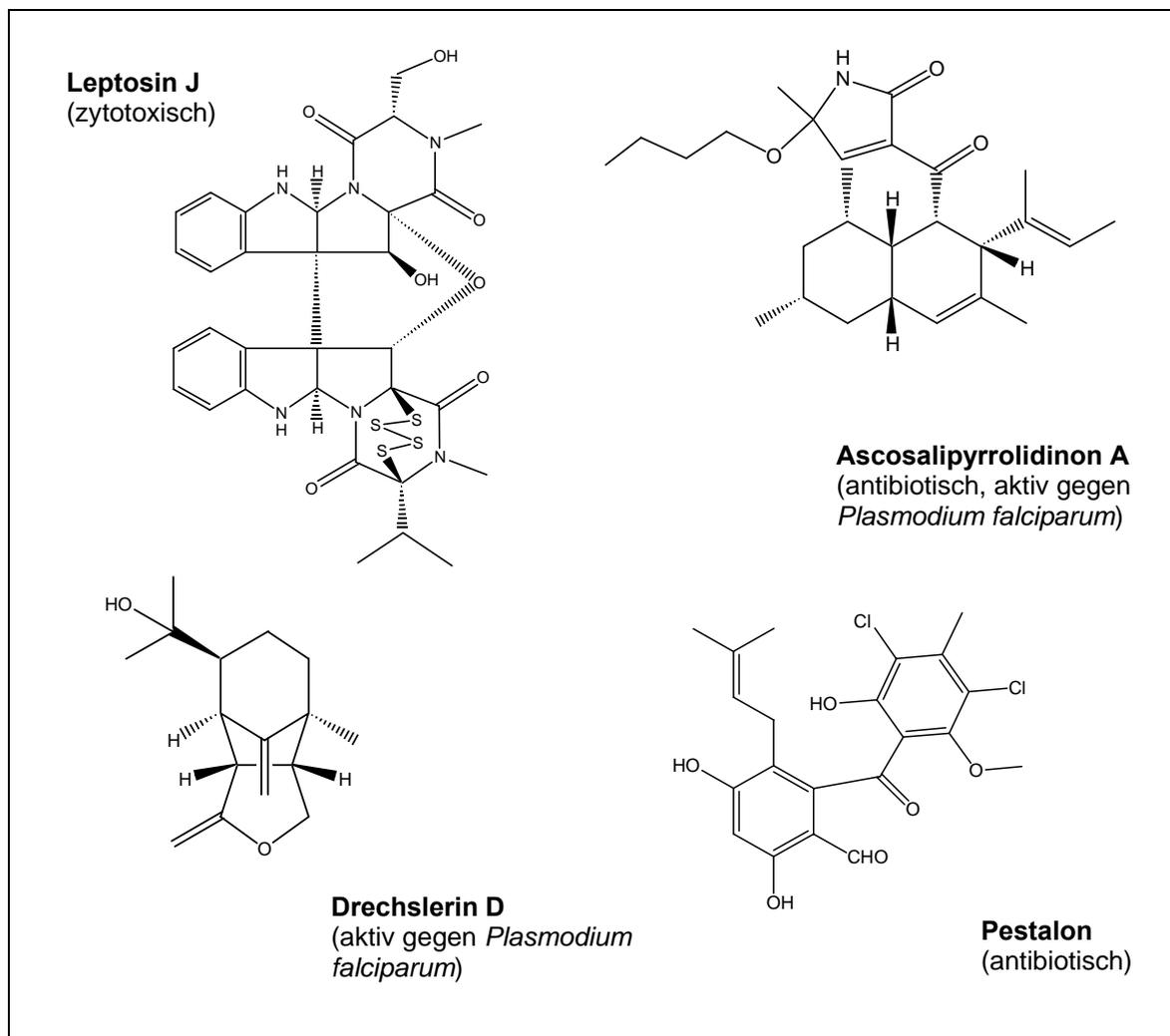
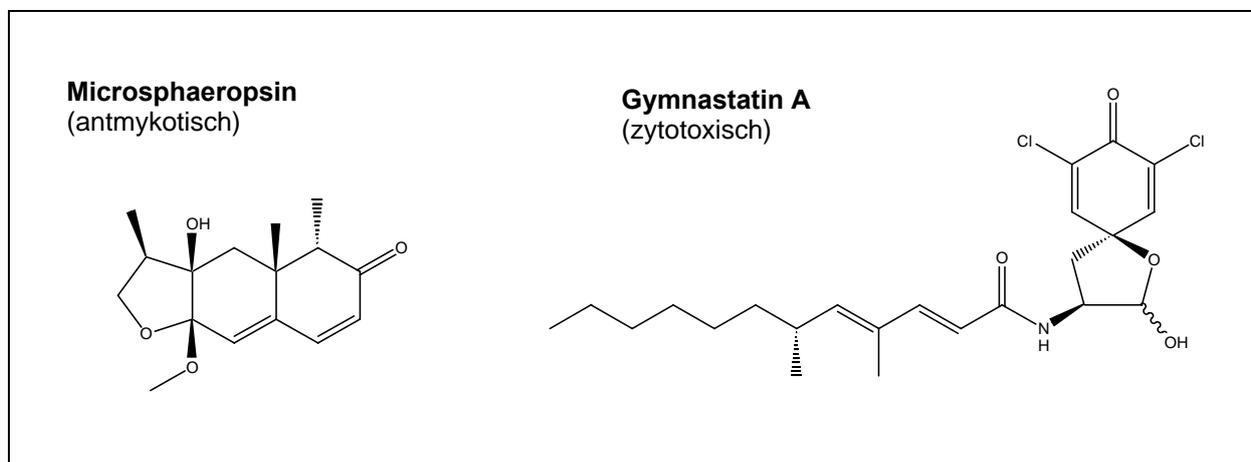


Abb.I6: Bioaktive Naturstoffe aus algenassoziierten Pilzen

B. Marine Schwämme

Da es sich bei marinen Schwämmen um sessile Meeresbewohner handelt, die weder ihren Fraßfeinden entfliehen können, noch über einen mechanischen Schutz verfügen, sind sie vornehmlich auf chemische Verteidigungsstrategien angewiesen. Dies führte zur Entwicklung einer Vielzahl von bioaktiven und häufig neuartigen Sekundärstoffen. Obwohl marine Schwämme vermutlich eine größere Befähigung zur Biosynthese besitzen als andere marine Invertebraten, gibt es mittlerweile Beweise dafür, dass zumindest ein Teil dieser Schwamminhaltsstoffe von assoziierten Mikroorganismen produziert wird [Biabani und Laatsch 1998]. Es ist bekannt, dass der Anteil an Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, bis zu 40% der Biomasse mariner Schwämme ausmachen kann [Wilkinson 1978].

Aus schwammassoziierten Pilzen konnten bereits einige Sekundärstoffe mit bedeutender pharmakologischer Wirksamkeit isoliert werden. Microsphaeropsin (Abb.I7) stammt aus dem marinen Schwamm *Myxilla incrustans* isolierten Pilz *Microsphaeropsis* sp. und zeigt fungizide Aktivität bereits im 50 µg Bereich [Holler *et al.* 1999]. Aus dem schwammassoziierten marinen Pilz *Aspergillus varicolor* konnte der Naturstoff Varixanthon isoliert werden, der starke antibiotische Wirksamkeit gegen *E. coli*, *Proteus* sp., *B. subtilis* und *S. aureus* in einer MHK von 12.5 µg/ml aufweist [Malmström *et al.* 2002]. Gymnastatin A stammt aus dem marinen Pilz *Gymnascella dankaliensis*, vergesellschaftet mit dem Schwamm *Halichondria japonica* und zeigt eine starke zytotoxische Aktivität gegen die Leukämiezelllinie P388 mit einem ED₅₀-Wert von 18 ng/ml [Numata *et al.* 1997]. Ebenfalls zytotoxische Aktivität gegen Leukämiezellen besitzt Asperazin, isoliert aus *Aspergillus niger*, assoziiert mit dem marinen Schwamm *Hyrtios proteus* [Varoglu *et al.* 2000].



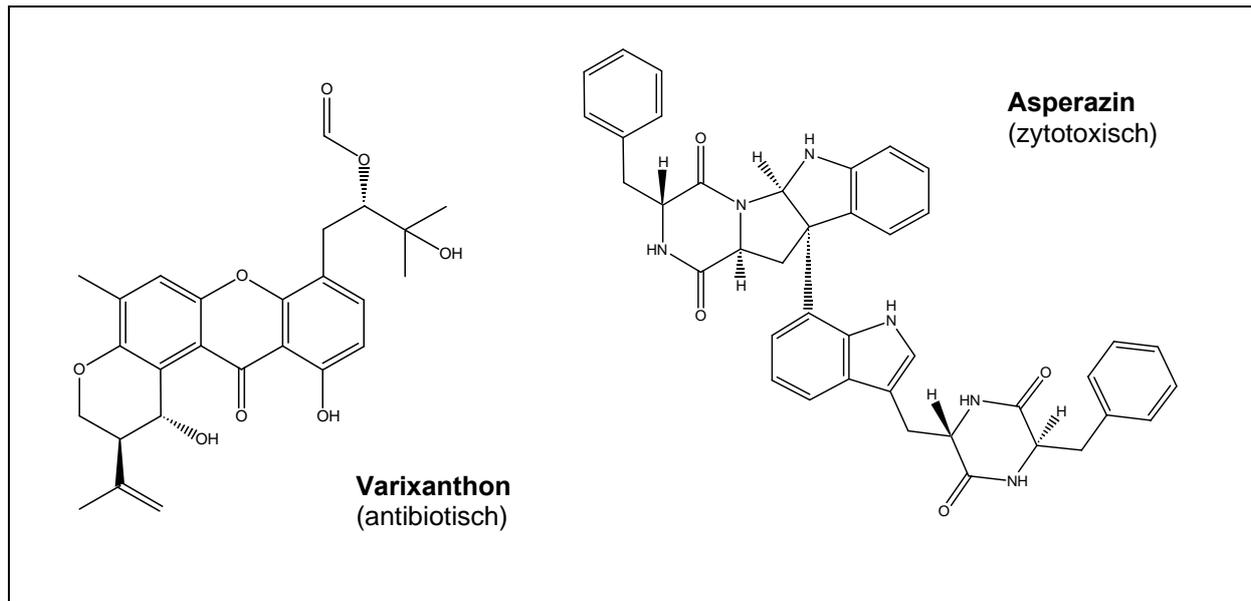


Abb.I7: Bioaktive Naturstoffe aus schwammassoziierten Pilzen

C. Mangroven

Der Ausdruck Mangrove bezeichnet sowohl das Ökosystem der tropischen Gezeitenwälder wie auch seine Bewohner, salztolerante Baumarten der tropischen und subtropischen Küstenregionen. Insbesondere anzutreffen sind diese Pflanzen an Flussmündungen und Lagunen. Da ihre Wurzeln und bereits die Keimlinge ständig den Gezeiten ausgesetzt sind, bieten sie einen optimalen Lebensraum für eine Vielzahl von Mikroorganismen [Hyde und Jones 1987]. Keimlinge werden oft von den Gezeiten fortgespült, um dann über große Strecken im Wasser transportiert zu werden bevor sie sich schließlich andernorts ansiedeln. Auf diese Weise dienen sie auch als „Transportmittel“ für marine Pilze über weite Strecken hinweg [Chapman 1976].

Als pharmakologisch bedeutsame Wirkstoffe wurden aus mangrovenassoziierten marinen Pilzen beispielsweise bereits isoliert: Phomopsidin (Abb.I8) aus *Phomopsis* sp. [Yoshimoto *et al.* 1997] und Lipodepsipeptid 15G256 γ aus *Hypoxylon oceanicum* [Schlingmann *et al.* 1998]. Phomopsidin erwies sich als zytotoxisch wirksamer Hemmstoff der Mikrotubuli in einer IC₅₀ von 5.7 μ M, vergleichbar mit Colchicin und Rhizoxin. Lipodepsipeptid 15G256 γ ist ein potentes Breitspektrumantimykotikum, vor allem gegen Dermatophyten, durch Inhibition der Zellwandsynthese der Pilze [Bugni und Ireland 2004].

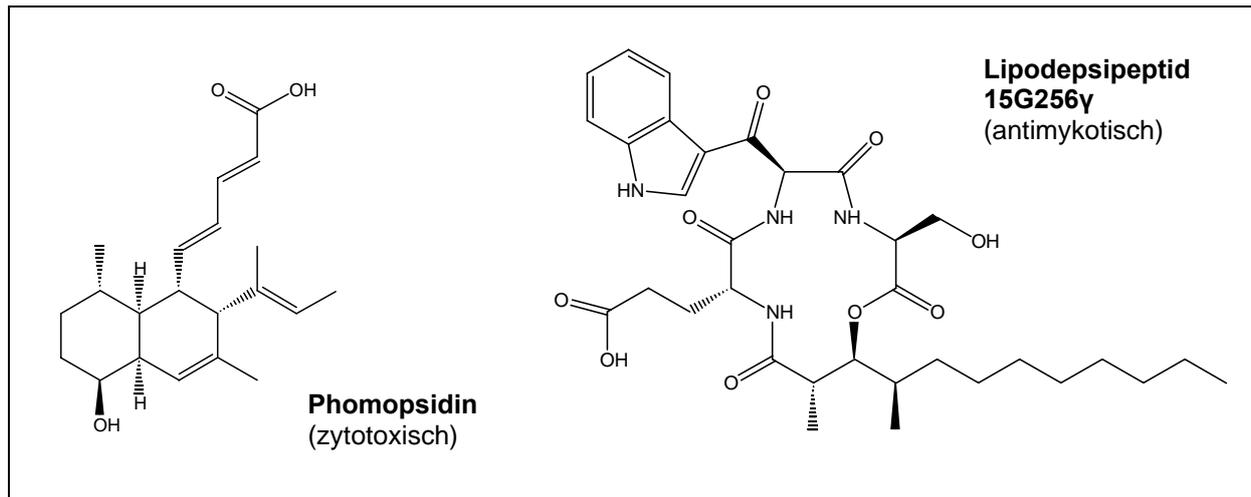


Abb.I8: Bioaktive Naturstoffe aus mangrovenassoziierten Pilzen

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der hervorragenden Adaptationsprozesse mariner Mikroorganismen an die extremen Bedingungen ihres Lebensraumes, sowie der zusätzlichen Ausbildung komplizierter Wechselwirkungen von Endophyten zu ihren Wirten, sind besonders endophytische Pilze mariner Herkunft als Produzenten neuer, bioaktiver Naturstoffe als sehr aussichtsreich anzusehen bei der Suche nach neuen pharmakologisch aktiven Wirkstoffen. Im Vordergrund dieser Arbeit sollte daher die gezielte Isolierung bioaktiver Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen stehen.

Ausgewählt wurden dazu marine Algen der Tropen (Kerala/Indien) und der gemäßigten Klimate (Qingdao/China), Mangroven (Hainan/China) und marine Schwämme (Kerala/Indien). Nach Isolierung der Endophyten aus ihren Wirtsorganismen auf einem Spezialmedium wurden die Pilze kultiviert, mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert und die Extrakte chemisch analytisch untersucht. Die Testung auf biologische Aktivität war speziell auf antibakterielle und antifungale Aktivität, Zytotoxizität sowie allgemeine Toxizität fokussiert. Biologisch aktive sowie analytisch aussichtsreich erscheinende Extrakte wurden zur Isolierung der in ihnen enthaltenen Sekundärstoffe ausgewählt. Die Naturstoffisolierung sowie die nachfolgende Strukturaufklärung erfolgten dann mithilfe verschiedener chromatographischer sowie spektroskopischer Methoden (HPLC, LC-MS, NMR, DC, verschiedene säulenchromatographische Techniken).

Von Interesse war dabei neben der Suche nach neuen Naturstoffen ebenfalls die Ermittlung weiterer, bislang noch nicht untersuchter Bioaktivitäten bereits bekannter Sekundärstoffe.

Die taxonomische Einordnung sowie Identifizierung der Pilze erfolgte mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, Gelelektrophorese) bzw. anhand morphologischer Merkmale.

Da die Umgebungsbedingungen ein Schlüsselement für die Sekundärstoffproduktion darstellen, ist es von großer Bedeutung, Strategien zu entwickeln, die das metabolische Potential eines jeden Mikroorganismus ausschöpfen können, um maximale chemische Diversität zu erreichen [Knight 2003]. Aus diesem Grunde sollte auch die Untersuchung des Einflusses verschiedener Umgebungs- und Kulturbedingungen auf Menge und Natur der gebildeten Sekundärstoffe, speziell mariner Pilze, Gegenstand dieser Arbeit sein. Dabei dienen der Salzgehalt des Mediums, der Zeitpunkt der Probennahme sowie die Wahl der Kultivierungsmethode als Einflussgrößen. Als ein weiterer Parameter des Einflusses der natürlichen Umgebungsbedingungen auf die Produktion von Naturstoffen konnte auch der Vergleich der Bioaktivitäten tropischer algenassoziiierter Endophyten mit aus den gemäßigten Klimaten stammenden Vertretern herangezogen werden. Ebenso von Interesse war ein Vergleich der gebildeten Sekundärstoffe der Endophyten mit denen ihrer jeweiligen Wirtsorganismen auf eventuelle Übereinstimmung und somit ein Hinweis auf eine Assoziation der Stoffwechsel beider Organismen.

2. Material und Methoden

2.1. Marine Algen und Mangroven als Quelle für die Isolierung endophytischer Pilze

2.1.1. Sammlung des Materials- Beschreibung der Sammelplätze



Abb.M1: Kartenausschnitt Asien mit Kennzeichnung der Sammelplätze

Sämtliche beschriebenen algenassoziierten Pilze (ENI, QEN) wurden aus marinen Algen des südostasiatischen Raumes isoliert. Diese Algen wurden im Rahmen von Forschungsaufenthalten in Indien (27.01.-18.03.2003) am „Institute of Aquatic Biology and Fisheries“ in Kazuttam/ Trivandrum (ENI-Stämme) und in China (19.04.-07.06.2004) am „Institute of Oceanology“ in Qingdao (QEN-Stämme) gesammelt.

Die marinen Algen als Wirtspflanzen für die ENI-Stämme wurden an der Küste vor Vizhinyam/Indien und für die QEN-Stämme in Qingdao/China an „Qingdao Beach No.2“ bei Ebbe gesammelt.

Die mangrovenassoziierten Pilze (**MGC**-Stämme) wurden aus auf Hainan gesammelten Mangrovenspezies isoliert, die dem „Dong Zhai Gang-Mangrove Garden“ entnommen wurden. Die Reise nach Hainan (02.06.-04.06.2004) erfolgte im Rahmen der oben erwähnten Forschungsreise nach China während des Aufenthaltes am „National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs“ der „Beijing Medical University“ in Peking.

2.1.2. Gesammelte Spezies

2.1.2.1. Marine Algen aus Vizhinyam (Indien)

Stamm No.	Pilz	Wirtsorganismus
ENI-C1	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Caulerpa peltata</i>
ENI-C2	nicht identifizierbar	<i>Caulerpa peltata</i>
ENI-P2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Padina gymnospora</i>
ENI-P3	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Padina gymnospora</i>
ENI-P4	nicht identifizierbar	<i>Padina sp.</i>
ENI-P5	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Padina gymnospora</i>
ENI-P6	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Padina gymnospora</i>
ENI-P7	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Padina gymnospora</i>
ENI-P8	<i>Doratomyces cf. microsporus</i>	<i>Padina sp.</i>
ENI-P9	<i>Fusarium semitectum var. majus</i>	<i>Padina sp.</i>
ENI-D1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Dictyota sp.</i>
ENI-S1	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Sargassum sp.</i>
ENI-A1	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Acanthophora spicifera</i>

Tab.M1: algenassoziierte Pilze und ihre Wirtsorganismen, gesammelt in Vizhinyam (Indien)

2.1.2.2. Marine Algen aus Qingdao (China)

Stamm No.	Pilz	Wirtsorganismus
QEN 1	<i>Arthrimum sacchari</i>	<i>Grateloupia filicina</i>
QEN 2	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Gracilaria asiatica</i>
QEN 3	NN	<i>Gracilaria asiatica</i>
QEN 4	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Gracilaria asiatica</i>
QEN 5	<i>Eurotium repens</i>	<i>Sargassum siliquastrum</i>
QEN 6	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>
QEN 7	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>
QEN 8	NN	<i>Sargassum siliquastrum</i>

QEN 9	<i>Penicillium griseoroseum</i>	<i>Leathesia difformis</i>
QEN 10	<i>Eurotium repens</i>	<i>Leathesia difformis</i>
QEN 11	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Polysiphonia arceslate</i>
QEN 12	NN	<i>Sargassum siliquastrum</i>

NN= Identifikation liegt noch nicht vor

Tab.M2: algenassoziierte Pilze und ihre Wirtsorganismen, gesammelt in Qingdao (China)

2.1.2.3. Mangrovenspezies aus Hainan (China)

Stamm No.	Pilz	Wirtsorganismus	Verwendeter Pflanzenteil
MGC-1.2	NN	<i>Heritiera littoralis</i>	Blatt
MGC-1.3	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Heritiera littoralis</i>	Blatt
MGC-2.2	NN	<i>Rhizophora mucronata</i>	Blatt
MGC-4.3	NN	<i>Bruguiera sexangula</i>	Rinde
MGC-4.4	<i>Botryosphaeria lutea</i>	<i>Bruguiera sexangula</i>	Rinde
MGC-5.1	<i>Neurospora terricola</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Rinde
MGC-5.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Blatt
MGC-5.6	NN	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Blüte
MGC-6.1	<i>Pestialotiopsis microspora</i>	<i>Sonneratia alba</i>	Blatt
MGC-6.2	NN	<i>Sonneratia alba</i>	Blatt
MGC-8.2	NN	<i>Sonneratia sp.</i>	Blatt
MGC-8.3	NN	<i>Sonneratia sp.</i>	Rinde
MGC-8.4	NN	<i>Sonneratia sp.</i>	Blatt
MGC-9.2	NN	<i>Avicennia marina</i>	Blatt
MGC-10.2	NN	<i>Laguncularia racemosa</i>	Blatt
MGC-12.3	NN	<i>Aegiceras corniculatum Blanco</i>	Rinde
MGC-12.4	NN	<i>Aegiceras corniculatum Blanco</i>	Blatt
MGC-13.1	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Blatt
MGC-13.2	NN	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Blatt
MGC-14.1	NN	<i>Kandelia candel</i>	Blatt
MGC-14.4	<i>Hypoxyylon fendleri</i>	<i>Kandelia candel</i>	Blatt
MGC-14.5	NN	<i>Kandelia candel</i>	Blüte
MGC-15.3	NN	<i>Excoecaria agallocha</i>	Rinde
MGC-15.4	NN	<i>Excoecaria agallocha</i>	Blatt
MGC-16.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	Blatt

NN= Identifikation liegt noch nicht vor

Tab.M3: mangrovenassoziierte Pilze und ihre Wirtsorganismen, gesammelt auf Hainan (China)

B. Taxonomie der marinen Algen

Reich:	Plantae			
Abteilung:	Chlorophyta	Phaeophyta		
Klasse:	Chlorophyceae	Phaeophyceae		
Ordnung:	Caulerpales	Dictyotales	Fucales	Ectocarpales
Familie:	Caulerpaceae	Dictyotaceae	Sargassaceae	Chordariaceae
Gattung:	<i>Caulerpa</i>	<i>Padina</i>	<i>Sargassum</i>	<i>Leathesia</i>
Art:	<i>C. peltata</i>	<i>P. gymnospora</i> <i>Padina</i> sp.	<i>S. siliquastrum</i> <i>Sargassum</i> sp.	<i>L. difformis</i>
Reich:	Plantae			
Abteilung:	Rhodophyta			
Klasse:	Florideophyceae			
Ordnung:	Ceramiales	Halymeniales		Gracilariales
Familie:	Rhodomelaceae	Ceramiales		Gracilariaceae
Gattung:	<i>Acanthophora</i>	<i>Polysiphonia</i>		<i>Gracilaria</i>
Art:	<i>A. spicifera</i>	<i>P. arceslate</i>		<i>G. asiatica</i>

C. Taxonomie der Mangroven

Reich:	Plantae					
Abteilung:	Tracheophyta	Magnoliophyta	Spermatophyta	Spermatophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Klasse:	Angiosperm	Magnoliopsida	Dicotyledonae	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordnung:	Myrtales	Rhizophorales	Myrtales	Malvales	Scrophulariales	Lecythidales
Familie:	Rhizophoraceae	Rhizophoraceae	Rhizophoraceae	Sterculiaceae	Acanthaceae	Barringtoniaceae
Gattung:	<i>Rhizophora</i>	<i>Bruguiera</i>	<i>Kandelia</i>	<i>Heritiera</i>	<i>Acanthus</i>	<i>Barringtonia</i>
Art:	<i>R. mucronata</i>	<i>B. sexangula</i> <i>B. gymnorrhiza</i> <i>B. sexangula</i> var. <i>rhynchopetala</i>	<i>K. candel</i>	<i>H. littoralis</i>	<i>A. ilicifolius</i>	<i>B. racemosa</i> Roxb.
Reich:	Plantae					
Abteilung:	Magnoliophyta	Spermatophyta	Tracheophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Spermatophyta
Klasse:	Magnoliopsida	Dicotyledonae	Angiosperm	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Dicotyledonae
Ordnung:	Malpighiales	Myrtales	Lamiales	Myrtales	Ericales	Myrtales
Familie:	Euphorbiaceae	Sonneratiaceae	Verbenaceae	Combretaceae	Myrsinaceae	Meliaceae
Gattung:	<i>Excoecaria</i>	<i>Sonneratia</i>	<i>Avicennia</i>	<i>Laguncularia</i>	<i>Aegiceras</i>	<i>Xylocarpus</i>
Art:	<i>E. agallocha</i>	<i>S. alba</i> <i>S. caseolaris</i>	<i>A. marina</i>	<i>L. racemosa</i>	<i>A. corniculatum</i> Blanco	<i>X. granatum</i>

2.1.3. Isolierung der Endophyten aus den Wirtspflanzen und Anlage von Flüssigkulturen

Das gesammelte Pflanzenmaterial wurde in Plastikcontainern direkt zu den nahe gelegenen Instituten transportiert. Dort wurde es mit sterilisiertem demineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend für ein bis zwei Minuten in 70 % Ethanol oberflächensterilisiert. Diese Zeitspanne war in Vorexperimenten ermittelt worden. Sie darf nicht zu kurz gewählt werden, um eine ausreichende Sterilisation der Oberfläche zu gewährleisten, aber auch nicht zu lang, da sonst das Ethanol in tiefer gelegene Zellschichten eindringt und somit auch die Endophyten abgetötet werden. Nach Entnahme des Algenmaterials aus dem Ethanol wurde dieses mit sterilem Zellstoff trocken getupft und zur Kontrolle auf eventuell noch vorhandene epiphytische Mikroorganismen mit einer Kontrollplatte in Kontakt gebracht. Die Kontrollplatte enthielt jeweils das gleiche Nährmedium wie die zur Inokulation vorgesehenen Platten. Würde sich auf der Kontrollplatte ein Wachstum zeigen, wäre dies ein Hinweis auf unzureichende Oberflächesterilisation des Pflanzenmaterials und die eventuelle Kontamination durch epiphytischen Mikroorganismen. Der Ansatz wäre somit zur weiteren Bearbeitung nicht geeignet. Von dieser Platte wurden die Proben wieder entnommen und mit einem sterilen Skalpell in kleinere Stücke zerteilt. Anschließend wurden diese Gewebestücke auf Agarplatten mit speziellen Nährmedien platziert (Zusammensetzung siehe 2.1.4.), so dass möglichst das verletzte Gewebe mit der Plattenoberfläche in direktem Kontakt stand. Die Platten wurden anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach ein bis zwei Tagen konnte bereits erstes Pilzwachstum beobachtet werden.

Nach einigen Tagen wurden die Pilzkulturen auf Malzextraktmedium (Zusammensetzung siehe 2.1.4.) überimpft und die einzelnen Stämme so voneinander getrennt. Dieser Vorgang musste gegebenenfalls mehrfach wiederholt werden.

Mit den so gewonnenen Reinkulturen wurden, nachdem ausreichendes Wachstum erfolgt war, je Kultur ein 1000 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, der 300 ml Wickerham-Flüssigmedium (Zusammensetzung siehe 2.1.4.) enthielt. Um eine eventuelle Kontamination des Mediums auszuschließen, wurden nicht angeimpfte Kontrollansätze parallel beobachtet. Nach zwei bis vier Wochen Inkubation bei Raumtemperatur, je nach Wachstum der jeweiligen Pilzkultur, wurden die Standkulturen dann extrahiert (Abb.M2).

2.1.4. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Medium zur Isolierung von Endophyten

Agar-Agar	15.0 g
getrocknetes, pulverisiertes	
Pflanzenmaterial der Wirtspflanze	15.0 g
Meersalz	24.4 g (10 g/l)*
Chloramphenicol	0.2 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (NaOH/HCl)	7.4-7.8

*zur Isolierung endophytischer Pilze aus Mangroven wurde das Meersalz in einer Konzentration von 10 g/l in Anpassung an den natürlichen Lebensraum der Mangroven verwendet.

Malzmedium für Reinkulturen

Agar-Agar	15.0 g
Malzextrakt	15.0 g
Meersalz	24.4 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (NaOH/HCl)	7.4-7.8

Wickerham-Medium für Flüssigkulturen

Hefeextrakt	3.0 g
Malzextrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Glucose	20.0 g
Meersalz	24.4 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (NaOH/HCl)	7.2-7.4

Sämtliche Medien wurden unter Standardbedingungen autoklaviert.

2.1.5. Extraktion der Standkulturen

A. Gesamtextraktion mit Ethylacetat

Im Falle der 300 ml - Kulturen von MGC wurden die Kulturen vor Extraktion je Erlenmeyerkolben zunächst mit 250 ml Ethylacetat versetzt und zur Abtötung der Kulturen über Nacht stehengelassen.

Anschließend wurden die wässrige und die Ethylacetatphase gemeinsam mit dem Ultraturrax 10 min lang extrahiert und über den Büchnertrichter filtriert. Der Myzeliumrückstand wurde verworfen. Die danach im Scheidetrichter vom Ethylacetat abgetrennte Kulturbrühe wurde ein weiteres Mal mit 200 ml Ethylacetat für 10 min extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden dann gegen 100 ml demineralisiertes Wasser ausgeschüttelt, um eventuell noch vorhandenes Meersalz zu entfernen. Nach Einengen wurde der Extrakt in 100 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (90:10) gelöst und gegen 100 ml Cyclohexan ausgeschüttelt, um vorhandene Fettsäuren abzutrennen. Nach nochmaligem Einrotieren resultierte der Ethylacetatextrakt, der in Biotests eingesetzt und weiterer chromatographischer Untersuchung und Auftrennung unterzogen wurde.

B. Getrennte Extraktion von Kulturbrühe und Myzelium

Bei der Large-Scale-Kultur ENI-A1 (10l), die sich aus 33 Kolben zu je 300 ml Medium zusammensetzte, sowie der 300 ml-Kulturen von ENI und QEN, wurden vor der Extraktion die Myzelien mit einer Pinzette vom Medium abgetrennt und mit Methanol überschichtet. Mit Hilfe des Ultraturrax wurden sie dann für 10 min extrahiert, über den Büchnertrichter filtriert, das Filtrat anschließend einrotiert und so der Methanolextrakt erhalten. Die Kulturbrühe wurde, wie unter A beschrieben, behandelt und so der Ethylacetatextrakt erhalten.

2.1.6. Extraktion des Algenmaterials zum Vergleich der Inhaltsstoffmuster

Zu diesem Zweck wurde ein Teil des zur Isolierung von Endophyten vorgesehenen Pflanzenmaterials im Trockenschrank bei 40° C über mehrere Stunden getrocknet, dann mit der Mixermill pulverisiert und jeweils 1 g des pulverisierten Materials einer Algenspezies unter Zusatz von 50 ml Methanol für eine 1/2 Stunde auf dem Magnetprüher extrahiert. Danach wurde filtriert, das Filtrat einrotiert und anschließend analysiert.

2.2. Marine Schwämme als Quelle für die Isolierung assoziierter Pilze

2.2.1. Sammlung des Materials- Beschreibung des Sammelplatzes

Der marine Schwamm *Axinella tenudigata*, aus dem der schwammassoziierte Pilz *Alternaria alternata* (SPI-A2) isoliert wurde, wurde ebenfalls auf der Forschungsreise nach Indien vor der Küste von Rameshwaram aus einer Tiefe von 3-4 m ertaucht.

2.2.2. Isolierung von *Alternaria alternata* (SPI-A2) aus *Axinella tenudigata* und Anlage von Flüssigkulturen

Die Schwammproben wurden zunächst in einer Plastikbox mit Meerwasser transportiert und anschließend im Labor zunächst mit sterilem Meerwasser und anschließend mehrmals mit sterilem demineralisiertem Wasser gespült um an der Oberfläche haftende Mikroorganismen zu eliminieren. Um den Erfolg dieses Vorgangs zu kontrollieren, wurde die Schwammoberfläche anschließend mit einer Kontrollplatte (siehe oben) in Berührung gebracht. Ein auf diesen Kontrollplatten eventuell vorhandenes Wachstum hätte Oberflächenkeime angezeigt. Dann wurden aus dem Schwammgewebe mit Hilfe eines sterilen Skalpellwürfelförmige Stücke herausgetrennt und auf Agarplatten eines Malzextraktmediums (Zusammensetzung siehe 2.1.4.) platziert. Die sich nach einigen Tagen entwickelnden Pilzkulturen wurden auf separate Malzextraktplatten ausgeeinzelt.

Mit der so gewonnenen Reinkultur von *Alternaria alternata* wurden zwei 1000 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, die je 300 ml Wickerham-Flüssigmedium (Zusammensetzung siehe 2.1.4.) enthielten.

2.2.3. Extraktion der Standkulturen

Die Standkulturen wurden wie unter 2.1.5.A. beschrieben mit Ethylacetat extrahiert.

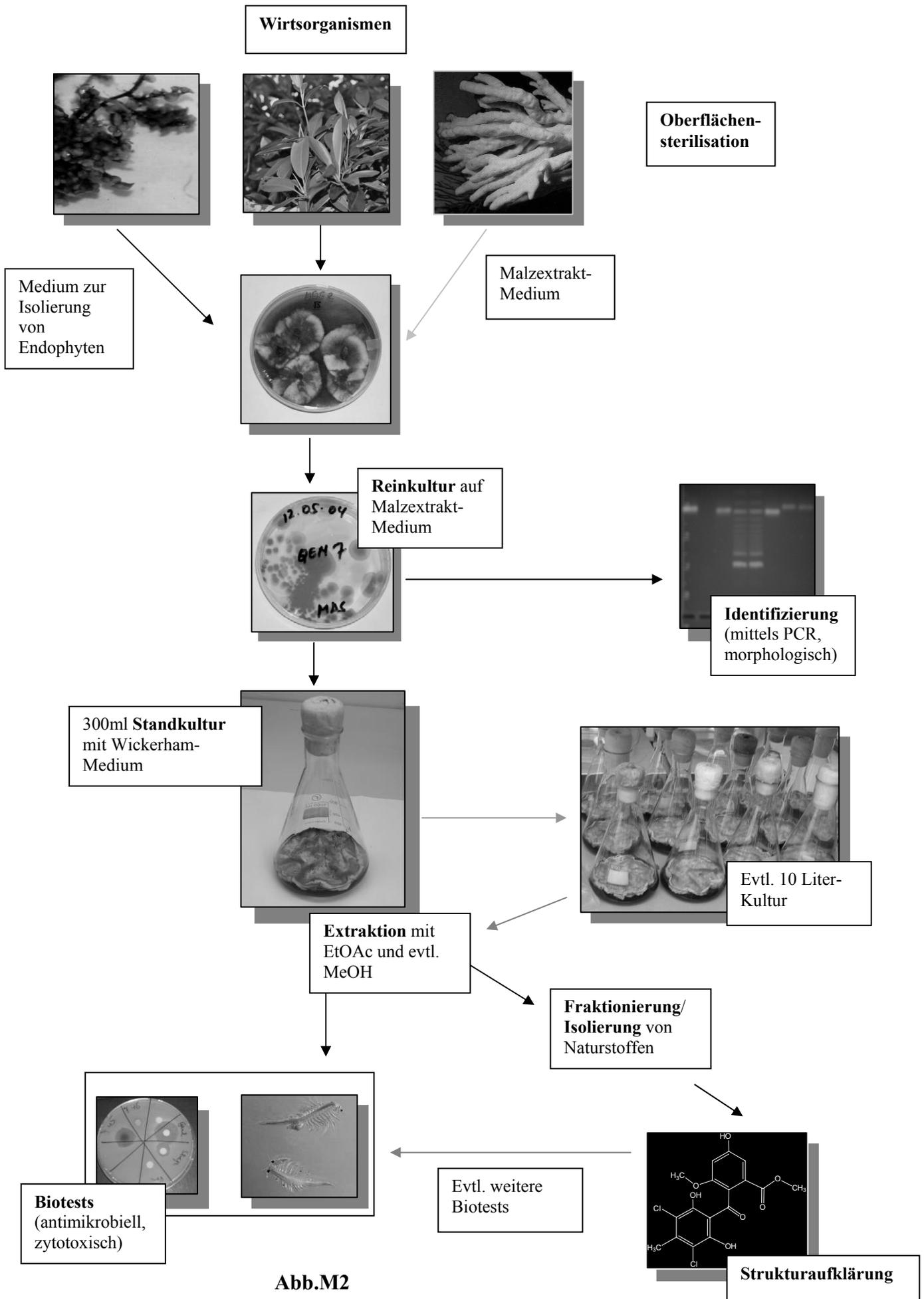


Abb.M2

2.3. Testung auf biologische Aktivität

2.3.1. Allgemeine Toxizität

Als Testorganismus für diesen Test wurde *Artemia salina* gewählt, ein Salinenkrebs der Familie der Crustaceen. Die toxische Wirkung biologischer Verbindungen auf die frisch geschlüpften Larven dient als wichtiger Hinweis für ihre biologische Aktivität. Die Methode wurde 1982 von Meyer *et al.* beschrieben.

Die Testorganismen wurden in einem gut belüfteten Inkubator mit künstlichem Meerwasser (33 g Meersalz / 1 l demineralisiertes Wasser) bei Raumtemperatur aus den im Zoofachhandel erworbenen Eiern von *Artemia salina* ausgebrütet. Nach 36-48 h schlüpfen die Larven, die dann direkt mit der Pasteurpipette entnommen und in die Probengläschen eingezählt wurden.

Von einer methanolischen Lösung der zu untersuchenden Proben wurden jeweils 500 µg und 1mg in 10ml Schnappdeckelgläsern überführt und an der Luft trocknen gelassen. Bei den verwendeten Proben handelte es sich jeweils um die Ethylacetatextrakte der Pilzkulturen.

Die so getrockneten Proben wurden dann in jeweils 40 µl DMSO gelöst und mit 2 ml künstlichem Meerwasser aufgefüllt. Jedem Gläschen wurden anschließend 20 Testorganismen mit der Pasteurpipette zugefügt und das Probengläschen dann mit Meerwasser auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Nach 24 h wurden die überlebenden Organismen ausgezählt und bei nennenswerter Aktivität der LC₅₀-Wert berechnet.

Zur Kontrolle wurden mehrere Parallelansätze beobachtet, die nur DMSO und Meerwasser enthielten.

2.3.2. Antibiotische und fungizide Aktivität

Testorganismen für die Testung auf antibiotische Aktivität waren die Bakterien *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Für den Test mit *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* wurde ein Luria-Bertoni Medium (Zusammensetzung siehe 2.3.2.1.) verwendet und für *Saccharomyces cerevisiae* ein Universalmedium für Hefen (Zusammensetzung siehe 2.3.2.1.).

Die fungizide Aktivität wurde mittels der Testorganismen *Cladosporium cucumerinum* und *Cladosporium herbarum* untersucht (Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums siehe 2.3.2.1.).

Kultiviert wurden diese Testorganismen zunächst in den jeweiligen Semi-Flüssigmedien (Zusammensetzung siehe 2.3.2.1., jedoch betrug der Zusatz von Agar hier jeweils nur 0.01%). Diese Flüssigkulturen wurden nach ausreichendem Wachstum mit Hilfe des Ultraturrax suspendiert und ein entsprechendes Aliquot zum Animpfen der Platten entnommen. Dieses Aliquot betrug für Bakterien 400 µl, für Hefen 200 µl und für Pilze 10 ml. Es wurde mittels einer Eppendorf-Pipette entnommen und anschließend mit einem Spatel gleichmäßig auf die Agarplatten aufgebracht.

Untersucht wurden jeweils die Ethylacetatextrakte der Kulturen bzw. die isolierten Reinsubstanzen gelöst in Methanol, Extrakte jeweils in einer Konzentration von 25 mg/ml und Reinsubstanzen in einer Konzentration von 5 mg/ml.

Die Proben wurden zunächst in zwei verschiedenen Volumina von jeweils 20 µl (entspricht 100 µg an Reinsubstanz und 500 µg an Extrakt) und 10 µl mit der Eppendorf-Pipette auf Filterpapierplättchen mit einem Durchmesser von 5 mm aufgebracht. Jeweils 8 dieser Plättchen wurden kreisförmig auf der Platte mit dem Testorganismus platziert und die Platte anschließend inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug für Pilze 27° C über 7 Tage, für Bakterien 37° C über 24 h und für Hefen 27° C ebenfalls über 24 h. Gemessen wurde dann der um die Plättchen gebildete Hemmhof, in dem kein Wachstum des Testorganismus zu verzeichnen war. Als Positivkontrollen dienten Gentamicin, Penicillin, Streptomycin sowie Nystatin (nur für Hefen und Pilze). Zur Negativkontrolle wurde jeweils das Lösungsmittel Methanol auf einem Plättchen getestet.

Positivkontrolle	EC 10µl- 20µl	BS 10µl- 20µl	SC 10µl- 20µl	CC 20µl	CH 20µl
Gentamicin	20 - 20	25 - 25			
Streptomycin	18 - 22	10 - 15			
Penicillin		12 - 15			
Nystatin			10 - 12	38	21

Tab.M4: Positivkontrollen im antibiotischen Assay, angegeben ist der Durchmesser des Hemmhofes [mm]

2.3.2.1. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Luria-Bertoni-Medium für *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*

Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
Natriumchlorid	10.0 g
Agar-Agar	15.0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (NaOH/HCl)	7.0

Universal-Hefe-Medium für *Saccharomyces cerevisiae*

Hefeextrakt	3.0 g
Malzextrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Glucose	10.0 g
Agar-Agar	15.0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Medium für *Cladosporium cucumerinum* und *Cladosporium herbarum*

Glucose	20.0 g
Agar-Agar	15.0 g
Kartoffelextrakt*	1000 ml

* 200 g Kartoffeln für 1 h in 1000 ml Wasser gekocht und anschließend durch ein feines Sieb passiert

Sämtliche Medien wurden unter Standardbedingungen autoklaviert.

2.3.3. Zytotoxizität

Die Testung auf zytotoxische Aktivität von ausgewählten Reinsubstanzen wurde durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Prof. W.E.G. Müller an der Universität Mainz.

Verwendet wurden die Zelllinien L5178Y (Lymphomzellen der Maus) sowie HeLa (humane Gebärmutterkrebszellen). L5178Y-Zellen wurden in „Eagle’s Minimal Essential Medium“ unter Zusatz von 10 % Serum vom Pferd [Kreuter *et al.* 1992; Müller *et al.*, 1985] unter Standardbedingungen [Drexler *et al.*, 1995] kultiviert.

Zum Zeitpunkt des Tests wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in frischem Medium in einer Konzentration von $10^4 \times 10^5$ Zellen/ml, je nach Zelllinie, suspendiert. Die tatsächlich vorliegende Zelldichte wurde in einer Zählkammer nach Anfärben mit Tryptophan-Blau festgestellt.

Die Zytotoxizität der Testsubstanzen wurde mithilfe des MTT-Assays bestimmt [Carmichael *et al.*, 1987]. Dieser Test bedient sich der Bestimmung der Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen anhand der Umsetzung des gelb gefärbten MTT-Salzes zu einem blau violetten Formazan-Farbstoff.

Die zu testenden, gefriergetrockneten Proben wurden zunächst in DMSO gelöst, mit Kulturmedium auf eine maximale Endkonzentration von 1 % DMSO verdünnt und anschließend jeweils 90 µl der Zellsuspension in jede Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte hineinpipettiert. Pro Vertiefung wurden zusätzlich 10 µl der Testlösung hinzugefügt. Danach wurden die Platten für 44 h bei 37° C in einer Atmosphäre inkubiert, die 5% CO₂ enthielt. Nach Zugabe von 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) wurde für weitere 4 h inkubiert. Die Endkonzentration an Testsubstanz lag nun jeweils bei 10-10000 ng/ml.

Durch Zusatz von 120 µl 5% iger Ameisensäure in Isopropylalkohol erfolgte die Lyse der Zellen. Die Auswertung des Tests erfolgte photometrisch mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (Titerack Multiscan, Flow Laboratories).

Als Kontrolle diente Medium unter Zusatz von DMSO.

2.4. Identifizierung der untersuchten Pilzstämmе

2.4.1. Identifizierung durch morphologische Charakterisierung

Die Identifizierung der ENI- und SPI-Stämme erfolgte anhand morphologischer Merkmale durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (NL).

2.4.2. Identifizierung anhand der Pilz-DNA

Die QEN- sowie die MGC-Stämme wurden anhand ihrer genetischen Information identifiziert. Hierzu wurde die DNA isoliert, mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt und nachfolgend sequenziert und mit einer Datenbank verglichen.

Die Entwicklung des nachfolgend beschriebenen Protokolls basiert auf Arbeiten von Arnulf Diesel und Ine Dewi Indriani im Rahmen ihrer Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die molekularbiologische Identifizierung der vorliegenden Pilzstämme wurde sowohl von Herrn Diesel, als auch von Frau Indriani durchgeführt.

2.4.2.1. Isolierung der DNA

Zunächst wurde einer Malzagarplatte mit der Reinkultur des zu untersuchenden Pilzes mit einer sterilen Impföse ein Stück Myzelium entnommen und in ein Eppendorf-Cap überführt. Anschließend wurde es darin über einige Stunden gefriergetrocknet.

Zur Isolierung der DNA aus dieser Probe wurde das DNeasy Plant Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die gefriergetrocknete Probe wurde zunächst in dem Eppendorf-Cap mithilfe einer Wolframcarbidgekugel in der Mixer Mill pulverisiert.

Anschließend wurden 400 µl eines AP1-Puffers zugegeben um eine Zellyse einzuleiten. Zur Verdauung der in der Probe enthaltenen RNA wurden weiterhin 4 µl einer RNase-A-Stammlösung in einer Konzentration von 100 mg/ml hinzugefügt. Dann wurde die Mischung gevortext und nach 10 minütiger Inkubation bei 65° C nochmals durchmischt.

Zur Ausfällung von Begleitstoffen wie Detergenzien, Proteinen und Polysacchariden wurden 130 µl AP2-Puffer hinzugefügt und nach vorherigem Durchmischen 5 min auf Eis inkubiert. Um die DNA grob zu zerlegen und Zellbruchstücke und Salzniederschläge zu entfernen, wurde das Lysat dann 2 min durch eine QIAshredder-Spin-Säule auf höchster Stufe zentrifugiert.

Das Pellet wurde verworfen und dem Überstand der ethanolische AP3/E-Puffer zugefügt und vermischt um eine Bindung der DNA an die DNeasy-Membran zu erreichen.

Danach wurde 1 min lang bei 8000 rpm durch eine DNeasy-Mini-Spin-Säule zentrifugiert und das Filtrat, welches Verunreinigungen wie Proteine und Polysaccharide enthält, verworfen. Nach Zugabe von 500 µl ethanolischem AW-Puffer wurde als zweiter Waschschrift abermals

1 min lang durch eine DNeasy-Säule zentrifugiert und die gefällte Fraktion abermals verworfen.

Um die Filtermembran zu trocknen und noch vorhandenes Ethanol zu entfernen, wurde ein weiteres mal 500 µl AW-Puffer hinzugegeben und 2 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die DNeasy-Säule wurde dann in ein Eppendorf-Cap überführt und 50 µl eines auf 65° C erwärmten AE-Puffers wurden anschließend direkt auf die DNeasy-Membran gegeben und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Eluieren der gelösten DNA wurde im Anschluß 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt und die DNA beider Elutionsschritte miteinander vereinigt.

2.4.2.2. Amplifizierung der DNA mittels PCR

Die isoliert vorliegende DNA wurde nun mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Hierzu wurden zu 5 µl der isolierten DNA (siehe 2.4.2.1.) 25 µl Taq-Polymerase-Mix, 5 µl einer Primerlösung der Konzentration 10 pmol/µl und 15 µl Wasser hinzugefügt. Der Taq-Polymerase-Mix setzt sich aus DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophylus aquaticus*, dNTPs (Desoxyribonucleinsäuretriphosphate) und verschiedenen Puffern zusammen. Als Primer dienten die spezifisch an Pilz-DNA bindenden Primer ITS1 (mit der Basensequenz TCCGTAGGTGAACCTGCGG) und ITS4 (mit der Basensequenz TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Zur Initialdenaturierung wurde das Gemisch 15 min lang bei 95° C inkubiert.

Die Trennung der DNA-Stränge erfolgte ebenfalls bei 95° C über den Zeitraum von 1 min.

Bei 56° C erfolgte innerhalb 1 min anschließend die Anlagerung der Primer und nachfolgend bei 72° C über 1 min die Kettenverlängerung. Die nach der Initialdenaturierung erfolgten Schritte der PCR wurden 35 mal durch das Temperaturprogramm wiederholt.

Bei 72° C erfolgte dann über den Zeitraum von 10 min die finale Kettenverlängerung.

2.4.2.3. Auftrennung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Das für die Elektrophorese verwendete Gel setzte sich aus 2 % Agarose in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) zusammen. Zum Anfärben der DNA wurden 5 µl einer 1 %igen Stammlösung

Ethidiumbromid pro 100 ml Gel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über 60 min bei 75 V. Zusätzlich wurde ein 100 bp Größenstandard geladen.

2.4.2.4. Reinigung des PCR-Produktes

Zur Reinigung des nach der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.2.3.) vorliegenden PCR-Produktes wurde das Perfectprep Gel Cleanup Kit der Firma Eppendorf verwendet.

Hierfür wurde zunächst die ca. 500 bp enthaltende Pilz-DNA aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-cap überführt. Dann wurde Bindungspuffer in dreifachem Volumen des Gelstückes hinzugefügt und 10 min bei 50° C inkubiert. Alle 2-3 min wurde gevortext um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. Nach vollständiger Auflösung des Gels wurde Isopropanol in gleicher Volumenmenge zum Gel hinzugefügt und die Lösung vermischt. Anschließend wurde die Probe 1 min lang bei 8000 rpm über eine Spin-Säule zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nach Verwerfen des Filtrats und Zusatz von 750 µl DILUTED-Wasch-Puffer zur Spin-Säule wiederholt. Um den verbleibenden Waschpuffer zu entfernen wurde nach abermaligem Verwerfen des Filtrats ein drittes Mal zentrifugiert. Nach Überführen der Säule in ein neues Auffanggefäß wurden 30 µl Eluierungs-Puffer hinzugefügt und bei 8000 rpm zentrifugiert. Die nach Verwerfen der Säule in dem Auffanggefäß verbleibende aufgereinigte DNA-Lösung wurde nachfolgend bei einer Temperatur von -20° C aufbewahrt.

2.4.2.5. Sequenzierung der DNA

Die in 2.4.2.4. erhaltene isolierte und aufgereinigte DNA wurde von der Firma SeqLab in Göttingen sequenziert. Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde anschließend mithilfe des BLAST-Algorithmus mit Sequenzen der Datenbank Genbank verglichen. Auf diese Weise konnte schließlich der Pilz anhand seiner DNA identifiziert werden.

2.4.2.6. Verwendete Geräte/Chemikalien

PCR

Hot Star Taq Mastermix	Qiagen
Primer	Invitrogen
iCycler	BioRad

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	Serva
TBE-Puffer	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Größenstandard	NEB

2.5. Isolierung der Naturstoffe aus den Pilzen

Die wie in 2.1.5. beschrieben erhaltenen Extrakte wurden mittels verschiedener chromatographischer Methoden fraktioniert und schließlich so letztendlich die von den Pilzen produzierten sekundären Naturstoffe aus ihnen isoliert.

Die verwendeten Fließmittelsysteme wurden jeweils mittels DC (siehe 2.5.5.) bzw. im Falle der semipräparativen HPLC mittels analytischer HPLC (siehe 2.5.6.) ermittelt.

2.5.1. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)

Die VLC diente meist zur primären Auftrennung der Rohextrakte in einzelne Fraktionen verschiedener Polarität.

Die aus Glas bestehende nach oben hin offene Glassäule besaß oberhalb des Abflusses und des seitlich davon befindlichen Vakuumansaugstutzens eine Fritte. Oberhalb dieser Fritte war die Säule mit Kieselgel (Kieselgel 60, Korngröße 0.2-0.5 mm, Merck) gefüllt. Mit diesem Kieselgel wurde auch die in einem geringen Volumen an geeignetem Lösungsmittel angelöste Probe verrieben und auf die Säulenfüllung aufgebracht.

Die Elution erfolgte stufenweise mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol. Abschließend wurde nochmals mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser eluiert.

Beschleunigt wurde die Elution der einzelnen Fraktionen von der Säule durch das angelegte Vakuum. Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels DC und HPLC überprüft.

2.5.2. Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie wurde zur weiteren Auftrennung der aus der VLC erhaltenen Fraktionen oder zur Auftrennung kleinerer Mengen an Rohextrakten verwendet.

Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils mit dem Fraktionssammler aufgefangen.

Sephadex

Der Trennung mittels Sephadex (verwendet wurde Sephadex LH-20, Sigma) liegen die Größenausschlusschromatographie sowie auch Adsorptionseffekte zugrunde. Als Fließmittel dienten 100 % Methanol bzw. Gemische aus Methanol und Dichlormethan.

Moleküle kleinerer Größe verweilten hierbei länger auf der Säule als größere.

Kieselgel

Die Trennung erfolgte über Kieselgel (verwendet wurde Kieselgel 60, Korngröße 0.2-0.5 mm, Merck) als polare stationäre Phase und ein apolares Fließmittel, zumeist Dichlormethan mit Methanol, wobei hydrophobe Substanzen die Säule schneller verließen als hydrophile.

2.5.3. Semipräparative HPLC

Die semipräparative HPLC diente der Aufreinigung von Reinsubstanzen oder der Auftrennung kleinerer, weniger komplexer Fraktionen mit einer Masse unterhalb von 30 mg.

Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Methanol und NANOpur-Wasser (teilweise unter Zusatz von 0.1 % TFA). Die Flussrate betrug 5 ml/min. Die Probe wurde, wenn möglich, in dem Lösungsmittelgemisch des Anfangsgradienten aus Methanol und Wasser in einer Konzentration von 6 mg/ml bei einem Injektionsvolumen von 500 µl pro Injektion gelöst. Mittels eines UV-Detektors konnte festgestellt werden, wann eine Substanz von der Säule eluiert wurde und diese dann in einem Probengefäß gesammelt werden.

Pumpe	LaChrom L-7100, Merck/ Hitachi
Detektor	LaChrom L-7400, Merck/ Hitachi
Schreiber	Chromato-Integrator D-2000, Merck/ Hitachi
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Vorsäule	Eurospher 100-C18, Knauer

2.5.4. Flüssig/Flüssig-Verteilungs-Chromatographie (FCPC)

Diese Methode ermöglicht es, durch Phasentrennung Substanzgemische aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Substanzen aufzutrennen. Dies erfolgt über mehr als 1000 Kavitäten, die sich auf einem Rotor befinden. Die Kavitäten werden mit der stationären flüssigen Phase befüllt und bei laufendem Rotor die mobile flüssige Phase durch die stationäre Phase gepumpt.

Auf diese Weise wurde der Ethylacetatextrakt von *Aspergillus niger* (ENI-P2) fraktioniert. Benutzt wurde dazu ein Gerät der Firma Alphacrom, das sich zu Demonstrationszwecken am Institut befand, unter Verwendung eines Fließmittel-Gemisches bestehend aus gleichen Teilen Hexan, Methanol, Ethylacetat und Wasser.

2.5.5. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente der Optimierung von Fließmittelgemischen und zur Überprüfung der Zusammensetzung von Fraktionen in der Säulenchromatographie sowie der Überprüfung der Reinheit isolierter Substanzen. Verwendet wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F₂₅₄ der Firma Merck. Als mobile Phase dienten verschiedene Lösungsmittelgemische, zumeist ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol, die Laufstrecke betrug jeweils ca. 8cm bei Kammersättigung.

Die so getrennten Substanzen wurden im UV-Licht bei 254 nm durch Fluoreszenzlöschung oder bei 366 nm durch Eigenfluoreszenz detektiert. Gegebenenfalls wurde die Platte anschließend noch mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (DAB 10) besprüht und anschließend auf ca. 110° C auf der Heizplatte erhitzt.

2.5.6. Analytische HPLC

Die Hochleistungsflüssigchromatographie wurde eingesetzt um die Zusammensetzung vereinigter Fraktionen der Säulenchromatographie festzustellen, isolierte Substanzen auf ihre Reinheit zu überprüfen und durch Vergleich mit der internen UV-Spektrenbibliothek bereits bekannte Substanzen zu identifizieren sowie geeignete Fließmittelgradienten für die semipräparative HPLC zu finden.

Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Methanol (Elutionsmittel 1) und NANOpur-Wasser pH 2.0 (Elutionsmittel 2, eingestellt mit ortho-Phosphorsäure) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die zu vermessenden Proben waren in 100% Methanol gelöst.

Standardgradient:	<u>Zeit [min]</u>	<u>Elutionsmittel 1 [%]</u>	<u>Elutionsmittel 2 [%]</u>
	0	10	90
	5	10	90
	35	100	0
	45	100	0
	46	10	90
	60	10	90

Wurde mit dem Standardgradienten keine optimale Trennung erreicht, wurde der Gradient variiert und den zu trennenden Substanzen angepasst.

Pumpe	P 580, Dionex
Steuerung	Chromeleon V6.3
Probengeber	ASI-100, Injektionsvolumen 20 µl, Dionex
Säulenofen	STH 585, Dionex
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Detektor	UVD 340 S, Dionex

2.5.7. HPLC-MS

Die HPLC-MS ermöglicht durch Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Elektronenspray-Massenspektrometrie eine Identifikation der Molekulargewichte von

Reinsubstanzen sowie auch von Substanzen als Bestandteilen von Substanzgemischen. Außerdem kann die ESI-MS nicht nur über Bestimmung des Molekulargewichtes von Substanzen sondern auch durch weitere Fragmentierung über das MS/MS-Verfahren zur Strukturaufklärung beitragen. Über die HPLC-MS war außerdem eine Detektion von Substanzen möglich, die keine UV-Absorption zeigten und so über die analytische HPLC nicht detektiert werden konnten.

Als Fließmittel diente ein Gemisch aus NANOpur-Wasser (Zusatz von 0.1 % Ameisensäure, Elutionsmittel 2) und Methanol bzw. Acetonitril (Elutionsmittel 1). Die Flussrate betrug 0.4 ml/min. Die zu vermessenden Proben waren jeweils in 100 % Methanol gelöst.

Gemessen wurde standardmäßig sowohl im positiven wie auch im negativen Probenmodus.

Standardgradient:	Zeit [min]	Elutionsmittel 1 [%]	Elutionsmittel 2 [%]
	0	10	90
	2	10	90
	35	100	0
	45	100	0
	47	10	90
	60	10	90

Der Standardgradient wurde im Einzelfall, wenn erforderlich, optimiert.

HPLC	HP 1100, Agilent
MS	Finnigan LCQ ^{Deca} , Thermoquest
Ionenquelle	ESI und APCI, Thermoquest
Pumpe	Edwards 30, BOC
Injektor	G 1313 A ALS 1100, Agilent
Säule	Knauer Eurospher 100; C-18A
Detektor	G 1315 B DAD 1100, Agilent
Steuerung	Xcalibur, Version 1.3

Über Direkteinlass konnten Reinsubstanzen auch direkt in die MS appliziert werden ohne vorherige Trennung über die HPLC-Säule.

2.6. Identifizierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe

2.6.1. UV-Vis-Spektroskopie

Da UV-Spektren ein charakteristisches Merkmal von Substanzen und deren Derivaten darstellen, können sie als ein wichtiges Merkmal bei der Strukturaufklärung herangezogen werden. Gemessen wurden die Spektren mithilfe des DAD-Detektors der analytischen HPLC-Anlage (siehe 2.5.6.) in einem Messbereich von 210-595 nm. Die Spektren wurden anschließend mit einer internen Spektrenbibliothek sowie Literaturwerten verglichen.

2.6.2. Massenspektrometrie (MS)

Die verschiedenen Verfahren der Massenspektrometrie stellen ein wichtiges Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung dar. Mit ihrer Hilfe können Aussagen über das Molekulargewicht einer Substanz, anhand deren Fragmentierungsmuster Hinweise auf die Struktur eines Moleküls sowie mit Hilfe der Hochauflösungs-MS Aussagen über die Summenformel einer Verbindung getroffen werden.

ESI-MS (Electro -Spray-Ionisation)

Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Probenlösung (in Methanol) bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von 2-5 kV durch eine Kapillare gesprüht. Die entstehenden Tröpfchen sind dann elektrisch geladen und werden entsprechend ihrer Größe und Ladung detektiert.

Die Messung von ESI-MS-Spektren wurde mit einem LC-MS-Gerät Finnigan LCQ^{DecaXP}, Thermoquest (siehe 2.5.7.) durchgeführt. Die Auftrennung über eine HPLC-Säule ermöglichte es, Massenspektren auch von Substanzen als Bestandteile eines Substanzgemisches zu erhalten. Über den Direkteinlass konnten jedoch auch Reinsubstanzen direkt vermessen werden.

Da die Methode als sehr schonend bezeichnet werden kann, fragmentieren die Moleküle weniger stark als dies zum Beispiel bei der EI-MS der Fall ist, lassen dadurch aber meist eindeutige Rückschlüsse auf das Molekulargewicht einer Substanz zu.

EI-MS (Electron-Impact)

Bei diesem Verfahren wird die ungelöste Probe verdampft und anschließend in ein Hochvakuum überführt, wo die Moleküle mit einem Elektronenstrahl (10-100 eV) ionisiert und dann in einem angelegten Magnetfeld beschleunigt werden. Durch kontinuierliches Verändern der Feldstärke können die einzelnen Ionen entsprechend ihrer Masse getrennt und detektiert werden.

Die Messung der EI-Spektren erfolgte am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf durch Dr. Keck und Dr. Tommes mit einem Gerät des Typs Finnegan MAT 8200. Bei dieser Methode ist eine starke Fragmentierung der Moleküle zu verzeichnen, was Rückschlüsse auf deren Struktur zulässt.

HR-MS (High-Resolution)

Mithilfe der auf diese Weise bestimmten exakten Masse eines Moleküls können Rückschlüsse auf dessen elementare Zusammensetzung gezogen werden, so lässt sich die Summenformel einer Substanz bestimmen.

Dies wurde für die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen neuen Naturstoffe am „Peking University Health Science Center“ der „Beijing Medical University“ in Peking (VR China) durchgeführt mit einem Gerät des Typs GCT-MS, Micromass UK.

2.6.3. NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

Die bei den verschiedenen NMR-Verfahren gemessenen chemischen Verschiebungen (δ in ppm), Kopplungskonstanten (J in Hz) sowie Integrale der Peakflächen von Protonen wie auch C-Atomen von Molekülen liefern wichtige Hinweise zu deren Struktur. Auf diese Weise können bekannte Strukturen durch Vergleich mit Literaturwerten identifiziert wie auch die Struktur neuer Naturstoffe aufgeklärt werden.

Gemessen wurden die 1D-Experimente ^1H -NMR, ^{13}C - und DEPT sowie die 2D-Experimente, H-H-COSY (H-H-Kopplungen), HMQC (H-C-Direkt-Kopplungen), HMBC (H-C-Kopplungen) sowie NOESY. Die Proben wurden jeweils gelöst in CD_3OD , DMSO- d_6 oder CDCl_3 sowie im Falle der Aminosäuren in D_2O .

Der Hauptteil der Messungen wurde durchgeführt am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf durch Dr. Peters mit einem Gerät des Typs DRX-500, Bruker.

Weitere Messungen erfolgten bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GBF in Braunschweig durch Dr. Wray an Spektrometern des Typs AM-300, ARX-400 sowie DMX-600, Bruker. Ausgewählte Substanzen wurden an der Beijing Normal University in Peking/China mit einem Gerät des Typs Bruker 500 Ultra Shield durch Prof. Deng vermessen.

2.6.4. Optische Drehung

Moleküle, die mindestens ein chirales Zentrum besitzen, vermögen die Ebene des linear polarisierten Lichtes zu drehen. Auf diese Weise können Enantiomere voneinander unterschieden werden, da das D- oder (+)-Isomer eines Moleküls die Ebene des polarisierten Lichtes im Uhrzeigersinn zu drehen vermag, das L- oder (-)-Isomer hingegen entgegen dem Uhrzeigersinn. Diese Methode lässt so Rückschlüsse auf die absolute Stereochemie von Verbindungen zu.

Bestimmt wurde die optische Aktivität von Reinsubstanzen gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel UV-grade, bei bekannten Verbindungen in dem in der Literatur angegebenen um einen Vergleich zu ermöglichen. Verwendet wurde das Polarimeter 241 MC, Perkin Elmer. Gemessen wurde $[\alpha]_D^{20}$ bei der Natrium-D-Linie von 589 nm in einer auf 20°C temperierten Küvette bei einer Schichtdicke von 10 cm.

Dem schließlich gemessenen Drehwert liegt folgende Formel zugrunde:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \times \alpha}{l \times c}$$

α = gemessener Drehwinkel in Grad

l = Schichtdicke der Küvette in dm

c = Konzentration der Substanz in g/100 ml

Als Vergleichsstandard diente (+)-Rutin 1%ig in Ethanol mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +12.4^\circ$.

2.6.5. Bestimmung der absoluten Konfiguration von Aminosäuren

Die Marfey-Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die absolute Konfiguration der Peptide Callyaerin A-F aufzuklären.

Die diastereomeren Marfey-Reagenzien FDAA (1-Fluor-Dinitrophenyl-5-L-Alanin) und FDLA (1-Fluor-Dinitrophenyl-5-L-Leucin) überführten die enantiomeren D- und L-Aminosäuren in diastereomere Reaktionsprodukte [Marfey 1984], die so über die analytische HPLC bzw. LC-MS voneinander getrennt und detektiert werden konnten (siehe Abb.E59, E60). Adäquat hierzu wurden käuflich erworbene Aminosäuren ebenfalls mit den Marfey-Reagenzien umgesetzt und als Vergleichs-Standards verwendet. Vermessen wurden hierbei jeweils die L-Form der Aminosäuren sowie das entsprechende Racematgemisch.

Zu diesem Zweck mussten die Peptide zunächst hydrolysiert werden. Dazu wurde jeweils 0.5-1 mg Substanz in 1-2 ml 6N HCl gelöst und in einem unter Stickstoffatmosphäre zugeschmolzenen Glasröhrchen für 24 h bei 110° C inkubiert. Das entstehende Aminosäurengemisch wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in Wasser gelöst und dann mit Marfey-Reagenz ebenso wie die Standard-Aminosäuren derivatisiert.

Hierzu wurden 50 µl einer 50 mM Lösung Aminosäure in Wasser (entspricht 2.5 µmol) in ein Eppendorf-Cap überführt und mit 100 µl einer 1 %igen Lösung von Marfey-Reagenz in Aceton (entspricht 3.6 µmol) sowie 20 µl einer 1M-Lösung von Natriumhydrogencarbonat (entspricht 20 µmol) versetzt. Bei gelegentlichem Durchmischen wurde 1 h lang bei 40° C inkubiert. Nach erfolgter Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 µl einer 2M Lösung konzentrierter Salzsäure (entspricht 20 µmol) hinzugefügt um die Reaktion abzustoppen und das Gemisch dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die anschließend in 1000 µl Methanol gelöste Probe konnten danach mithilfe der LC-MS bzw. HPLC analysiert werden. War die Probe schwerlöslich, wurden wenige µl einer 0.1 % Ameisensäure-Lösung zugesetzt.

2.7. Verwendete Geräte und Chemikalien

Aufgeführt sind nur die noch nicht in den vorangegangenen Kapiteln unter den jeweiligen Methoden erwähnten Geräte.

2.7.1. Geräte

Autoklav	Varioklav, H&P
Cleanbench	HERAsafe, Heraeus
Digital-pH-Meter	420Aplus, Orion
Fraktionssammler	Retriever II, ISCO
Gefriertrockner	Lyovac GT2, Steris
-80°C-Gefriertruhe	Forma Scientific, 86-Freezer
Heizplatte	Camag
Injektionsspritzen	Hamilton
Magnetrührer	Combi Mag, IKA
Rotationsverdampfer	Rotavapor R200, Büchi
Trockenschrank	Kelvitron, Heraeus
Ultraschallbad	Sonorex RK 510S, Bandelin
Ultra Turrax	T18 basic, IKA
UV-Lampe	Camag
Vakuumzentrifuge	SpeedVac SPD 111V, Savant
Waagen	Sartorius 2354
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus

2.7.2. Chemikalien

Die für die Säulenchromatographie sowie DC verwendeten Lösungsmittel wurden in technischer Qualität vom Chemikalienlager der HHU Düsseldorf bezogen und vor Gebrauch destilliert.

Fließmittel für HPLC und LC-MS

Acetonitril	LiChroSolv HPLC grade, Merck
Methanol	LiChroSolv HPLC grade, Merck

Lösungsmittel für NMR

CDCl ₃	euriso-top
CH ₃ OD	euriso-top
DMSO-d ₆	euriso-top

Bestandteile der Nährmedien

Agar-Agar	Galke
Chloramphenicol	Sigma
Glucose	Caelo
Hefeextrakt	Sigma
Malzextrakt	Merck
Meersalz	Biomarine
Natriumchlorid	Merck
Pepton	BD
Trypton	Sigma

Marfey-Methode

FDA	TCI
FDLA	TCI
Natriumhydrogencarbonat	Merck
HCl	Merck
Aminosäure-Standards	ICN

3. Ergebnisse

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die gezielte Isolierung biologisch aktiver Naturstoffe aus Pilzen. Diese Pilze stammten sämtlich aus dem marinen Habitat, assoziiert jeweils mit marinen Algen, Mangroven bzw. Schwämmen.

Nach Isolierung der Endophyten aus den jeweiligen Wirtsorganismen wurden die Pilze in 300 ml Standkulturen kultiviert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die resultierenden Ethylacetat-Extrakte wurden zunächst chemisch analytisch sowie auf ihre Bioaktivität hin untersucht. Die im Rahmen dieses primären Screenings durchgeführten Biotests waren der „Brine Shrimp Assay“ auf allgemeine Toxizität sowie die Testung auf antibiotische und fungizide Aktivität. Testorganismen hierfür waren *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium cucumerinum* und *Cladosporium herbarum*. Biologisch aktive Extrakte wurden zur Isolierung der von ihnen gebildeten Sekundärstoffe ausgewählt.

In Ausnahmefällen wurden jedoch auch nicht oder nur bedingt biologisch aktive Pilze einer weiteren analytischen Untersuchung unterzogen und für eine weitere Bearbeitung herangezogen, sofern die Extrakte chemisch aussichtsreich erschienen, da außer den oben aufgeführten auch weitere Bioaktivitäten von Interesse waren, diese jedoch nicht routinemäßig mit allen Extrakten durchgeführt werden konnten. So wurde der Hauptteil der isolierten Reinsubstanzen letztendlich weiteren Biotests unterzogen, wie zum Beispiel der Testung auf Zytotoxizität an der Universität Mainz, durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Prof. W.E.G Müller. Für den Großteil der bearbeiteten Pilzstämmen war die Ausbeute einer 300 ml- bzw. 600 ml-Standkultur bereits ausreichend, um die produzierten Sekundärstoffe zu isolieren. Für eine 10 l Kultur ausgewählt wurde *Aspergillus sydowii* (ENI-A1).

Neben der gezielten Isolierung von Reinsubstanzen aus marinen Pilzen wurde auch die Auswirkung verschiedener Faktoren auf deren Stoffwechselaktivität untersucht, wie der Einfluss diverser Kulturbedingungen auf Menge und Art der gebildeten Naturstoffe. So wurden auch Vergleiche zwischen den Bioaktivitäten algenassoziiierter Pilze der gemäßigten und tropischen Klimate angestellt. Die jeweiligen Inhaltsstoffmuster der Wirtsorganismen wurden mit denen der assoziierten Pilze verglichen, um eventuelle Hinweise auf gegenseitige Wechselwirkungen der Stoffwechsel von Wirt und Endophyt zu erhalten.

3.1. Ergebnisse der Bearbeitung der algenassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)

3.1.1. Screening auf Bioaktivität

Untenstehende Tabelle zeigt deutlich, dass die aus marinen Algen des tropischen Indischen Ozeans isolierten Pilze ein hohes Ausmaß an Bioaktivitäten aufweisen. Bis auf *Eurotium amstellodami* erwiesen sich alle Extrakte als antibiotisch aktiv gegen zumindest einen der aufgeführten Testorganismen. Getestet wurden jeweils die Ethylacetatextrakte der Standkulturen in einer Konzentration von 25 mg/ml im antibiotischen Test und in den Konzentrationen 100 sowie 200 µg/ml im Brine Shrimp Assay.

Bezeichnung Pilzstamm	Identifikation Pilzstamm	Wirtsorganismus	Antibiotischer Assay		Brine Shrimp Assay 100 - 200 [µg/ml] Letalität [%]
			HH [mm] EC--BS--SC	CC--CH	
ENI - C1	<i>Eurotium amstellodami</i>	<i>Caulerpa peltata</i>	0 - 0 - 0	0 - 0	0 - 0
ENI - C2	nicht identifizierbar	<i>Caulerpa peltata</i>	20 - 0 - 0	20 - 15	0 - 20
ENI - P2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Padina gymnospora</i>	12 - 0 - 0	0 - 0	0 - 15
ENI - P3	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Padina gymnospora</i>	20 - 13 - 0	25 - 0	20 - 20
ENI - P4	nicht identifizierbar	<i>Padina sp.</i>	10 - 0 - 0	0 - 0	0 - 0
ENI - P5	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Padina gymnospora</i>	15 - 0 - 0	0 - 0	0 - 25
ENI - P6	<i>Fusarium decemcellulare</i>	<i>Padina gymnospora</i>	13 - 10 - 0	0 - 0	25 - 50
ENI - P7	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Padina gymnospora</i>	10 - 0 - 12	0 - 0	80 - 95
ENI - P8	<i>Doratomyces cf. microsporus</i>	<i>Padina sp.</i>	14 - 0 - 0	0 - 0	0 - 0
ENI - P9	<i>Fusarium semitectum var. majus</i>	<i>Padina sp.</i>	15 - 10 - 0	38 - 21	0 - 0
ENI - D1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Dictyota sp.</i>	15 - 7 - 0	0 - 0	0 - 0
ENI - S1	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Sargassum sp.</i>	0 - 0 - 0	30 - 0	100 - 100
ENI - A1	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Acanthophora spicifera</i>	15 - 12 - 0	0 - 0	0 - 0

EC = *Escherichia coli*, BS = *Bacillus subtilis*, SC = *Saccharomyces cerevisiae*,
CC = *Cladosporium cucumerinum*, CH = *Cladosporium herbarum*

Tab.E1: Ergebnisse der Biotests der algenassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)

3.1.2. Inhaltsstoffe aus *Aspergillus niger* (ENI-P2; ENI-D1)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Stämme von *Aspergillus niger* sowohl aus *Padina gymnospora* als auch aus *Dictyota* sp. des gleichen Standortes isoliert werden. Ein *Aspergillus niger*-Stamm war auch aus dem Mittelmeerschwamm *Axinella damicornis* bei früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert worden [Hiort *et al.* 2004]. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der einzelnen Pilzstämme konnten die ungewöhnlichen Pyranopyrrole Pyranonigrin A, B und C, die von Hiort *et al.* 2004 beschrieben wurden, hier zum zweiten Mal in einem Pilz mariner Herkunft nachgewiesen werden. Weitere aus dem schwammassoziierten Pilz isolierte Sekundärstoffe (Cycloleucomelon, ein Biscoumarin-Derivat, Aspernigrin A und B, Pyranonigrin D) konnten in diesen vorliegenden Pilzen des tropischen Habitats nicht gefunden werden. Neben den aufgeführten Pyranonigrinen wurde das Mykotoxin Fonsecain isoliert.

Im Biotest zeigte sich der Ethylacetat-Extrakt des Pilzes aktiv gegen *Escherichia coli* sowie moderat aktiv im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml, was möglicherweise auf die toxische Wirkung des Fonsecains zurückzuführen ist.

A. Pyranonigrin A

Pyranonigrin A konnte bereits anhand der ESI-Massenspektren und UV-Spektren durch Vergleich mit der authentischen Reinsubstanz [Hiort *et al.* 2004] eindeutig aus dem über FCPC aufgetrennten Ethylacetatextrakt von *Aspergillus niger* identifiziert werden. Das UV-Spektrum zeigte übereinstimmende Maxima bei 210, 250 und 312 nm. Das Molekulargewicht ließ sich mithilfe des ESI-MS-Spektrums auf 223 amu festlegen, im positiven Modus dominierte der $[2M+Na]^+$ -Peak, im Negativmodus jeweils der $[M+HCOO]^-$ -Peak. Die Konformität der Retentionszeiten der HPLC-Chromatogramme mit der Vergleichssubstanz, unter Benutzung des gleichen Lösungsmittelgradienten, konnte die Identität der vorliegenden Struktur bestätigen. Die zusätzliche Übereinstimmung des Drehwertes von $[\alpha]_D^{20}$: + 60° machte deutlich, dass es sich auch um identische Stereoisomere handeln musste.

Pyranonigrin A

Systematischer Name: (*R*)-2,6-Dihydroxy-5-propenyl-1,2-dihydro-pyrano[3,2-*b*]pyrrol-3-7-dion

Probencode: ENI-P2- FC-2; (ENI-D1)

Quellorganismus: *Aspergillus niger* (aus *Padina gymnospora*)

Substanzmenge: (46.8 mg)

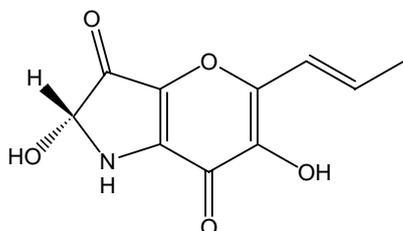
Beschreibung: weiße Nadeln

Summenformel: C₁₀H₉NO₅

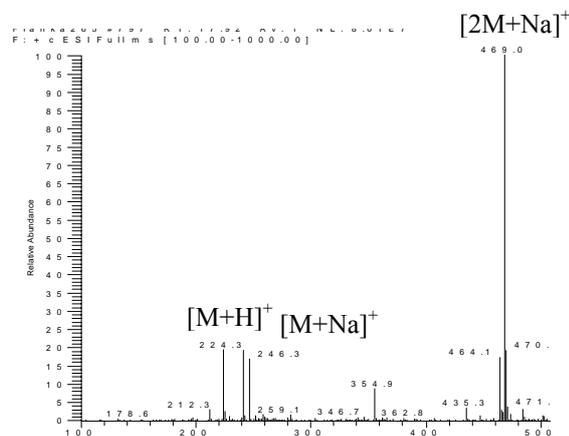
Molekulargewicht: 223 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: +60° (c = 1.0, DMSO)

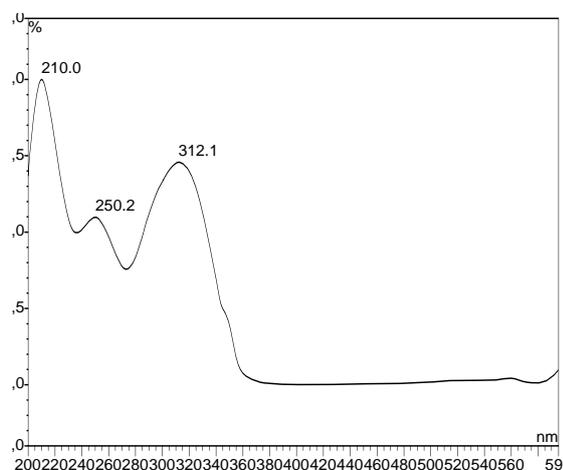
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 15.0 min



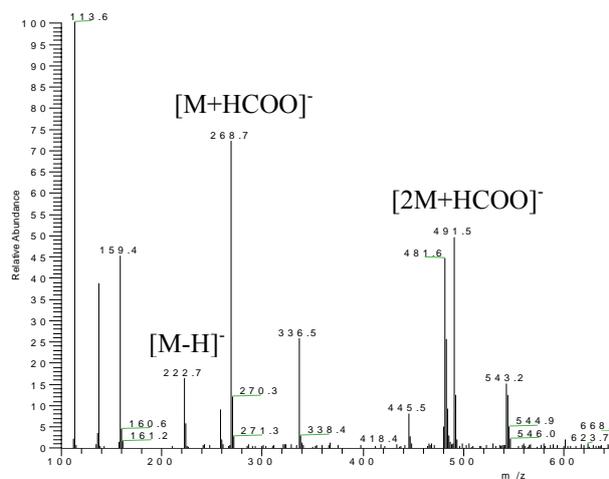
ESI-MS :



UV-Spektrum



ESI-MS 9



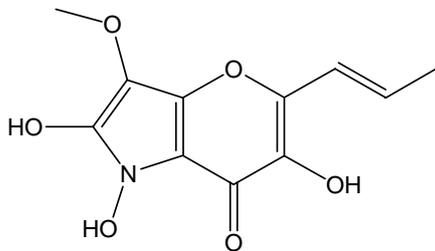
B. Pyranonigrin B, C**Pyranonigrin B, C****Systematischer Name:**

(B) 1,2,6-Trihydroxy-3-methoxy-5-propenyl-1H-pyrano-[3,2-b]pyrrol-7-on

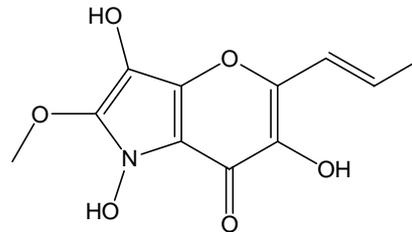
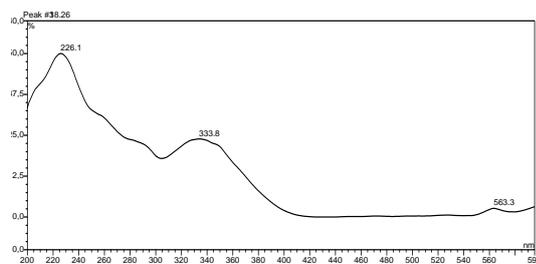
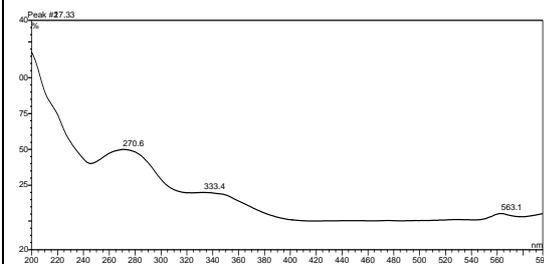
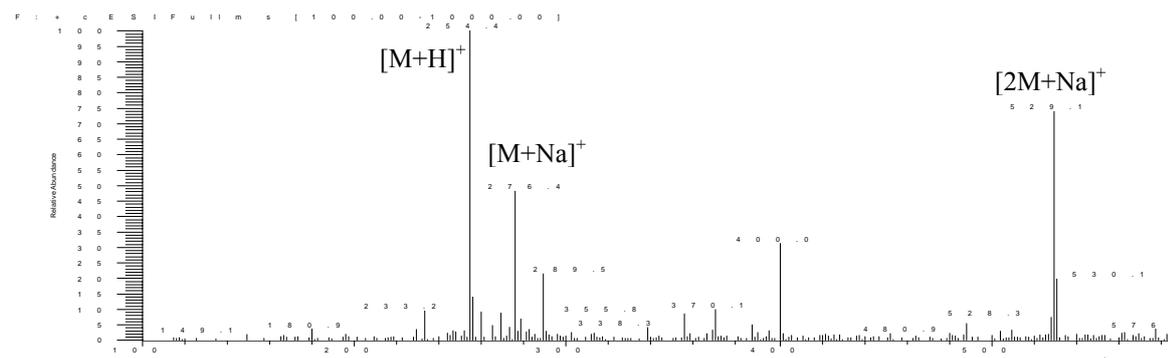
(C) 1,3,6-Trihydroxy-2-methoxy-5-propenyl-1H-pyrano-[3,2-b]pyrrol-7-on

Probencode: ENI-P2- FCPC; (ENI-D1)**Quellorganismus:** *Aspergillus niger* (aus *Padina gymnospora*)**Beschreibung:** gelbes Pulver**Summenformel:** C₁₁H₁₁NO₆**Molekulargewicht:** 253 g/mol**Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):** (B) 18.3 min; (C) 17.4 min

(B)



(C)

**UV-Spektrum (B)****UV-Spektrum (C)****ESI-MS :**

Pyranonigrin B und C wurden ebenfalls bereits anhand übereinstimmender ESI-Massenspektren und UV-Spektren sowie HPLC-Retentionszeiten mit der Vergleichssubstanz aus dem über FCPC aufgetrennten Ethylacetatextrakt identifiziert.

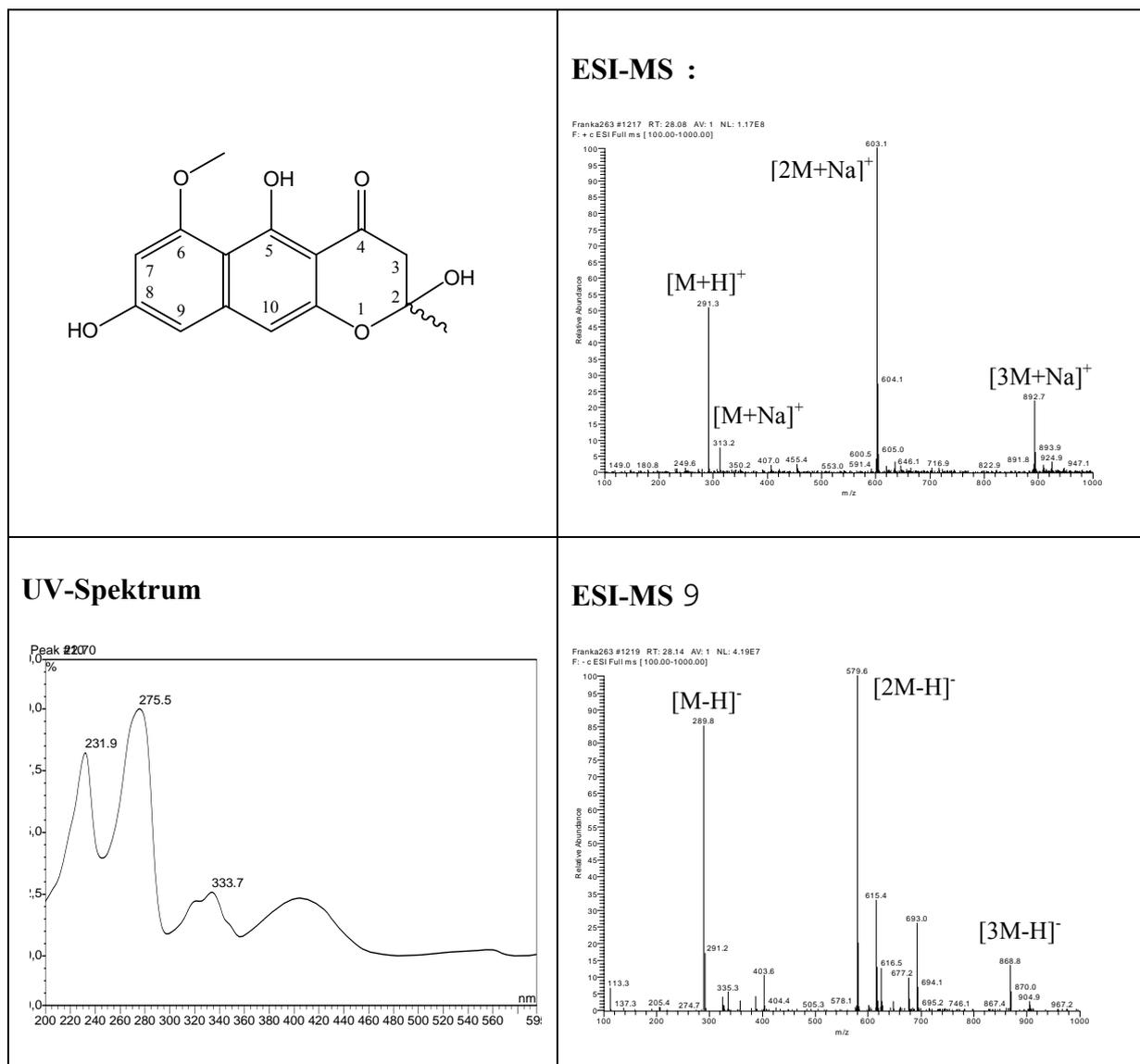
C. Fonseca

Dieses bekannte Mykotoxin ließ sich in dem über Flüssig/Flüssig-Verteilungs-Chromatographie (FCPC) aufgetrennten Ethylacetatextrakt von *Aspergillus niger* nachweisen. Zunächst fiel das charakteristische UV-Spektrum mit den Maxima bei 232, 275, 321, 334 und 400 nm auf. Diese Werte stimmten exakt mit den in der Literatur angegebenen überein [Galmarini *et al.* 1965]. Anhand eines deutlichen Pseudomolekülionenpeaks des ESI-Massenspektrums sowie des Zweifach- und Dreifachadduktes konnte das Molekulargewicht von 290 amu ermittelt werden. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte deutlich das Vorhandensein einer Methylgruppe bei 1.98 ppm und einer Methoxyfunktion bei 4.02 ppm. Weiterhin ließen sich drei Protonen im aromatischen Bereich (H-7, H-9 und H-10) sowie zwei Protonen im aliphatischen Bereich (H₂-3) nachweisen. Die in CD₃OD gemessenen ¹H-NMR-Daten wichen geringfügig von den in der Literatur angegebenen ab (Tab.E2), da hier DMSO als Lösungsmittel verwendet wurde [Priestap *et al.* 1984].

Die Substanz zeigte im antibiotischen Test eine dem Penicillin vergleichbare Aktivität gegenüber dem Testorganismus *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 5 mg/ml.

Für die optische Drehung wurde ein Wert von $[\alpha]_D^{20}$: -19° ermittelt.

Fonseca	
Systematischer Name:	2,5,8-Trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-2,3-dihydrobenzo[g]chromen-4-on
Probencode:	ENI-P2- FC-1B; (ENI-D1)
Quellorganismus:	<i>Aspergillus niger</i> (aus <i>Padina gymnospora</i>)
Substanzmenge:	5.5 mg
Beschreibung:	braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Molekulargewicht:	290 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	-19° (c = 0.1, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	22.7 min



Position	δ_H (J Hz)	Position	δ_H (J Hz)
1		6	
2		6-OCH ₃	4.02 s (3H)
2-CH ₃	1.98 s (3H)	7	5.56 bs
2-OH		8	
3	2.62 (2H)	8-OH	
4		9	5.92 bs
5		10	6.19 s
5-OH			

Tab.E2: NMR-Daten von Fonsecin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

3.1.3. Inhaltsstoffe aus *Fusarium semitectum* var. *majus* (ENI-P9)

Der Ethylacetatextrakt dieses mit der Rotalge *Padina* sp. assoziierten Pilzes zeigte sich stark aktiv im antifungalen Test, sowohl gegen *Cladosporium cucumerinum* als auch gegen *Cladosporium herbarum*. Dies könnte auf die von ihm gebildeten Naturstoffe Fusapyron und Desoxyfusapyron zurückgeführt werden, für die auch in der Literatur eine fungizide Wirkung beschrieben wird [Altomare *et al.* 2000]. Gegen die Testorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* konnte für den Extrakt außerdem eine antibiotische Aktivität nachgewiesen werden.

A. Desoxyfusapyron

Die Substanz konnte mittels semipräparativer HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Fusarium semitectum* var. *majus* isoliert werden.

Zur Aufklärung der Struktur wurden neben dem über ESI-MS bestimmten Molekulargewicht von 590 amu und dem UV-Spektrum mit den Maxima bei 207, 238 und 290 nm das ¹H-NMR- sowie das H-H-COSY-Spektrum herangezogen (Tab.E3).

Zunächst konnte anhand der chemischen Verschiebung der Protonen an den Positionen 7, 8, 9 und 11 (3.57 - 4.47 ppm) darauf geschlossen werden, dass die entsprechenden C-Atome jeweils oxygeniert vorlagen. Aufgrund einer Korrelation zwischen H-11 und H-12 im H-H-COSY-Spektrum sowie der chemischen Verschiebung von H₂-12 konnte eine Hydroxymethyl-Gruppe an Position 11 als Substituent nachgewiesen werden. Die Vielzahl der Protonensignale im aliphatischen Bereich ließ auf das Vorhandensein einer langen Seitenkette schließen, deren einzelne Signale aufgrund von Überlappungen im ¹H-NMR-Spektrum nicht voneinander getrennt werden konnten. Die chemischen Verschiebungen der Protonen an den Positionen 15, 16, 18 und 20 (5.05 - 6.25 ppm), sowie deren Kopplungskonstanten ließen weiterhin vermuten, dass mehrere Doppelbindungssysteme vorliegen mussten. Ebenfalls konnte eindeutig die Präsenz von sieben Methylgruppen festgestellt werden, sowie deren jeweilige Anzahl an benachbarten Protonen aufgrund des Kopplungsmusters. Ihre Position in dieser Seitenkette konnte durch die Korrelationen im H-H-COSY-Spektrum von H₃-35 zu H-23, H₃-34 zu H-20 und H₂-22, H₃-33 zu H-19 sowie H₃-32 zu H-18 festgelegt werden. Die weitere Anordnung dieses Doppelbindungssystems ließ sich aufgrund der Korrelationen von H-15 zu H-14 und H-16 und von H-18 sowie H-20 zu H-19 bestimmen. Anhand dieser Daten ergab sich die komplette Abfolge der Seitenkette

zwischen den Positionen 14 und 25. Eine Substruktursuche in Literatur-Datenbanken ergab, dass es sich bei dieser Verbindung um Desoxyfusapyron handeln musste. Die NMR-Daten stimmen mit in der Literatur beschriebenen Daten überein [Evidente *et al.* 1994].

Es wurde ein Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ gemessen, dieser Befund weicht von den Literaturangaben ab [DNP 2004]. Dies könnte in der geringen Substanzmenge oder einer möglichen Verunreinigung begründet liegen oder es handelt sich hier um ein Isomerengemisch.

Desoxyfusapyron

Systematischer Name: (3*E*,5*E*,8*Z*)-3,4,4'-Trihydroxy-6'-(2-hydroxy-1,1,5,7,9,11-hexamethyl-heptadeca-3,5,8-trienyl)-6-hydroxymethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-[2,3']bipyran-2'-on

Probencode: ENI-P9-P93

Quellorganismus: *Fusarium semitectum* var. *majus* (aus *Padina* sp.)

Substanzmenge: 0.47 mg

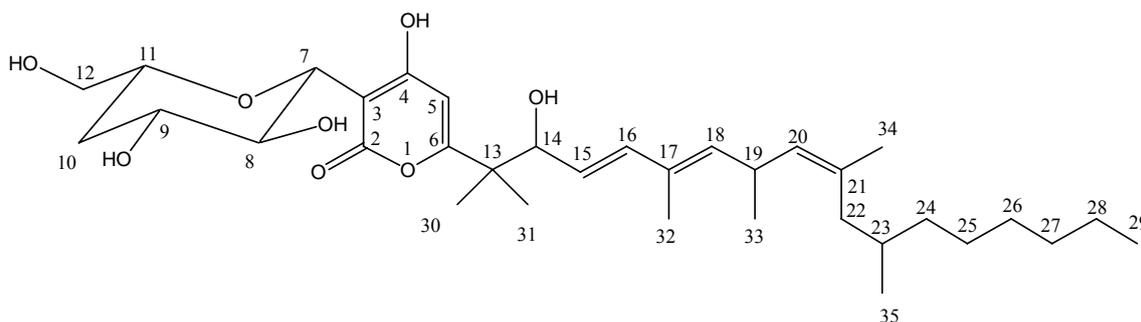
Beschreibung: weißes Pulver

Summenformel: C₃₄H₅₄O₈

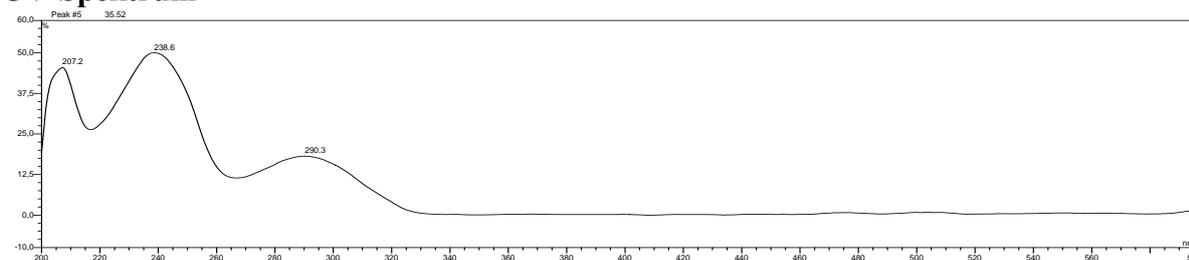
Molekulargewicht: 590 g/mol

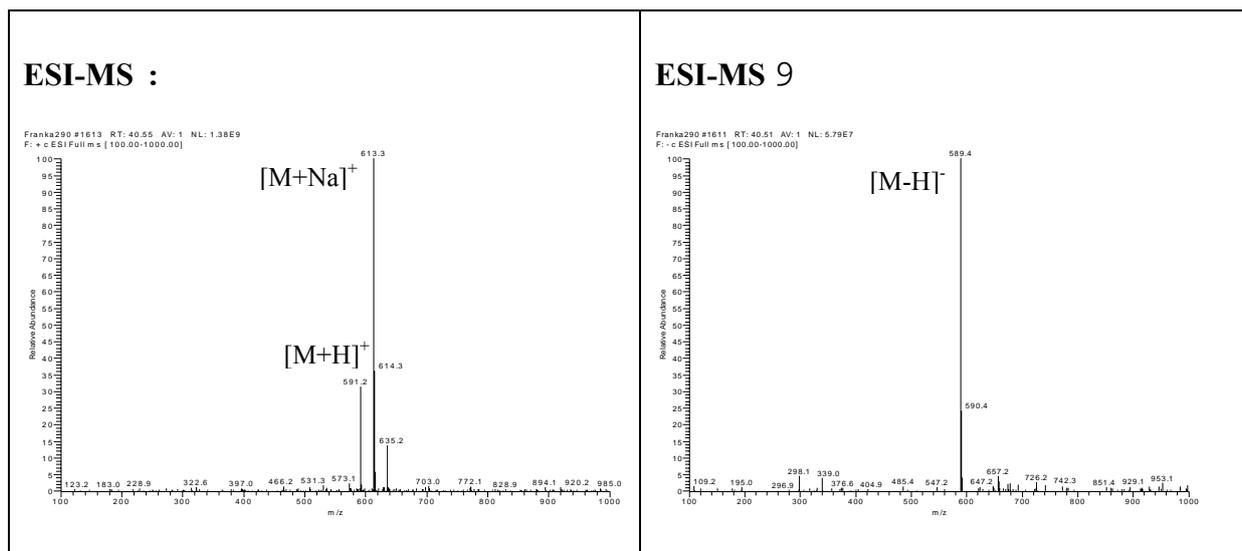
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ (c = 0.35, CHCl₃)

Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 35.6 min



UV-Spektrum





B. Fusapyron

Isoliert wurde diese Substanz ebenso wie Desoxyfusapyron (siehe oben) mittels semipräparativer HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Fusarium semitectum* var. *majus*.

Zur Strukturaufklärung wurde zunächst das UV-Spektrum herangezogen, das mit dem der strukturell verwandten Verbindung übereinstimmte. Das über ESI-MS bestimmte Molekulargewicht von 606 amu wies dagegen eine Massendifferenz von 16 amu zu Desoxyfusapyron auf. Zur weiteren Festlegung der Struktur wurden das $^1\text{H-NMR}$ - sowie das H-H-COSY-Spektrum herangezogen (Tab.E3). Sowohl die ein- wie auch die zweidimensionalen NMR-Spektren von Fusapyron und Desoxyfusapyron zeigten weitgehende Übereinstimmung. Ein Unterschied konnte lediglich in der zusätzlichen Hydroxylierung an Position 33 festgestellt werden, was durch die Korrelation von $\text{H}_2\text{-33}$ (ca. 3.3 ppm, unter dem Lösungsmittelpeak) zu H-19 im H-H-COSY-Spektrum bestätigt wurde (Abb.E3). Im Gegensatz zu Desoxyfusapyron fehlte bei Fusapyron dementsprechend im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Methylgruppe an Position 33. Sämtliche NMR-Daten wurden mit Literaturdaten verglichen und zeigten eine gute Übereinstimmung [Evidente *et al.* 1994].

Auch hier wurde trotz der sich aus der Struktur ergebenden optischen Aktivität experimentell keine optische Drehung festgestellt, wofür die für Desoxyfusapyron angegebenen Gründe maßgeblich sein könnten.

Fusapyron

Systematischer Name: (3*E*,5*E*,8*Z*)-3,4,4'-Trihydroxy-6'-(2-hydroxy-5-hydroxymethyl-1,1,7,9,11-pentamethyl-heptadeca-3,5,8-trienyl)-6-hydroxymethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H [2,3'] bipyranyl-2'-on

Probencode: ENI-P9-P91

Quellorganismus: *Fusarium semitectum* var. *majus* (aus *Padina* sp.)

Substanzmenge: 0.52 mg

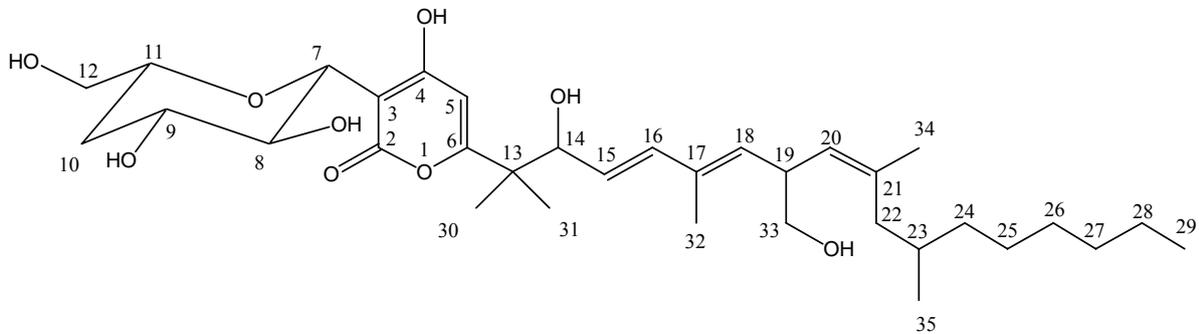
Beschreibung: weißes Pulver

Summenformel: C₃₄H₅₄O₉

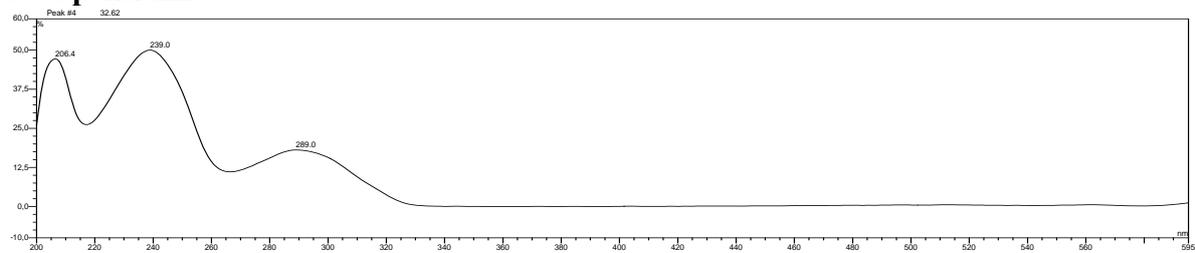
Molekulargewicht: 606 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ (c = 0.48, CHCl₃)

Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 32.6 min



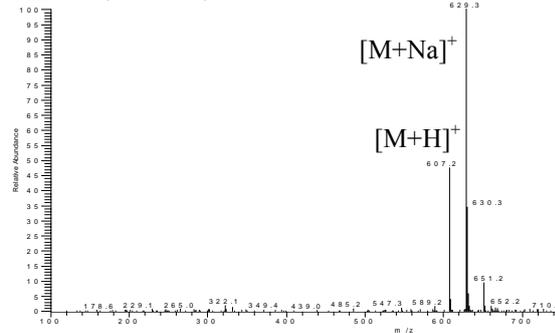
UV-Spektrum



ESI-MS :

Franka288 #1525 RT: 38.28 AV: 1 NL: 2.27E9

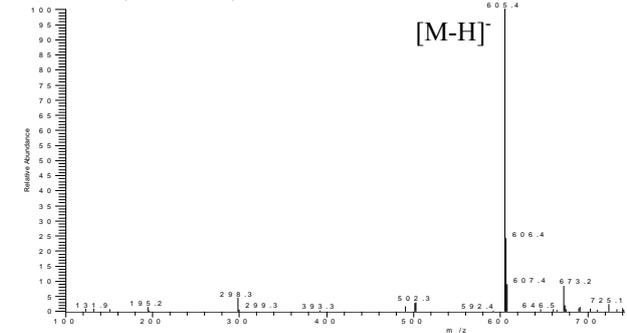
F: + C ESI FullMS (100.00-1000.00)



ESI-MS 9

Franka288 #1523 RT: 38.24 AV: 1 NL: 8.80E7

F: - C ESI FullMS (100.00-1000.00)



Position	Fusapyron		Desoxyfusapyron	
	δ_H (J Hz)	H-H COSY	δ_H (J Hz)	H-H COSY
1				
2				
3				
4				
5	5.80 s		5.80 s	
6				
7	4.47 d (9.5)	8	4.47 d (9.5)	8
8	4.16 t (9.5)	7, 9, 11	4.17 t (9.5)	7, 9, 11
9	3.50-3.55 m ^b	8, 10A	3.57-3.65 m ^c	8, 10A
10	A ~ 1.7 B 1.89 m	9, 10B 9, 10A, 11	~ 1.7 1.89 m	9, 10B 9, 10A, 11
11	3.50-3.55 m ^b	8, 9, 10B, 12	3.57-3.65 m ^c	8, 9, 10B, 12
12	AB 3.50-3.55 m ^b	11	3.57-3.65 m ^c	11
13				
14	4.37 d (6.9)	15	4.36 d (6.9)	15
15	5.58 dd (7.6, 6.9)	14, 16	5.55 dd (7.6, 6.9)	14, 16
16	6.25 d (15.8)	15	6.21 d (15.8)	15
17				
18	5.29 d (9.5)	19, 32	5.28 d (9.5)	19, 32
19	3.45 m	18, 20, 33	3.45 m	18, 20, 33
20	5.05 d (8.8)	19, 34	5.05 d (8.8)	19, 34
21				
22	AB 1.90-1.93 m	23	1.95 dd (6.3, 8.2)	23
23	1.60 m	22, 35	1.60 m	22, 35
24	1.25-1.40 m ^d		1.25-1.40 m ^d	
25	„ ^d		„ ^d	
26	„ ^d		„ ^d	
27	„ ^d		„ ^d	
28	1.25-1.40 m ^d	29	1.25-1.40 m ^d	29
29	0.88 t (6.9)	28	0.89 t (6.9)	28
30	1.19 s ^a		1.19 s ^a	
31	1.11 s ^a		1.10 s ^a	
32	1.77 s	18	1.73 s	18
33	ca. 3.3	19	0.97 d (6.9)	19
34	1.67 s	20, 22	1.63 s	20, 22
35	0.86 d (6.3)	23	0.84 d (6.3)	23

^a Signale austauschbar

^{b,c,d,e} Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

Tab.E3: NMR Daten von Fusapyron (**1**) und Desoxyfusapyron (**2**), gemessen in CD₃OD (500 MHz)

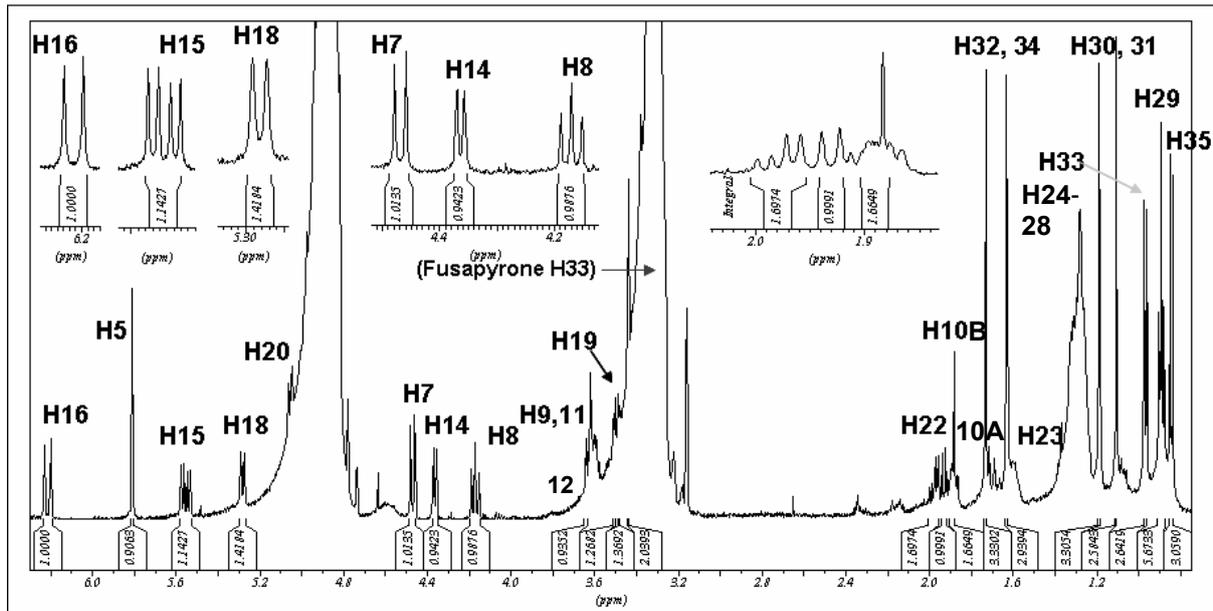


Abb.E1: ^1H -NMR-Spektrum von Desoxyfusapyron, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

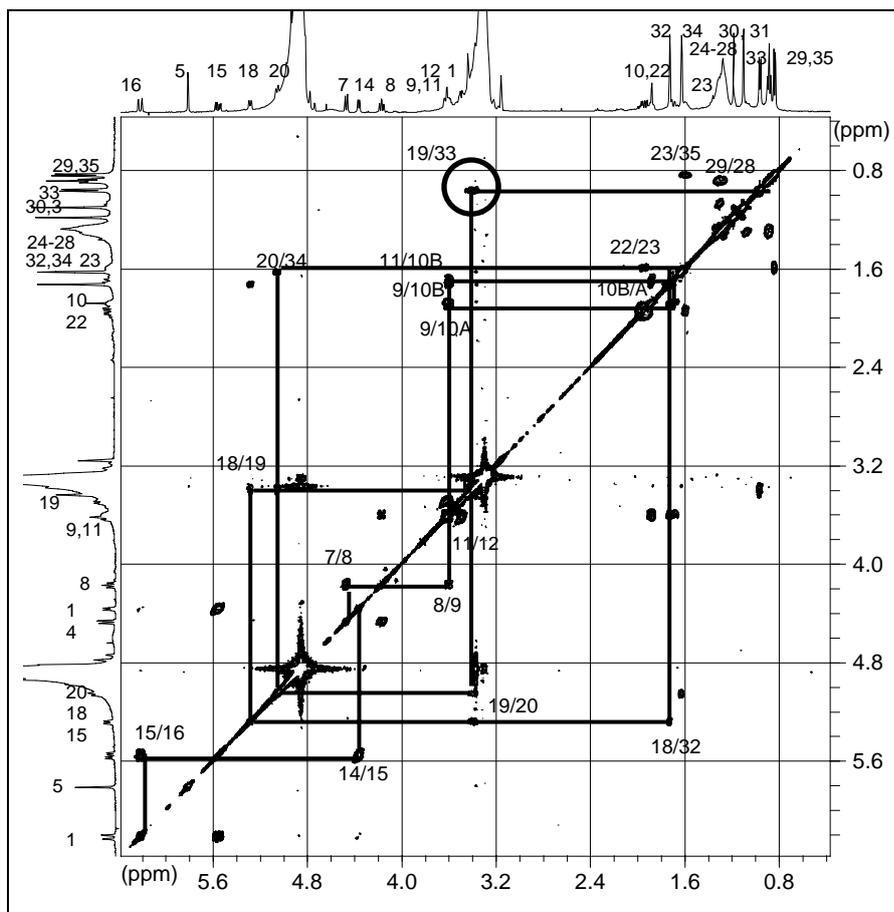


Abb.E2:

H-H-COSY-Spektrum von Desoxyfusapyron, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

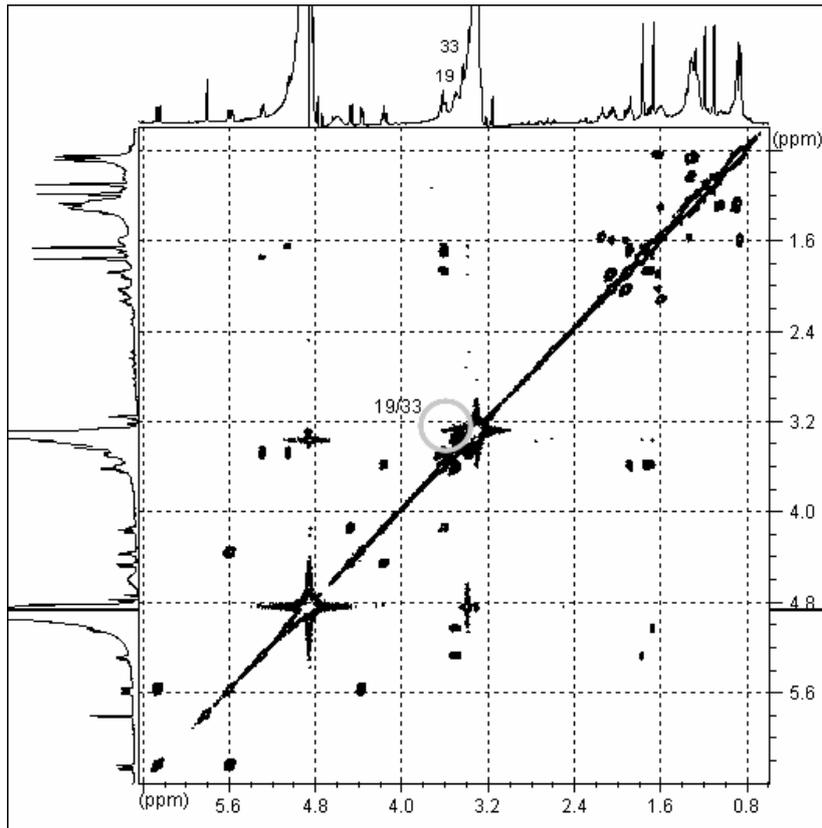


Abb.E3:

H-H-COSY-Spektrum von Fusapyron, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

3.1.4. Inhaltsstoffe aus *Aspergillus terreus* (ENI-P5)

Dieser *Aspergillus terreus*-Stamm wurde als Endophyt aus der Braunalge *Padina gymnospora* isoliert. Der Ethylacetat-Extrakt dieses Pilzes zeigte eine antibiotische Aktivität gegenüber dem Testorganismus *Escherichia coli*, sowie eine schwache toxische Aktivität im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml. Dies könnte auf die im Inhaltsstoffspektrum dominierende Substanz Dihydrogeodin zurückzuführen sein, für die im Test mit der Reinsubstanz ebenfalls eine antibiotische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Antibiotische und antifungale Aktivität werden ebenfalls in der Literatur beschrieben [Inamori *et al.* 1983].

A. Dihydrogeodin

Der Ethylacetatextrakt dieses *Aspergillus terreus*-Stammes wies im HPLC-Chromatogramm nur einen dominierenden Peak auf, dessen UV-Spektrum zwei Maxima bei 220 und 282 nm zeigte. Die Strukturaufklärung dieser Substanz konnte somit direkt ohne weitere vorherige Auftrennung erfolgen. Das Molekulargewicht von 401 amu wurde mithilfe des LC-Massenspektrums bestimmt, das darüber hinaus aufgrund des charakteristischen Ionenclusters auch Aufschluss über das Vorhandensein von zwei Chlorsubstituenten gab. Die Struktur dieses Chlorbenzophenons konnte dann schließlich mithilfe von ^1H - und ^{13}C -NMR sowie des HMBC-Spektrums (Tab.E4) festgelegt werden.

Dem ^1H -NMR-Spektrum ließ sich zunächst entnehmen, dass sich zwei *meta*-koppelnde aromatische Protonen (Kopplungskonstante 2.2 Hz) in dem Molekül befinden mussten (H-3' und H-5'). Weiterhin konnte das Vorhandensein von einer CH_3 -Gruppe und zwei Methoxygruppen detektiert werden. Das ^{13}C -NMR-Spektrum gab Aufschluss darüber, dass insgesamt vier phenolische Substituenten (an C-1, 5, 4' und 6') vorliegen mussten. Ferner waren zwei Carbonylfunktionen zu beobachten, von denen die eine (166.7 ppm) einer Ester- und die andere (201.1 ppm) einer Ketofunktion zuzuordnen war. Mithilfe des HMBC-Spektrums konnten die Methoxygruppe an Position 6', die Hydroxygruppe an Position 4' und die Esterfunktion an Position 2' des Rings A platziert werden. So zeigte 7'- OCH_3 ebenso wie H-3' eine Korrelation zu der benachbarten Carbonylfunktion C-7'. H-3' korrelierte weiterhin zu C-1' und H-5' und ferner sowohl zu C-1' als auch zu C-6'. Für 6'- OCH_3 ließ sich eine Korrelation zu C-6' beobachten. Ring B musste eine symmetrische Konstellation aufweisen, da nur vier Signale im ^{13}C -Spektrum detektiert werden konnten. So erschienen C-1 und C-5 bei der gleichen chemischen Verschiebung ebenso wie C-2 und C-4. C-1/5 (155.6 ppm) konnten Hydroxylgruppen als Substituenten zugeordnet werden, C-2/4 (112.6 ppm) folglich die im Massenspektrum detektierten Chloratome. Die Position von H₃-3 konnte aufgrund von Korrelationen zu C-3 und C2/4 im HMBC-Spektrum festgelegt werden. Der Vergleich mit dem ermittelten Molekulargewicht belegte, dass Ring A und Ring B über die Ketofunktion (C-7, 201.1 ppm) miteinander verbunden waren.

Die NMR-Daten wurden mit Literaturdaten verglichen und zeigten gute Übereinstimmung [Inamori *et al.* 1983]. Für Dihydrogeodin konnte eine antibiotische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 5 mg/ml im Test nachgewiesen werden. Neben einer antibiotischen Wirkung wurde in der Literatur auch eine fungizide Wirkung beschrieben [Inamori *et al.* 1983].

Dihydrogeodin

Systematischer Name: 2-(3,5-Dichlor-2,6-dihydroxy-4-methyl-benzoyl)-5-hydroxy-3-methoxy-benzoesäure-methylester

Probencode: ENI-P5-RE

Quellorganismus: *Aspergillus terreus* (aus *Padina gymnospora*)

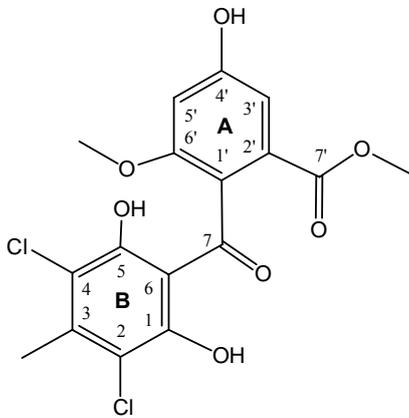
Substanzmenge: 87.5 mg

Beschreibung: braun, kristallin

Summenformel: C₁₇H₁₄Cl₂O₇

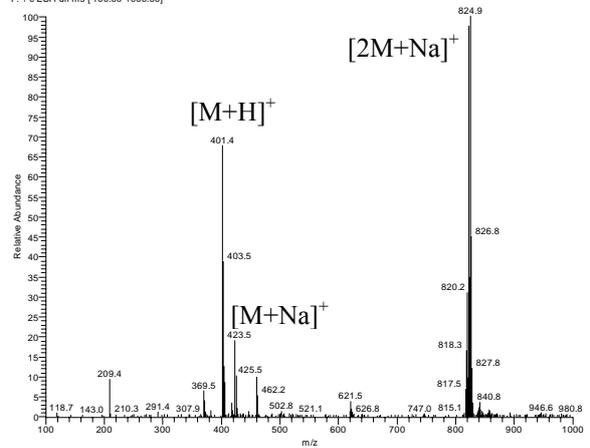
Molekulargewicht: 401 g/mol

Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 26.6 min

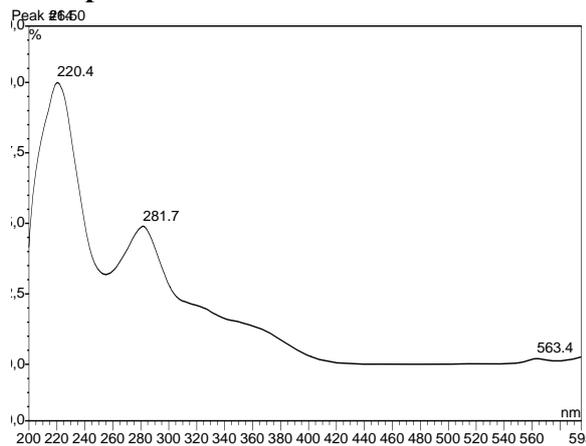


ESI-MS :

Franka212 #1433 RT: 32.43 AV: 1 NL: 5.73E7
F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

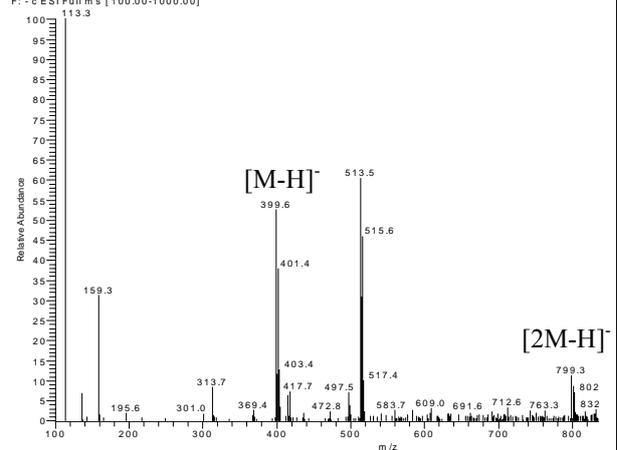


UV-Spektrum



ESI-MS 9

Franka212 #1427 RT: 32.27 AV: 1 NL: 6.69E6
F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Position	δ_H (J Hz)	δ_C	HMBC
1/5		155.6	
2/4		112.6	
3		142.0	
3-CH ₃	2.48 s	17.9	2/4, 3
6		104.6	
7		201.1	
1'		126.4	
2'		128.7	
3'	6.98 d (2.2)	107.8	1', 5', 7'
4'		159.0	
5'	6.68 d (2.2)	103.2	1', 3', 6'
6'		157.5	
6'-OCH ₃	3.70 s	51.9	6'
7'		166.7	
7'-OCH ₃	3.69 s	55.6	7'

Tab.E4: NMR-Daten von Dihydrogeodin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

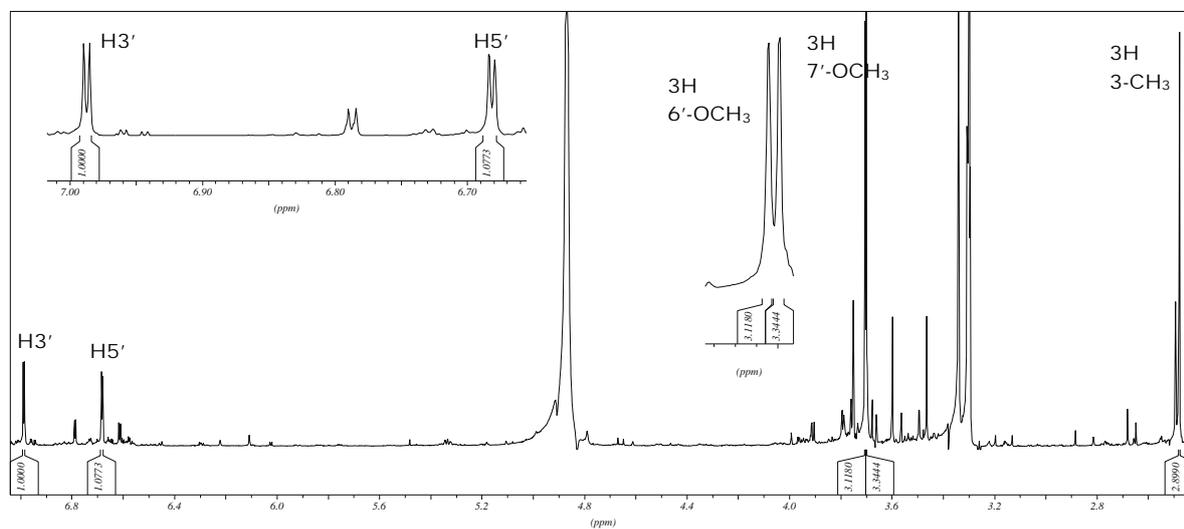


Abb.E4: ¹H-NMR-Spektrum von Dihydrogeodin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

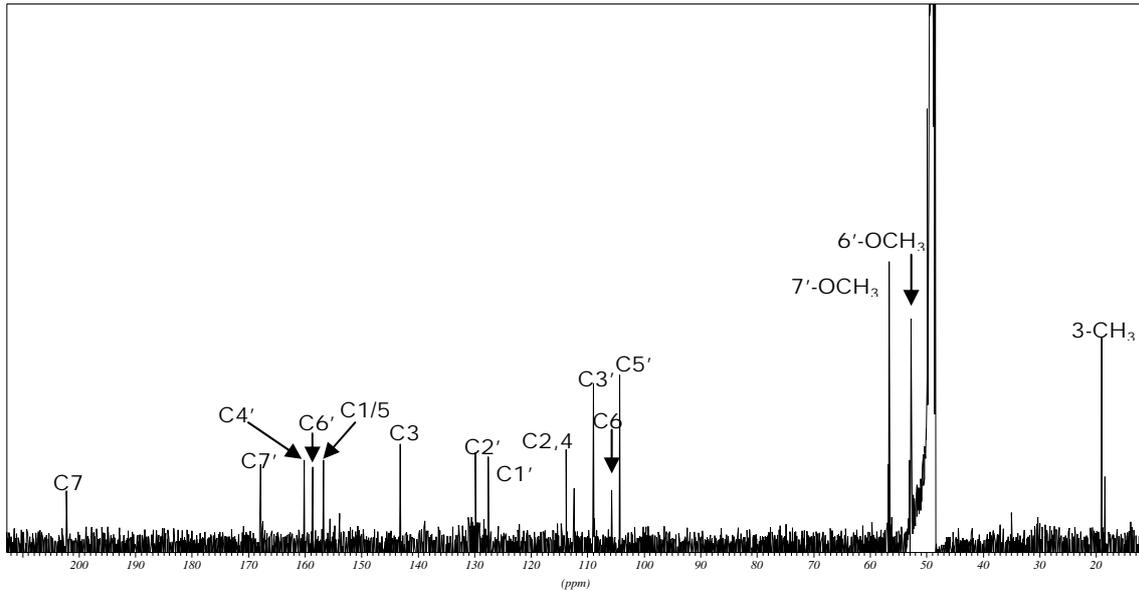


Abb.E5: ^{13}C -NMR-Spektrum von Dihydrogeodin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

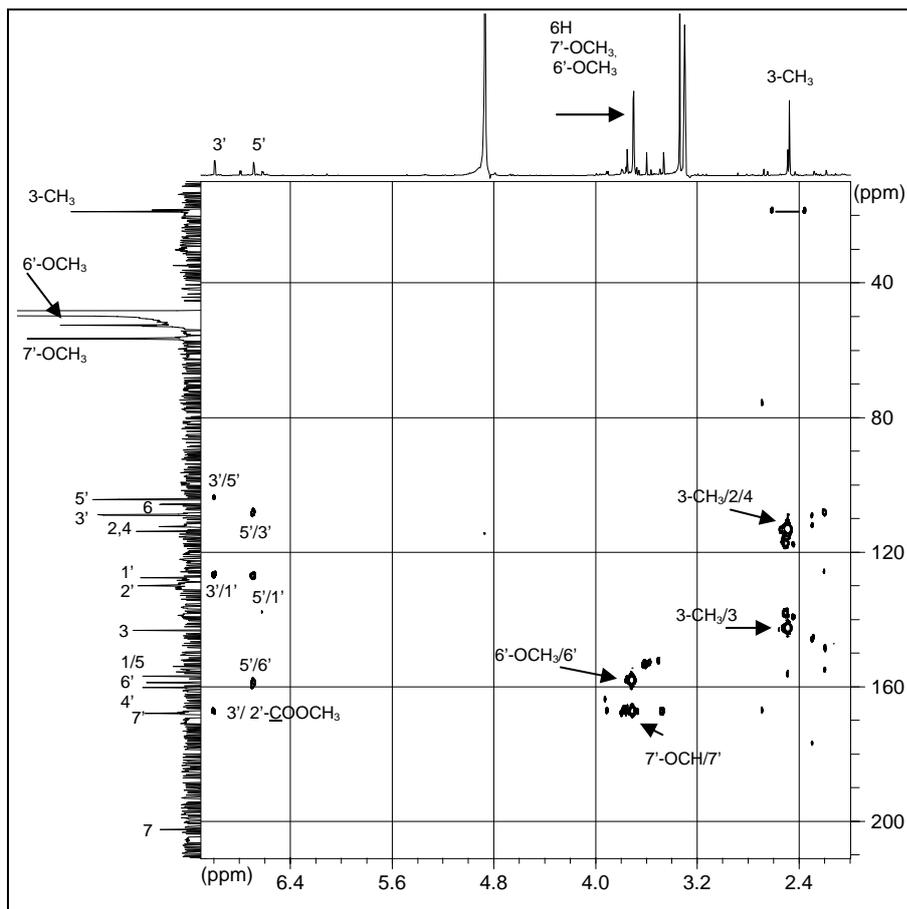


Abb.E6:

HMBC-Spektrum von Dihydrogeodin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

3.1.5. Inhaltsstoffe aus ENI-P4

Der vorliegende Pilz wurde aus einer marinen Alge der Gattung *Padina* isoliert. Die Identität dieses Pilzes konnte anhand der morphologischen Merkmale vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Utrecht nicht bestimmt werden. Im antibiotischen Biotest zeigte der Ethylacetatextrakt des Pilzes eine moderate Aktivität gegenüber *Escherichia coli*. Als ein wichtiger Inhaltsstoff konnte die (+)-Abscisinsäure nachgewiesen werden.

A. (+)-Abscisinsäure

Abscisinsäure stellt ein zu den pflanzlichen Wachstumshormonen antagonistisch wirkendes monocyclisches Sesquiterpen dar, das in höheren Pflanzen, marinen Algen, aber auch in Pilzen weit verbreitet ist.

Aus dem Ethylacetatextrakt des vorliegenden Pilzstammes konnte die Substanz mittels semipräparativer HPLC isoliert werden. Die Struktur wurde neben der Bestimmung des Molekulargewichtes von 264 amu mittels ESI-MS durch Analyse des ¹H-NMR-Spektrums aufgeklärt. Im +-ESI-MS lässt sich neben dem Pseudomolekülionenpeak das Fragment *m/z* 247 erkennen, das den Verlust der Hydroxylgruppe anzeigt. Einen weiteren Hinweis auf die Identität der Substanz konnte eine Übereinstimmung von UV-Spektrum und Retentionszeit des HPLC-Chromatogrammes mit der von R. Jadulco im Rahmen ihrer Dissertation aus dem schwammassoziierten Pilz *Curvularia lunata* isolierten (+)-Abscisinsäure geben, die unter identischen Bedingungen gemessen worden waren [Jadulco 2002].

Das ¹H-NMR-Spektrum der Substanz zeigte zunächst das Vorhandensein von 4 Methylgruppen, 4 weitere Protonen konnten bei einer chemischen Verschiebung von 5.81 - 7.58 ppm detektiert werden (Tab.E5). Neben dieser chemischen Verschiebung ließ die Kopplungskonstante von H-4 und H-5 (16.4 Hz) auf das Vorhandensein einer Doppelbindung mit *trans*-Konfiguration schließen. H-2 und H-3' erschienen als Singulett, die chemische Verschiebung ins Tieffeld belegte, dass diese Protonen ebenfalls an Doppelbindungen positioniert waren. H-5'α und H-5'β konnten im aliphatischen Bereich (2.14-2.53 ppm) detektiert werden. Die ¹H-NMR-Daten stimmten mit den Literaturwerten überein [Constantino *et al.* 1986].

Die absolute Stereochemie an dem chiralen Zentrum an Position 1' konnte durch Übereinstimmung des gemessenen Drehwertes von $[\alpha]_D^{20}$: + 138° mit den Daten von (+)-Abscisinsäure als *S* festgelegt werden [Assante *et al.* 1977].

(+)-Abscisinsäure

Systematischer Name: (*S*)-5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-cyclohex-2-enyl)-3-methyl-penta-2,4-diensäure

Probencode: ENI-P4-PD

Quellorganismus: nicht identifizierbarer Pilzstamm (aus *Padina sp.*)

Substanzmenge: 1.3 mg

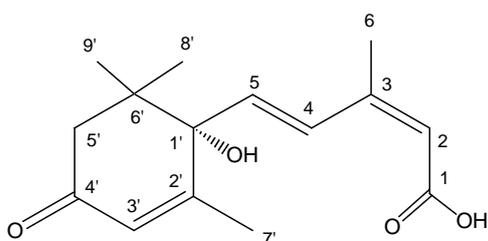
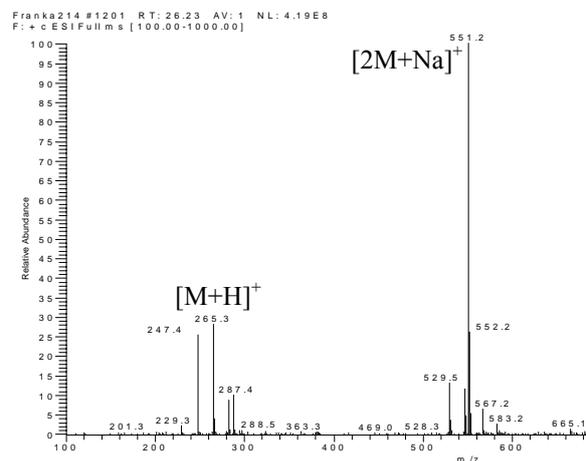
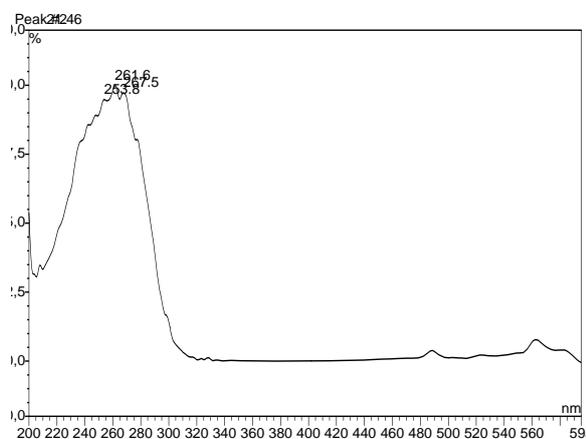
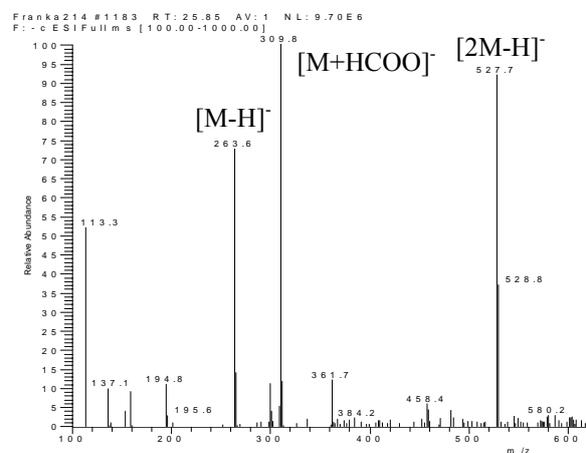
Beschreibung: weißes-rosafarbenes Pulver

Summenformel: C₁₅H₂₀O₄

Molekulargewicht: 264 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: + 138° (c = 0.47, EtOH)

Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 21.4 min

**ESI-MS :****UV-Spektrum****ESI-MS 9**

Position	δ_H (J Hz)	Position	δ_H (J Hz)
1		3'	5.81 s
2	5.88 s	4'	
3		5' α	2.53 d (16.4)
4	5.97 d (16.4)	5' β	2.14 d (16.4)
5	7.58 d (16.4)	6'	
6	1.91 s	7'	1.91 s
1'		8'	1.04 s ^a
2'		9'	1.01 s ^a

^a Signale austauschbar

Tab.E5: NMR-Daten von (+)-Abscisinsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

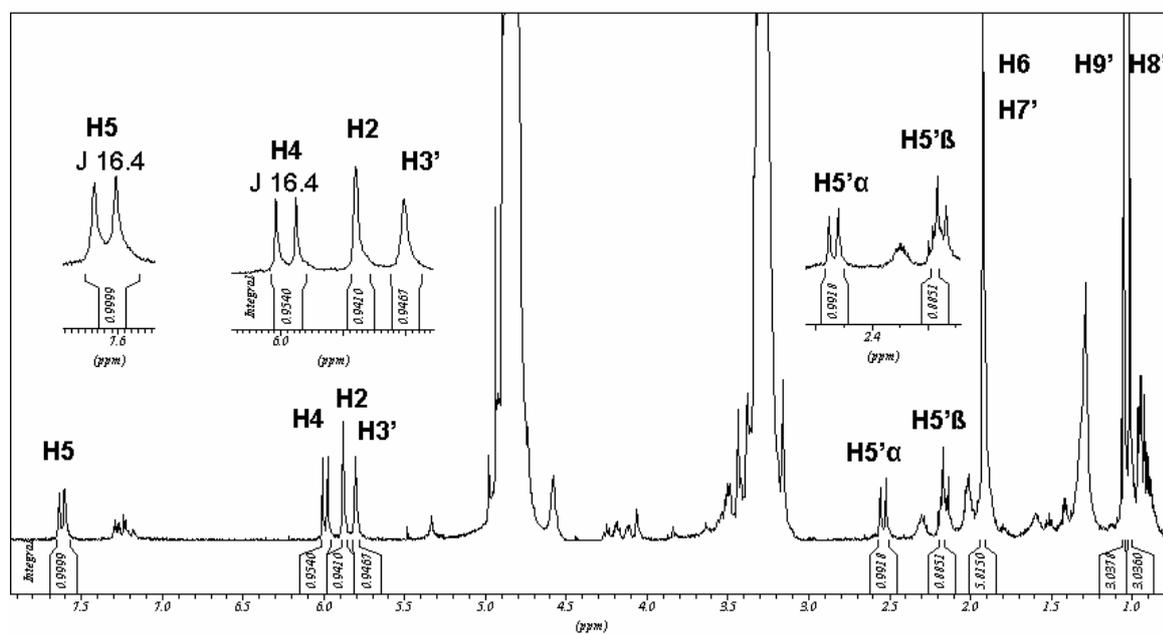


Abb.E7: ¹H-NMR-Spektrum von (+)-Abscisinsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

3.1.6. Inhaltsstoffe aus *Eurotium amstellodami* (syn. *Aspergillus hollandicus*; ENI-C1)

Dieser Pilzstamm gehört zu der Gattung *Aspergillus* und wurde im Rahmen dieser Arbeit aus der Grünalge *Caulerpa peltata* isoliert. Als Hauptinhaltsstoff von *Eurotium amstellodami* konnte das bekannte Mykotoxin Paxillin nachgewiesen werden.

A. Paxillin

Da Paxillin als Hauptinhaltsstoff den Ethylacetatextrakt von *Eurotium amstellodami* dominierte, wie deutlich im HPLC-Chromatogramm zu erkennen war, konnte der Extrakt ohne weitere Fraktionierung direkt über NMR vermessen werden.

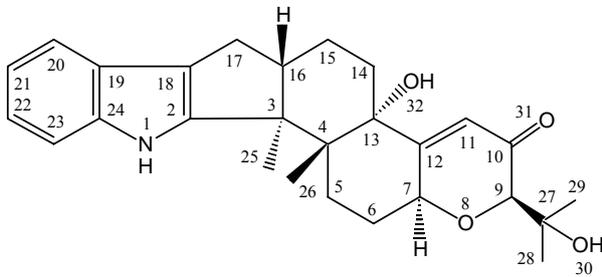
Die Struktur des Alkaloids wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ und H-H-COSY festgelegt. Das UV-Spektrum der Substanz wies zwei Maxima bei 231 und 281 nm auf. Mithilfe des Pseudomolekülonenpeaks im ESI-MS konnte das Molekulargewicht von 435 amu bestimmt werden. Im +-ESI-MS ließ sich zusätzlich ein charakteristisches Fragmentation bei 418 amu erkennen, das den Verlust eines Wassermoleküls anzeigte, sowie ein weiteres bei 130 amu, welches aus dem Indol-Grundkörper resultierte. Diese Daten werden auch in der Literatur als charakteristisch beschrieben [Mantle *et al.* 1994]

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten vier Methylgruppen detektiert werden, die jeweils als Singulett erschienen (Tab.E6). Bei einer chemischen Verschiebung von 1.6 - 2.9 ppm ließ das Vorhandensein von 11 Protonen sowie deren komplexe Korrelationen im H-H-COSY-Spektrum, die sich aufgrund von Signalüberlappungen nicht eindeutig zuordnen ließen, auf mehrere aliphatische Ringsysteme schließen. Die Korrelation zwischen H-9 und H-11 im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Kopplungskonstante 1.9 Hz) zeigte eine W-Kopplung an, wobei H-9 aufgrund eines benachbarten Heteroatoms ins tiefe Feld verschoben war, ebenso wie H-11 als Teil einer Doppelbindung. Im aromatischen Bereich von 6.90 - 7.30 ppm fanden sich die Protonen H-20 - H-23, wobei jeweils die Signale von H-20 und H-23 sowie H-21 und H-22 überlappten. Ihre Zugehörigkeit zu einem ABCD-Spinsystem ließ sich aus dem H-H-COSY-Spektrum aufgrund der Korrelationen zwischen H-20 und H-22 und H-21 zu H-23 ableiten. Sämtliche NMR-Daten zeigten gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten [Mantle *et al.* 1994].

Für die optische Drehung wurde ein Wert von $[\alpha]_{\text{D}}^{20}: \pm 0^\circ$ gemessen. Da in der Literatur keine optische Drehung berichtet wurde, ließen die erhaltenen NMR-Daten lediglich den Schluss zu, dass es sich bei der hier vorliegenden Verbindung entweder um Paxillin oder sein Enantiomer bzw. ein Gemisch von beiden handeln musste.

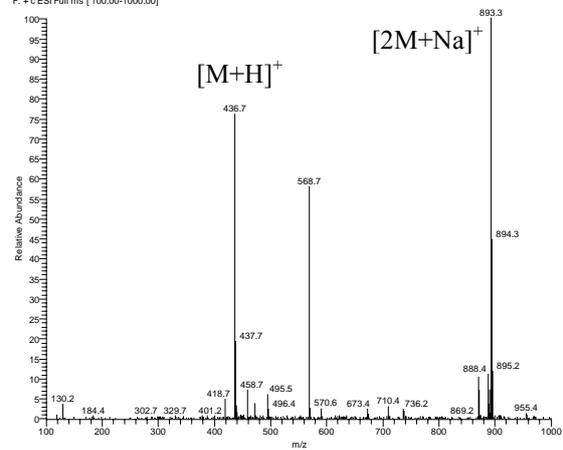
Paxillin

Probencode: ENI-C1-RE
Quellorganismus: *Eurotium amstellodami* (aus *Caulerpa peltata*)
Substanzmenge: 33.5 mg
Beschreibung: gelblich-braun, viskos
Summenformel: C₂₇H₃₃NO₄
Molekulargewicht: 435 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ (c = 0.1, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 31.9 min

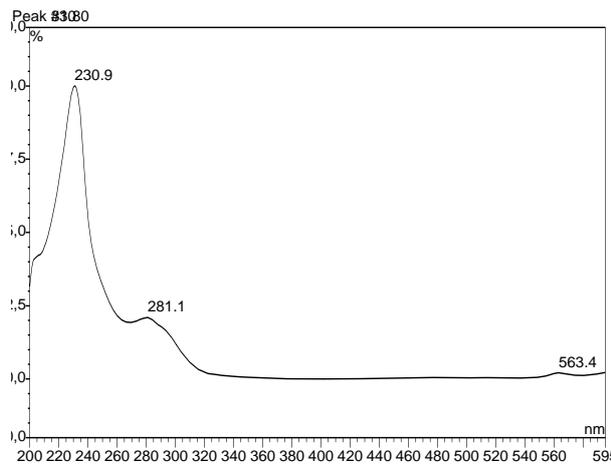


ESI-MS :

Franka223 #1669 RT: 37.10 Av: 1 NL: 4.69E7
F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]

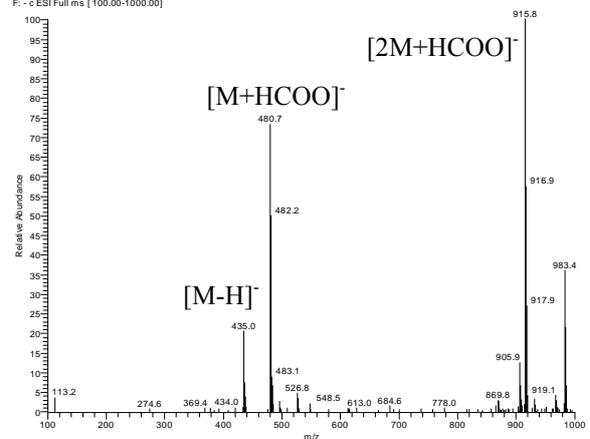


UV-Spektrum



ESI-MS 9

Franka223 #1691 RT: 37.67 Av: 1 NL: 2.17E7
F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Position	δ_H (J Hz)	H-H COSY	Position	δ_H (J Hz)	H-H COSY
1			17	AB 1.60-2.90 m ^c	
2			18		
3			19		
4			20	7.20-7.30 m ^e	22
5	AB 1.60-2.90 m ^c		21	6.90-6.96 m ^d	23
6	AB 1.60-2.90 m ^c		22	6.90-6.96 m ^d	20
7	~ 4.85 ^b		23	7.20-7.30 m ^e	21
8			24		
9	3.74 d (1.9)		25	1.32 s (3H)	
10			26	0.90 s	
11	5.84 d (1.9)		27		
12			28	1.26 s (3H) ^a	
13			29	1.28 s (3H) ^a	
14	AB 1.60-2.90 m ^c		30		
15	AB 1.60-2.90 m ^c		31		
16	1.60-2.90 m ^c		32		

^a Signale austauschbar

^b Signal von Lösungsmittelpeak überlagert

^{c,d,e} Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

Tab.E6: NMR-Daten von Paxillin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

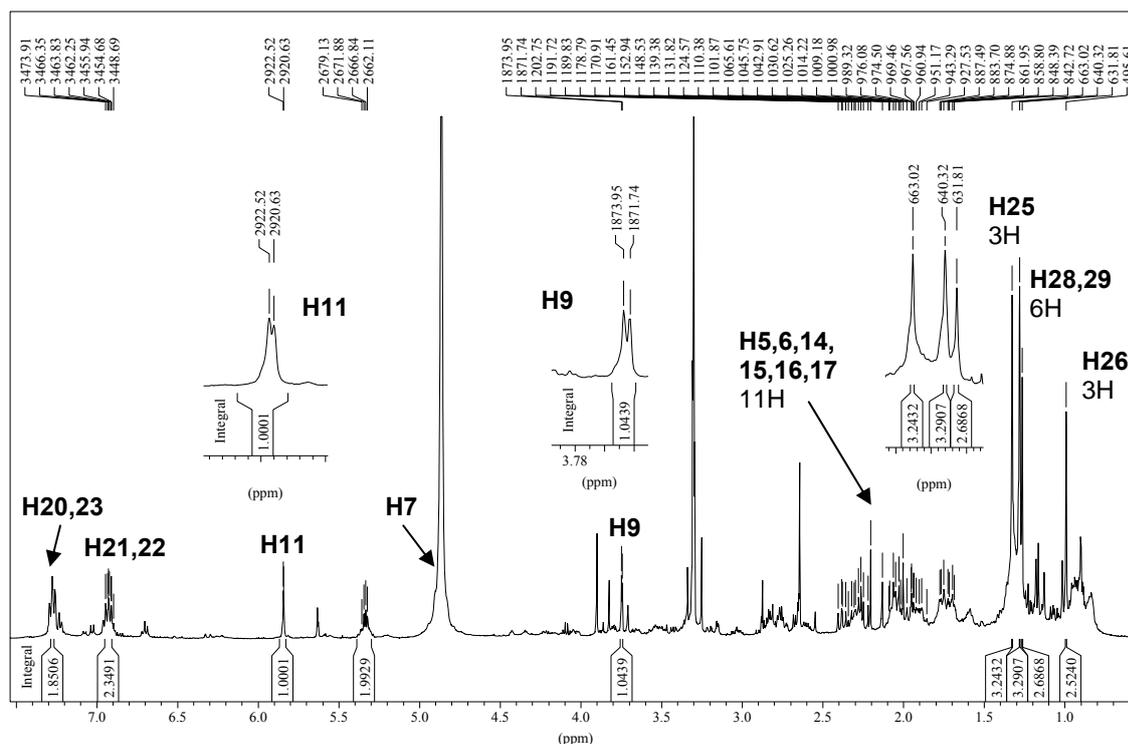


Abb.E8: ¹H-NMR-Spektrum von Paxillin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

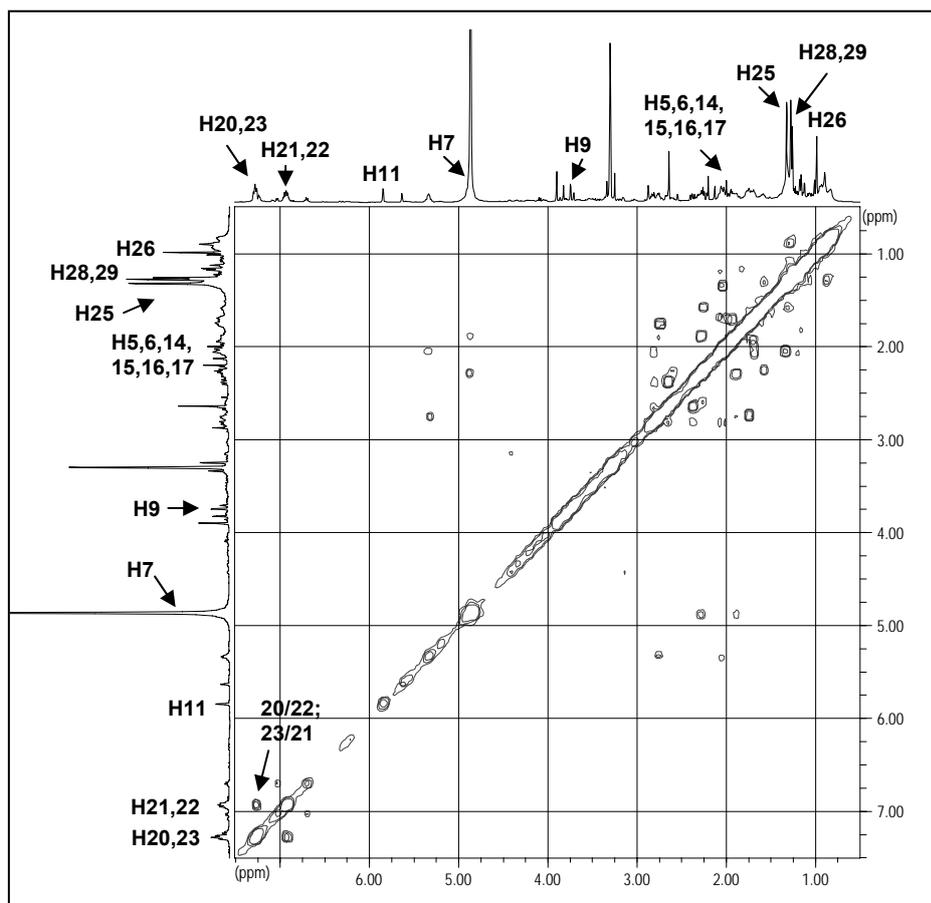


Abb.E9:

H-H-COSY von Paxillin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

3.1.7. Inhaltsstoffe aus *Aspergillus sydowii* (ENI-A1)

Dieser *Aspergillus sydowii*-Stamm wurde aus der tropischen Rotalge *Acanthophora spicifera* isoliert. Der Ethylacetatextrakt von *Aspergillus sydowii* wies eine antibakterielle Aktivität gegen die Testkeime *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* auf. In diesem Extrakt konnten neben Hydroxysydonsäure zwei neue Naturstoffe, die Cyclopentanoide S15 und S16, nachgewiesen werden. Die Isolierung dieser Sekundärmetabolite erfolgte vornehmlich aus dem mit Ethylacetat extrahierten Medium mithilfe der Sephadex-Säulenchromatographie. Jedoch konnte S16 auch in dem mit Methanol extrahierten Myzelium, nach anschließender Auftrennung des Extraktes über „Vacuum-Liquid-Chromatographie“ und nachfolgende Kieselgel-Säulenchromatographie, nachgewiesen werden (Abb.E10). Die Naturstoffe Sydonsäure und Sydowsäure wurden ebenfalls von diesem *Aspergillus sydowii*-Stamm gebildet und konnten im Rahmen des Salinitätsexperimentes (3.5.2.B) mittels präparativer HPLC isoliert werden.

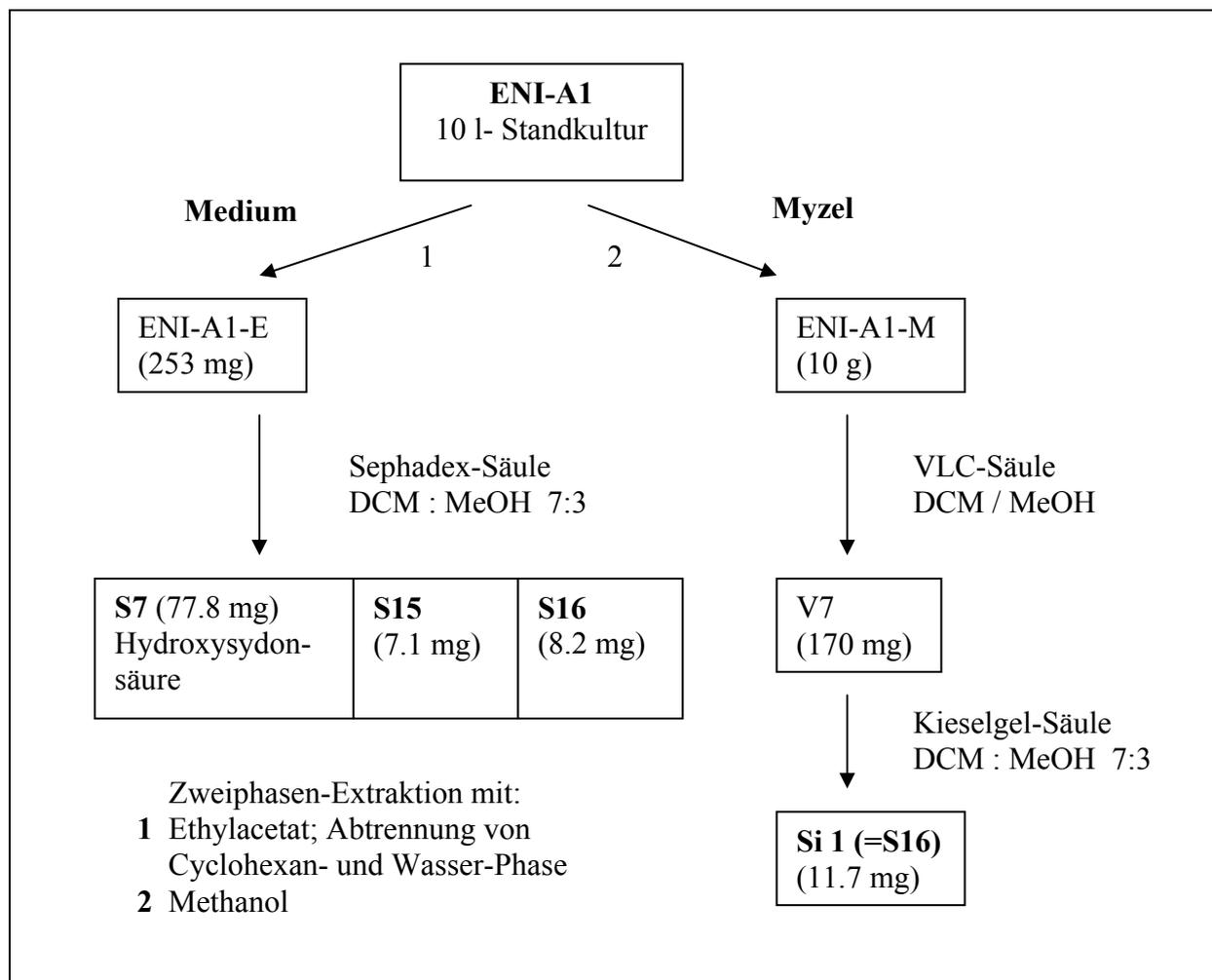


Abb.E10: Trennschema für den Rohextrakt von *Aspergillus sydowii* zur Isolierung von S15, S16 sowie Hydroxysydonsäure

A. Hydroxysydonsäure

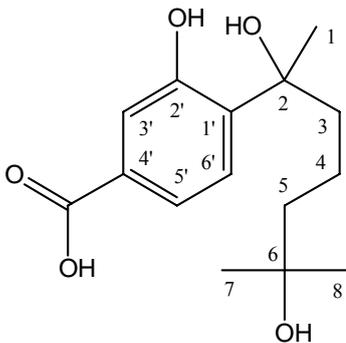
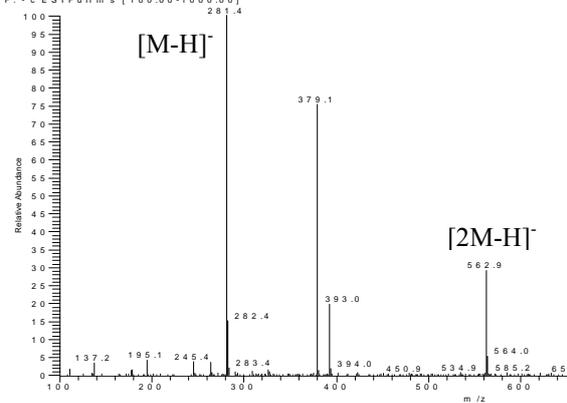
Hydroxysydonsäure wurde durch Fraktionierung des Ethylacetatextraktes des Kulturmediums von *Aspergillus sydowii* mithilfe der Sephadex-Säulenchromatographie isoliert (Isolierschema siehe Abb.E10).

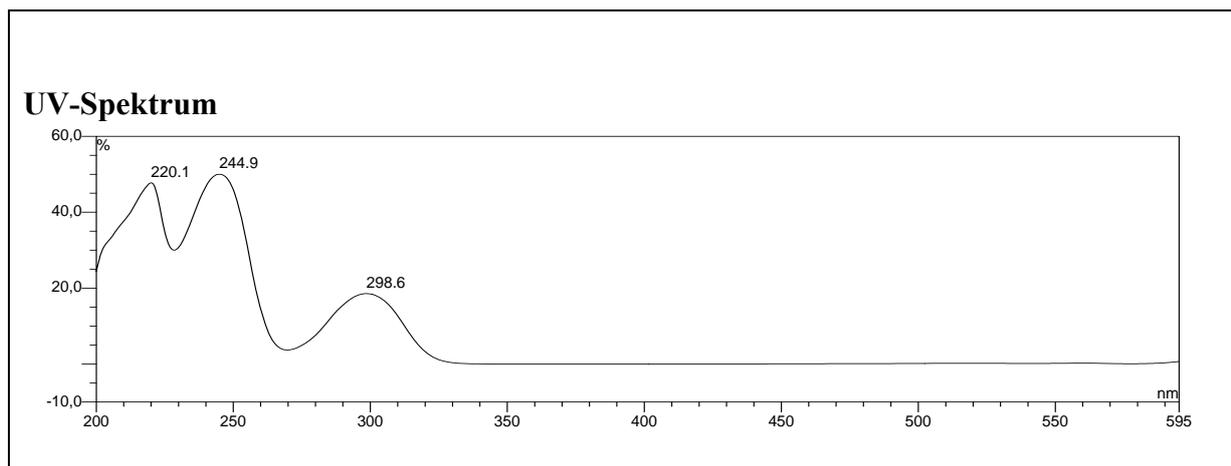
Die Struktur dieses aromatischen Sesquiterpens konnte neben der Bestimmung des Molekulargewichtes von 282 amu mittels ESI-MS anhand der $^1\text{H-NMR}$ - und H-H-COSY-Spektren aufgeklärt werden. Einen weiteren Hinweis auf die Struktur des Moleküls konnte das UV-Spektrum mit Maxima bei 220, 245 und 299 nm geben.

Dem ^1H -Spektrum konnte entnommen werden, dass aufgrund der chemischen Verschiebung für H-3', H-5' und H6' von 7.27 - 7.44 ppm sowie der charakteristischen Kopplungskonstanten (1.9 Hz und 8.2 Hz) ein 1,2,4-trisubstituiertes aromatisches Spinsystem vorliegen musste (Tab.E7). Weiterhin gab das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Aufschluss über das

Vorhandensein von drei Methylgruppen, die jeweils als Singulett erschienen und sich deshalb an quartären C-Atomen befinden mussten. (H₃-1, H₃-7 und H₃-8). Die Zuordnung von C-1, sowie C-7 und C-8 ergab sich aus den Direktkorrelationen im HMBC-Spektrum. Die chemische Verschiebung des Signals bei 167.7 ppm (4'-COOH), die ebenfalls dem HMBC-Spektrum entnommen wurde, ließ darauf schließen, dass es sich um eine Carboxylfunktion handeln musste. Ihre Position im Ring konnte durch die Korrelationen von H-3' und H-5' festgelegt werden. Die Korrelationen von H-6' zu C-2 sowie von H₃-1 zu C-1' ließen die Position der Verknüpfung des Ringes mit der Seitenkette erkennen. H₃-1 zeigte ferner Korrelationen zu C-3 und C-2, wovon letzteres aufgrund seiner chemischen Verschiebung ein Sauerstoffatom als Substituent tragen musste. H₂-5 korrelierte mit H-4, H₃-7 und H₃-8, womit das Spinsystem schließlich vollständig geschlossen werden konnte.

Die NMR-Daten stimmten mit den Literaturwerten [Hamasaki *et al.* 1978] überein. Ebenso ergab sich in Übereinstimmung mit dem Literaturwert eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ [Hamasaki *et al.* 1978], was bedeuten könnte, dass die Verbindung als Racemat vorliegt.

Hydroxysydonsäure	
Systematischer Name:	4-(1,5-Dihydroxy-1,5-dimethyl-hexyl)-3-hydroxy-benzoesäure
Probencode:	ENI-A1-E-S7
Quellorganismus:	<i>Aspergillus sydowii</i> (aus <i>Acanthophora spicifera</i>)
Substanzmenge:	77.8 mg
Beschreibung:	braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
Molekulargewicht:	282 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	$\pm 0^\circ$ (c = 1, EtOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	21.8 min
	ESI-MS 9 <small>Franka394 #1155 RT: 24.61 AV: 1 NL: 1.33E6 F1: c ESIFull.ms [100.00-1000.00]</small> 



Position	δ_{H} (J Hz)	δ_{C} ^a	HMBC
1	1.60 s (3H)	26.6 q	2, 3, 1'
2		75.4 s	
3	A 1.95 m B 1.80 m	41.3 t .	
4	AB 1.22-1.28 m	17.5 t	
5	AB 1.37-1.40 m	42.4 t	4, 7, 8
6		68.9 s	
7	1.10 s (3H) ^b	26.6 q	5, 6, 8
8	1.09 s (3H) ^b	26.6 q	5, 6, 7
1'		135.5 s	
2'		154.8 s	
3'	7.36 d (1.9)	115.8 d	1', 2', 5', 4'-COOH
4'		129.1 s	
4'-COOH		167.7 s	
5'	7.44 dd (1.9, 8.2)	118.8 d	1', 3', 6', 4'-COOH
6'	7.27 d (8.2)	125.7 d	2, 2', 4', 5'

^a Werte dem HMBC-Spektrum entnommen

^b Signale austauschbar

Tab.E7: NMR-Daten von Hydroxysydonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

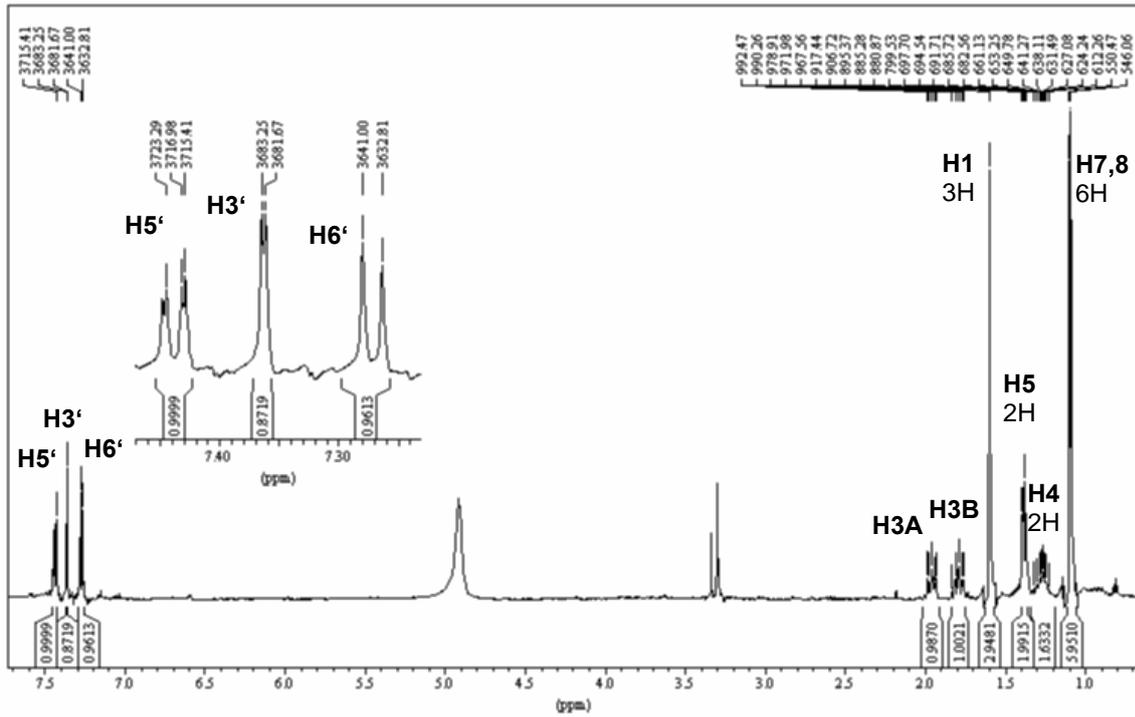


Abb.E11: ^1H -NMR-Spektrum von Hydroxysydonsäure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

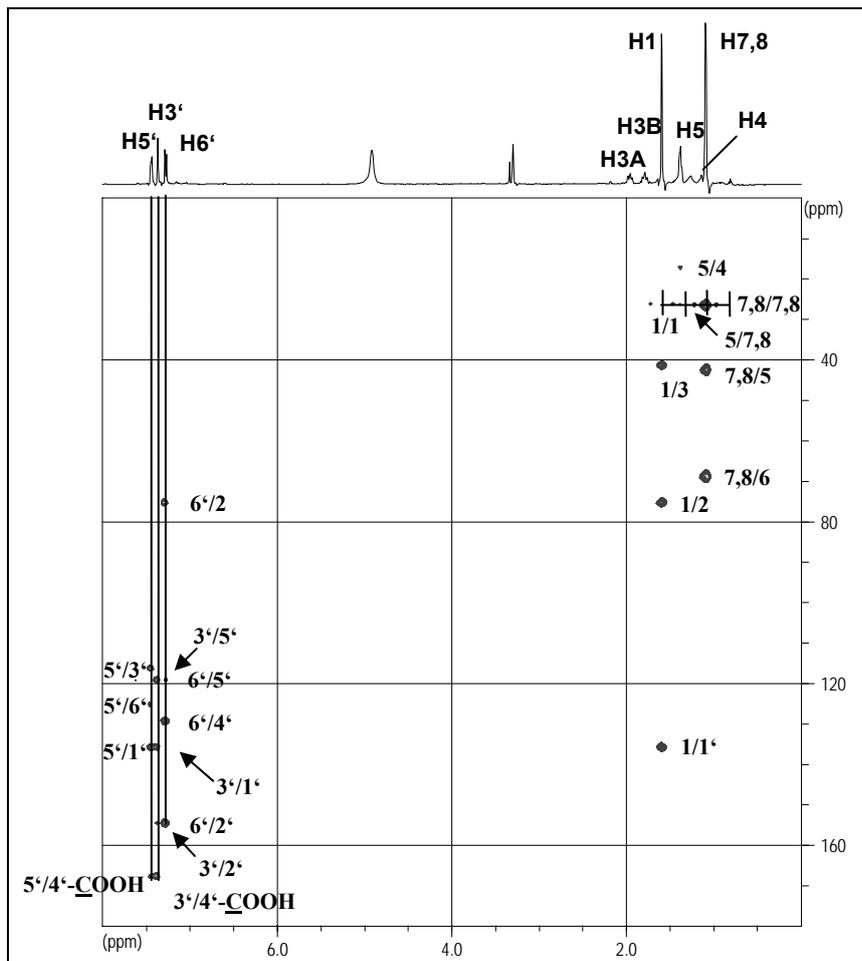


Abb.E12:

HMBC-Spektrum von Hydroxysydonsäure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

B. Sydonsäure

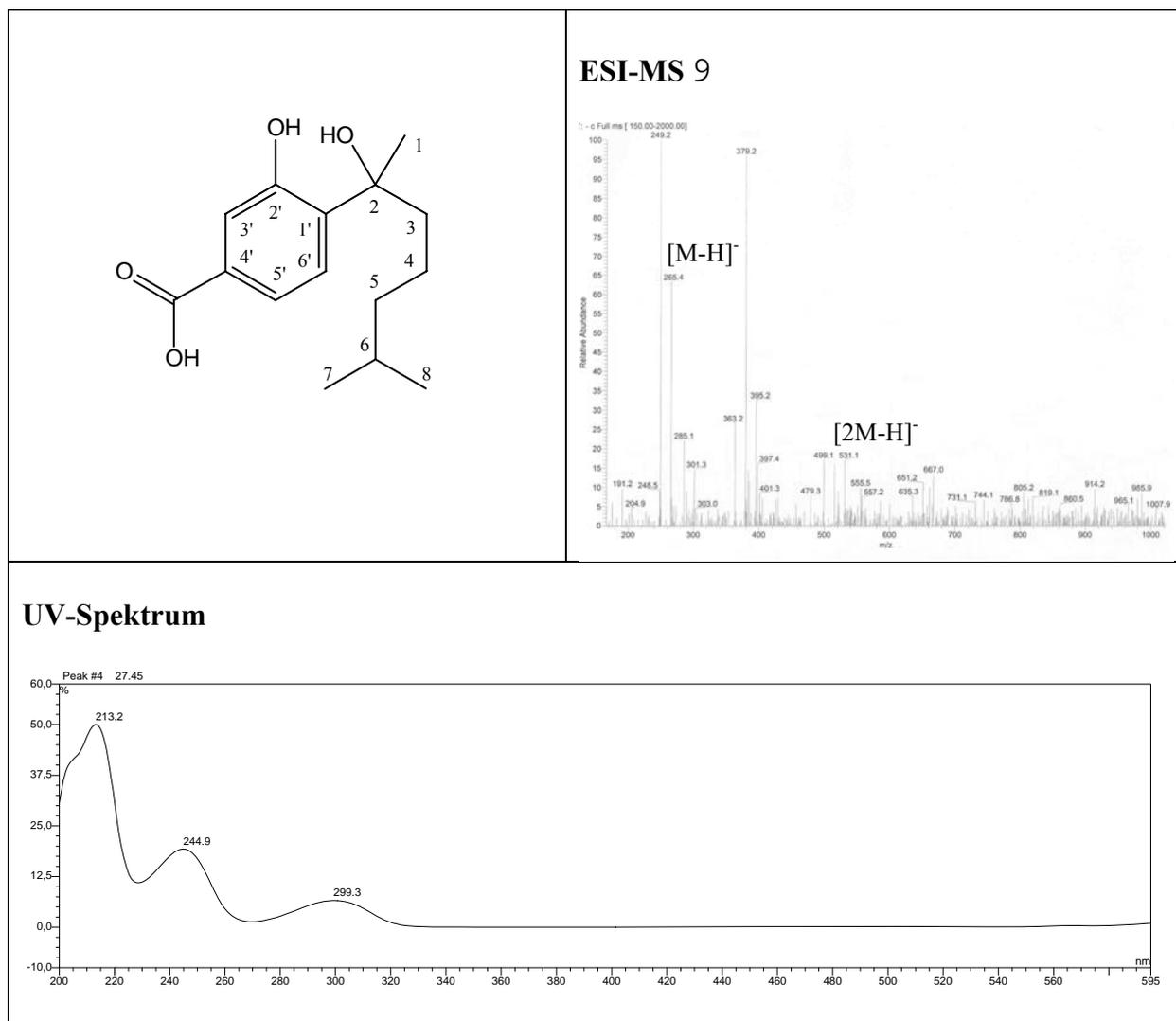
Sydonsäure wurde aus *Aspergillus sydowii* im Rahmen des Salinitätsexperimentes (3.5.2.B) aus dem Ethylacetatextrakt des Kulturmediums mit 1% Meersalzgehalt mittels präparativer HPLC isoliert (Substanz F).

Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Maxima bei 213, 245 und 299 nm und stimmte in zwei Maxima mit dem von Hydroxysydonsäure überein. Das Molekulargewicht von 266 amu wurde mithilfe des ESI-Massenspektrums bestimmt und unterschied sich damit um 16 amu von Hydroxysydonsäure. Die weitere Aufklärung der Struktur erfolgte durch ¹H-NMR- und H-H-COSY-Spektroskopie.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte weitgehend übereinstimmende Signale an den Positionen 3', 5' und 6' im aromatischen Bereich sowie für H₃-1, H₃-7, H₃-8, H-3A, H-3B und H₂-4 im aliphatischen Bereich im Vergleich zu Hydroxysydonsäure (Tab.E8). Abweichungen ergaben sich in einem zusätzlichen Signal bei 1.47 ppm (H-6), und der Hochfeldverschiebung von H-5A und H-5B (1.33, 1.18 ppm). Der strukturelle Unterschied zu Hydroxysydonsäure in Form eines Protons an Position 6 anstelle der Hydroxylgruppe konnte ferner anhand der Korrelationen von H-6 zu H₃-7/8 und H₂-4 im H-H-COSY-Spektrum belegt werden.

Die NMR-Daten zeigen gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten [Hamasaki *et al.* 1978], ebenso wie der für die optische Drehung ermittelte Wert von $[\alpha]_D^{20}$: $\pm 0^\circ$ [Hamasaki *et al.* 1978], was bedeuten könnte, dass die Verbindung als Racemat vorliegt.

Sydonsäure	
Systematischer Name:	3-Hydroxy-4-(1-hydroxy-1,5-dimethyl-hexyl)-benzoesäure
Probencode:	ENI-A1-1-P5
Quellorganismus:	<i>Aspergillus sydowii</i> (aus <i>Acanthophora spicifera</i>)
Substanzmenge:	2.57 mg
Beschreibung:	braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₂ O ₄
Molekulargewicht:	266 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	$\pm 0^\circ$ (c = 1, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	27.5 min



Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY	Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY
1	1.59 s (3H)	3B	1'		
2			2'		
3	A 1.94 ddd (0.9, 4.4, 12.6) B 1.77 ddd (1.9, 5.0, 13.9)	3B, 5A/B 1, 3A, 4, 5A/B	3'	7.36 d (1.6)	
4	AB 1.11-1.14 m	3B, 5A, 6	4'		
5	A 1.33 m B 1.18 m	3A/B, 5B, 4 3A/B, 5A	5'	7.43 dd (8.2, 1.6)	6'
6	1.47 m	4, 7/8	6'	7.26 d (8.2)	5'
7	0.81 d (3H, 6.6)	6	1'		
8	0.81 d (3H, 6.6)	6			

Tab.E8: NMR-Daten von Sydnonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

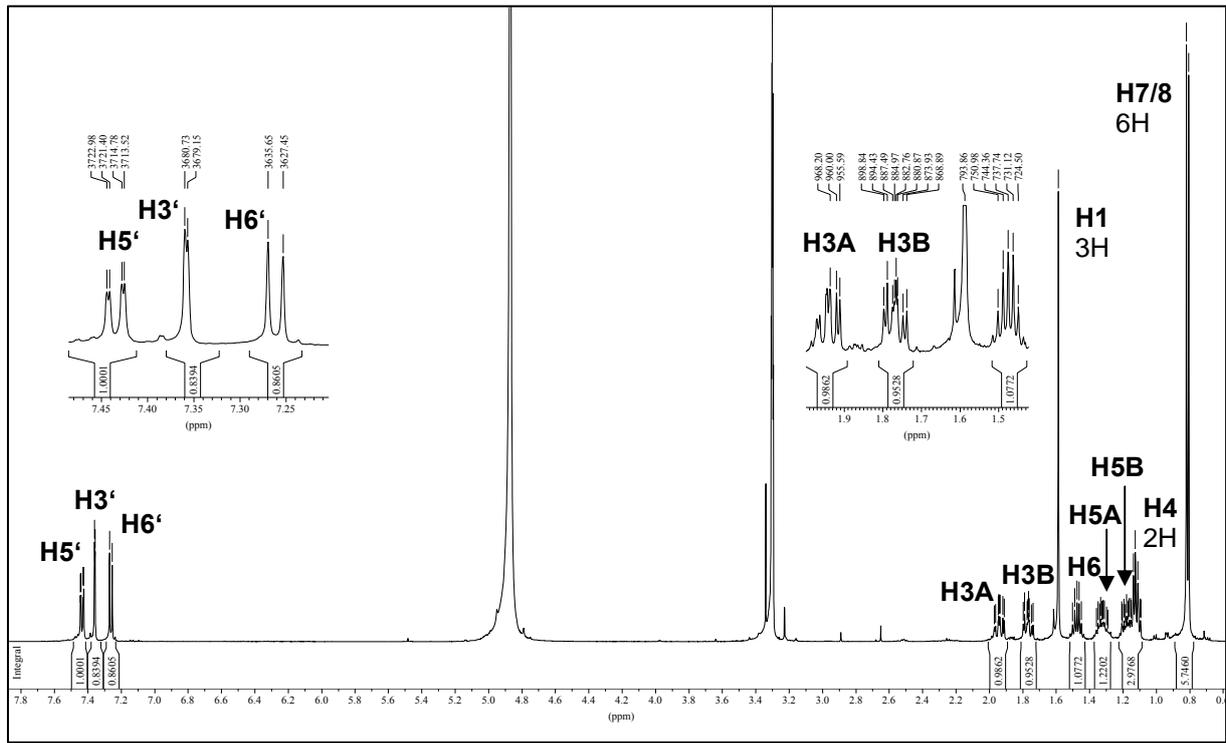


Abb.E13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Sydnonsäure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

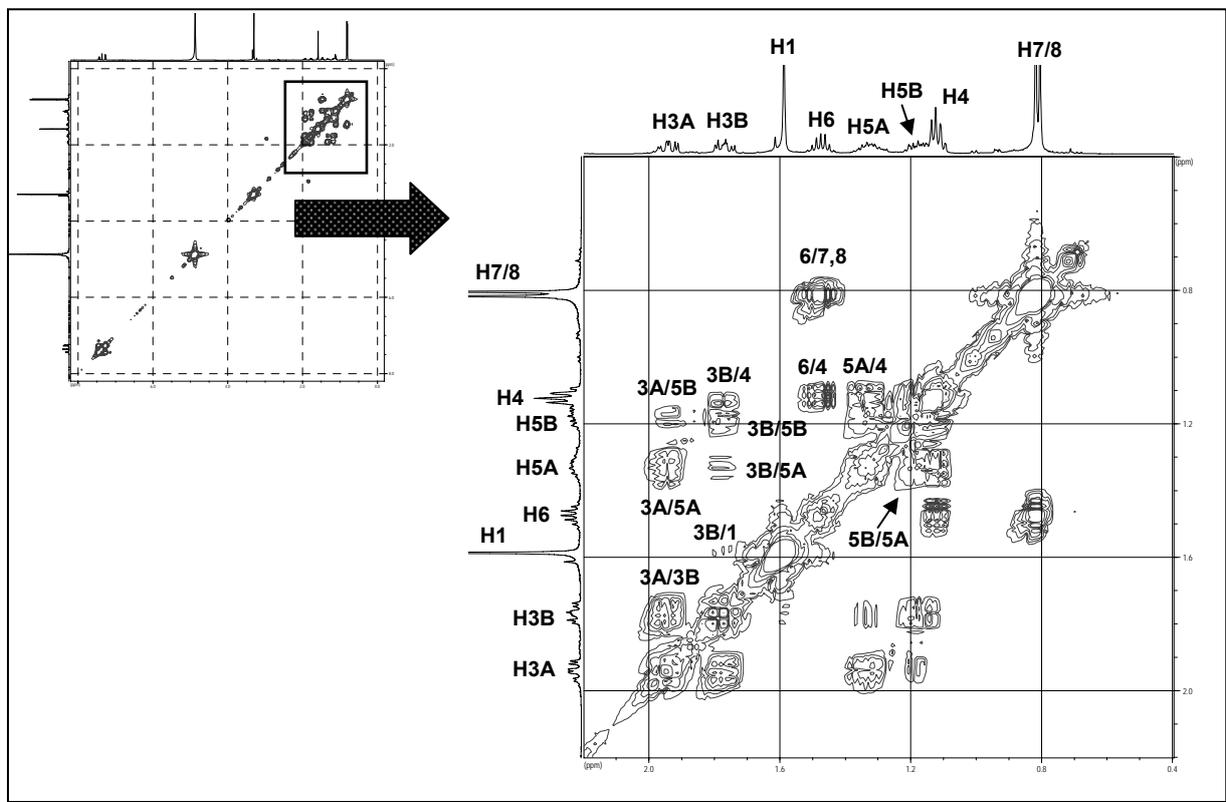


Abb.E14: H-H-COSY-Spektrum von Sydnonsäure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

C. Sydowsäure

Sydowsäure wurde ebenso wie Sydonsäure im Rahmen des Salinitätsexperimentes (3.5.2.B) aus dem Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von *Aspergillus sydowii* mit 1% Meersalzgehalt isoliert (Substanz B). Dies erfolgte mittels präparativer HPLC.

Das Molekulargewicht der Substanz wurde über ESI-MS ermittelt und betrug 264 amu. Das UV-Spektrum wies Maxima bei 213, 245 und 299 nm auf, ähnlich denen von Sydonsäure und Hydroxysydonsäure. Mithilfe der ^1H -, ^{13}C -, DEPT-, H-H-COSY- und HMBC-NMR-Spektren konnte die Struktur dieser zyklisierten Hydroxysydonsäure aufgeklärt werden.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte ebenso wie das von Sydonsäure und Hydroxysydonsäure drei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 7.26-7.43 ppm, die auf einen 1,2,4-trisubstituierten aromatischen Ring schließen ließen (Tab.E9). Dass es sich bei einem der Substituenten um eine Carboxylfunktion handelte (1-COOH), ließ sich der chemischen Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum entnehmen (169.7 ppm), dessen Position im Ring ergab sich aus den Korrelationen zu C-2 und C-6 im HMBC-Spektrum. C-3 mit einer Hydroxylgruppe als Substituent erschien im ^{13}C -NMR-Spektrum ebenfalls im tiefen Feld bei 158.1 ppm.

Dem DEPT-Spektrum konnte entnommen werden, dass C-4 ein quartäres C-Atom darstellen mußte. Die im ^1H -NMR-Spektrum beobachtete Methylgruppe (H₃-13) konnte somit, auch aufgrund der chemischen Verschiebung von 1.46 ppm, nicht direkt an dem aromatischen Ring positioniert sein. Die im HMBC-Spektrum beobachtete Korrelation von H₃-13 zu C-4 stellte demnach die Verknüpfung zu einem weiteren Spinsystem dar. Das Vorhandensein von zwei weiteren Methylgruppen in diesem Spinsystem konnte bereits dem ^1H -NMR-Spektrum entnommen werden, die jeweiligen C-Atome ließen sich durch Direktkorrelationen im HMBC-Spektrum bestimmen. Die Positionen aller drei Methylgruppen ergaben sich aus den HMBC-Korrelationen von H₃-13 zu C-7, C-11 und C-12, von H₃-14 zu C-9, 10 und 11 und von H₃-15 zu C-9 und C-10. Aufgrund der Nachbarschaft zu dem Stereozentrum an Position 7 erschienen H-12A und H-12B als getrennte Signale im ^1H -NMR-Spektrum. Über die Korrelationen von H-12A zu C-11, H₂-11 zu C-7 sowie H₂-10 zu C-9 und C-12 im HMBC-Spektrum ließ sich schließlich die Anordnung der übrigen Positionen innerhalb des aliphatischen Spinsystems festlegen. Aus der Tieffeld-Verschiebung von C-7 und C-9 konnte die Nachbarschaft zu einem Sauerstoff-Atom geschlossen werden. Der Vergleich mit dem Molekulargewicht ließ nur den Schluss zu, dass es sich dabei um eine Etherbrücke handelte, so dass ein zyklisches System vorliegen musste, das sich aufgrund der übrigen Korrelationen als Pyranring identifizieren ließ.

Die gemessenen NMR-Daten stimmten mit den Literaturdaten [Hamasaki *et al.* 1978] überein. Übereinstimmung zeigte auch der für das (-)-Enantiomer der Sydowsäure angegebene Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: -6° [DNP 2004].

Sydowsäure

Systematischer Name: 3-Hydroxy-4-(2,6,6-trimethyl-tetrahydro-pyran-2-yl)-benzoesäure

Probencode: ENI-A1-1-P1

Quellorganismus: *Aspergillus sydowii* (aus *Acanthophora spicifera*)

Substanzmenge: 9.9 mg

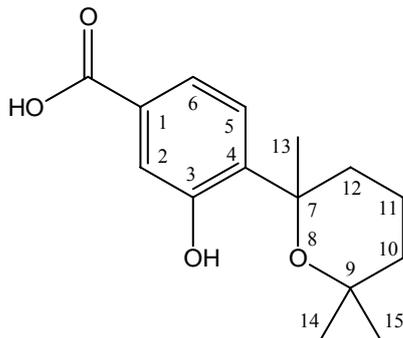
Beschreibung: braun, kristallin

Summenformel: $C_{15}H_{20}O_4$

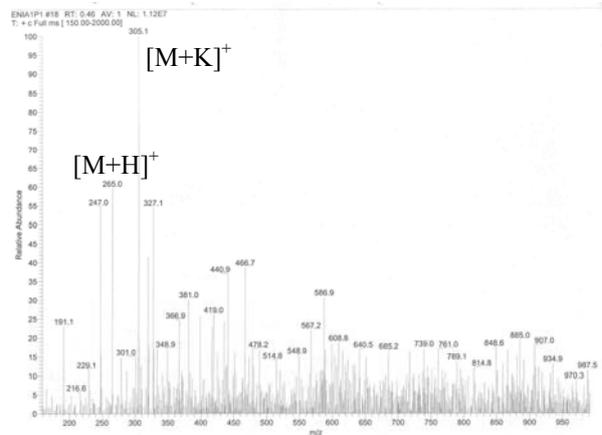
Molekulargewicht: 264 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: -6° (c = 1.1, $CHCl_3$)

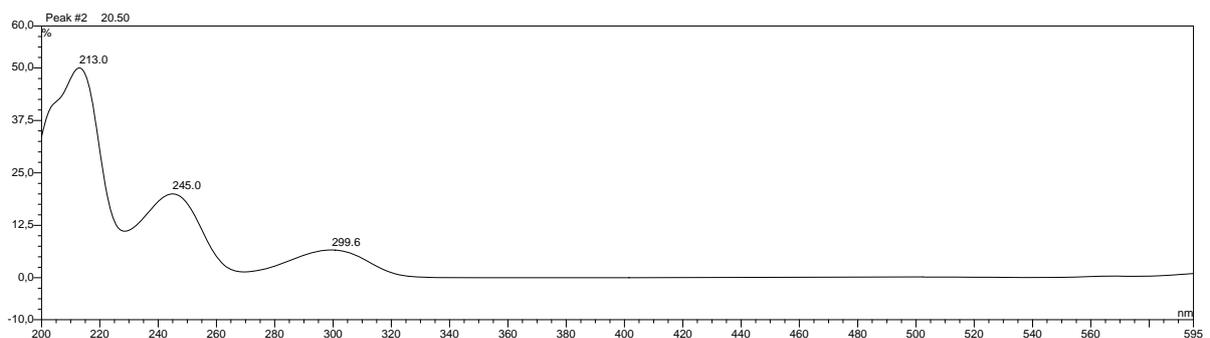
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 20.4 min



ESI-MS :



UV-Spektrum



	δ_H (J Hz)	δ_c	H-H-COSY	HMBC
1				
1-COOH		169.7 s		
2	7.36 d (1.6)	119.1 d		1-COOH, 2, 3, 4, 6
3		158.1 s		
4		137.6 s		
5	7.22 d (7.9)	126.2 d	6	1, 3, 5, 7
6	7.47 dd (1.6, 7.9)	122.0 d	5	1-COOH, 2, 4, 5, 6
7		78.8 s		
8				
9		76.3 s		
10	AB 1.52-1.56 m	37.8 t	11/12B, 14, 15	9, 10, 12, 15
11	AB 1.64-1.78 m ^a	17.7 t	10, 12A	7, 12
12	A 2.49 dt (3.5, 13.6) B 1.64-1.78 m ^a	34.8 t	11, 12B 10, 12A	11
13	1.46 s (3H)	31.7 q		4, 7, 11, 12, 13
14	1.27 s (3H)	32.3 q	10, 15	9, 10, 11, 14, 15
15	0.93 s (3H)	25.2 q	10, 14	9, 10, 14, 15

^a Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

Tab.E9: NMR-Daten von Sydowsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

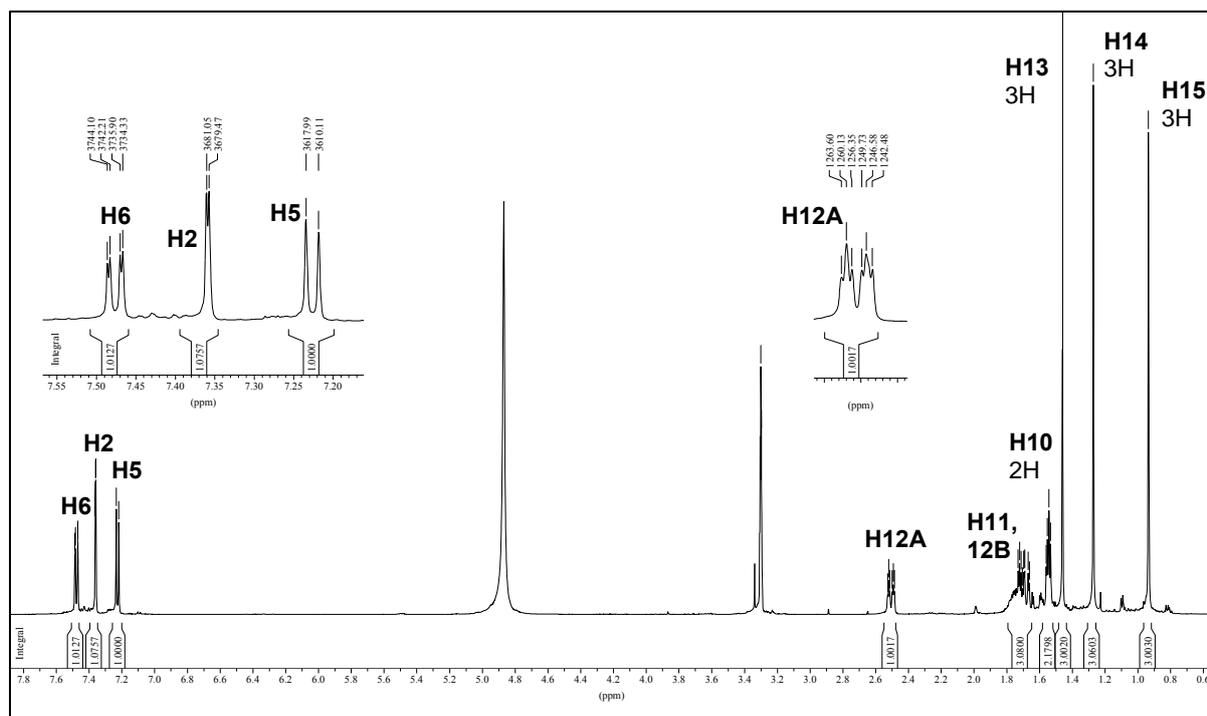


Abb.E15: ¹H-NMR-Spektrum von Sydowsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

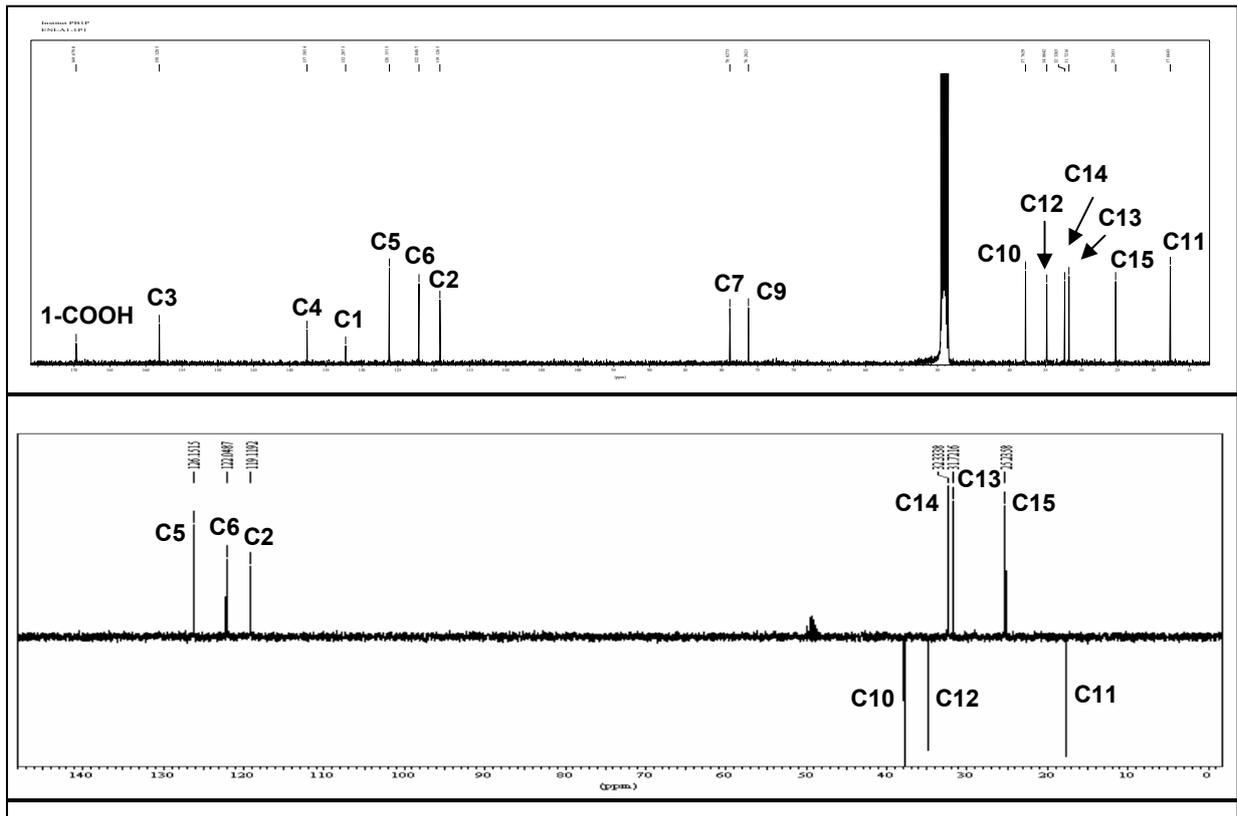


Abb.E16: ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektrum von Sydnova Säure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

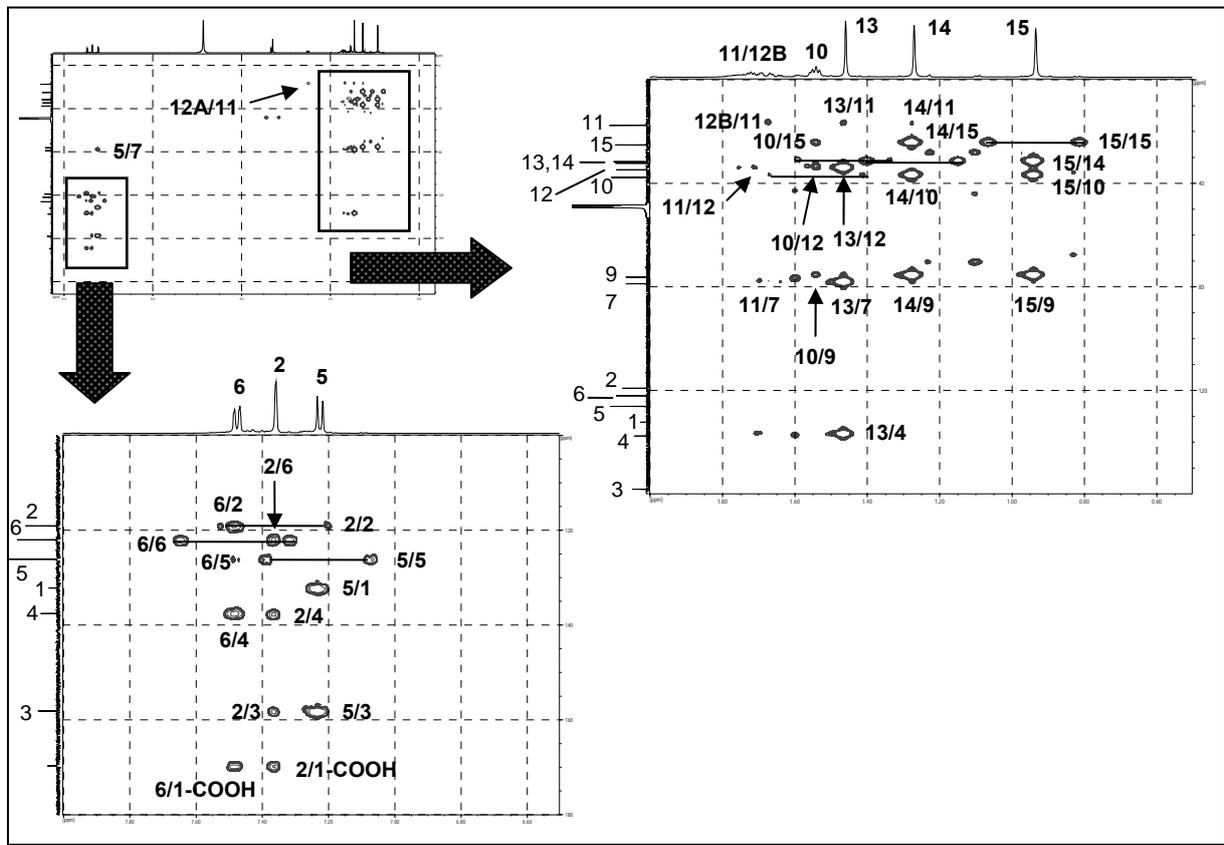


Abb.E17: HMBC-Spektrum von Sydnova Säure, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

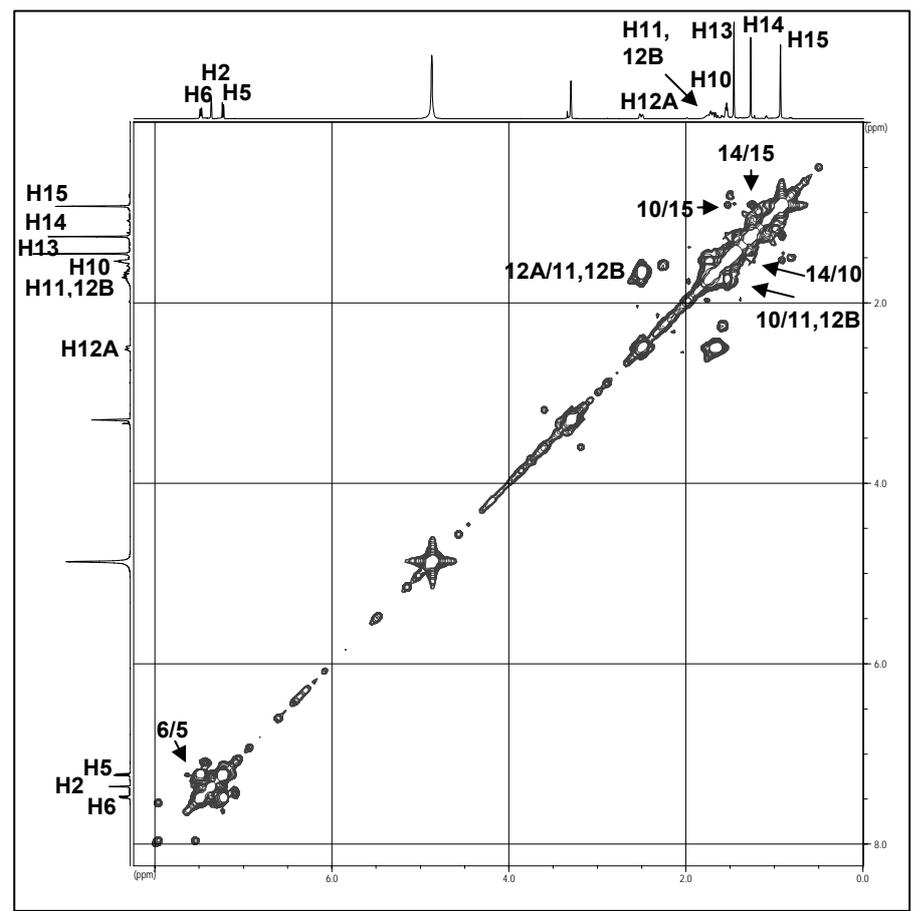


Abb.E18: H-H-COSY-Spektrum von Sydowsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

D. S15 (Neuer Naturstoff)

Dieser neue Naturstoff wurde aus dem Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von *Aspergillus sydowii* mithilfe der Sephadex-Säulenchromatographie isoliert (Isolierschema siehe Abb.E10).

Die Struktur dieses Cyclopentanoids konnte mittels ESI-MS, HR-MS, ¹H- und ¹³C-NMR sowie HMBC und HMQC festgelegt werden. Das Molekulargewicht von 396 amu wurde dem Pseudomolekülionenpeak des ESI-MS-Spektrums entnommen. Per Hochauflösungs-MS konnte dies bestätigt sowie die Summenformel von C₁₈H₁₄Cl₂O₆ bestimmt werden. Das charakteristische Ionencluster im Massen-Spektrum gab außerdem Hinweise auf das Vorhandensein von zwei Chloratomen im Molekül.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Substanz, gemessen in CD₃OD, zeigte sechs Protonen im aromatischen Bereich, ein weiteres bei 4.29 ppm sowie eine Methoxygruppe (Tab.E10). Die Zugehörigkeit der aromatischen Protonen zu den zwei verschiedenen Spinsystemen ließ sich zunächst aufgrund ihrer Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum vermuten. Die

Kopplungskonstante von H-5' und H-6' (8.8 Hz) ließ auf eine *ortho*-Anordnung der Protonen zueinander schließen, die verbreiterten Signale von H-2' und H-6' auf deren *meta*-Kopplung. Durch die entsprechenden Korrelationen im HMBC-Spektrum wurde dies bestätigt. C-4' war im ^{13}C -NMR-Spektrum stark tieffeldverschoben (150.8 ppm), was durch eine Hydroxylgruppe als Substituent erklärt werden konnte, ebenso wie C-3' (132.4 ppm), bedingt durch ein Chloratom als Substituent.

Das zweite Spinsystem ließ sich ebenso aus den Kopplungskonstanten des ^1H -NMR-Spektrums als ein weiteres 1,2,4-trisubstituiertes aromatisches System bestimmen. Bestätigt wurde dies durch die entsprechenden Korrelationen im HMBC. C-3'' zeigte genau wie C-3' eine Tieffeldverschiebung aufgrund des Chlorsubstituenten. Dass C-4'' sich in direkter Nachbarschaft zu einem Heteroatom befand, ließ bereits seine chemische Verschiebung vermuten (151.2 ppm). Hierbei handelte es sich um eine Methoxygruppe, wie der Korrelation 4''-OCH₃ zu 4'' im HMBC-Spektrum entnommen werden konnte.

In dem dritten vorliegenden Spinsystem konnte die Zuordnung von C-4 mithilfe des HMQC-Spektrums aus der Korrelation von H-4 zu C-4 geschlussfolgert werden. C-4 und C-5 waren tieffeldverschoben, da sie Hydroxylgruppen als Substituenten trugen und es sich um aliphatische Kohlenstoff-Atome handelte. Im ^1H -NMR-Spektrum, gemessen in DMSO-d₆, zeigten 4-OH und 5-OH Signalüberlappung. Die Verknüpfung der Ringsysteme miteinander konnte schließlich über die Korrelation von H-2' zu C-5 im HMBC festgelegt werden.

Die Struktur besitzt zwei Stereozentren, die optische Drehung beträgt $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -23°.

Bei der vorliegenden Verbindung handelt es sich um einen neuen Naturstoff. Strukturelle Ähnlichkeit besteht zu Cyclopentanoiden wie Chamonixin und Involutin, die als Pigmente in verschiedenen Basidiomyceten enthalten sind [Gill und Steglich 1987]. Aus Ascomyceten wurden Vertreter der Cyclopentanoide erstmals im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Besonders ungewöhnlich ist bei der hier vorliegenden Verbindung außerdem die Halogenierung der Benzolringe.

S15 (Neuer Naturstoff)

Systematischer Name: 5-(3-Chlor-4-hydroxy-phenyl)-2-(3-chlor-4-methoxy-phenyl)-3,4,5-trihydroxy-cyclopent-2-enon

Probencode: ENI-A1-E-S15

Quellorganismus: *Aspergillus sydowii* (aus *Acanthophora spicifera*)

Substanzmenge: 7.1 mg

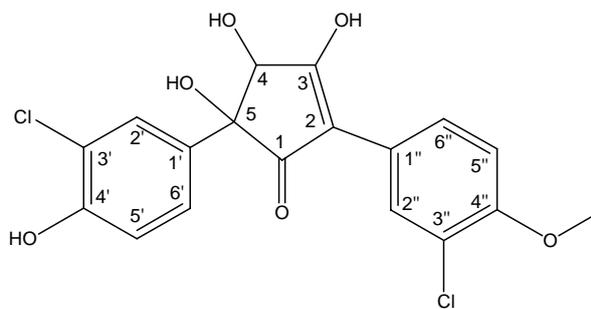
Beschreibung: gelblich-braun, kristallin

Summenformel: C₁₈H₁₄Cl₂O₆

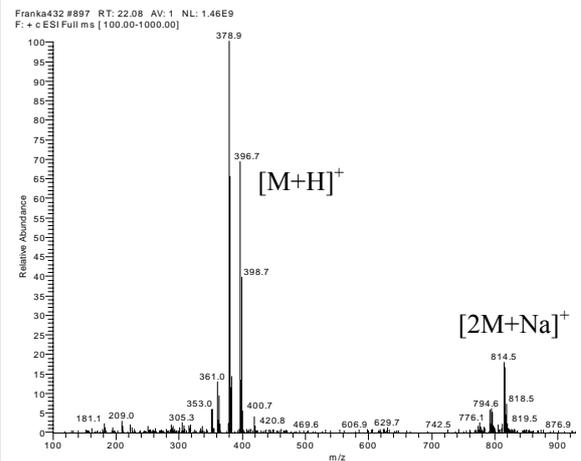
Molekulargewicht: 396 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: -23° (c = 0.1, MeOH)

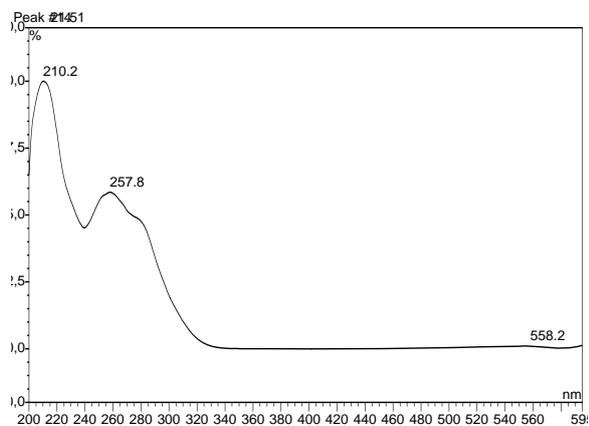
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 21.6 min



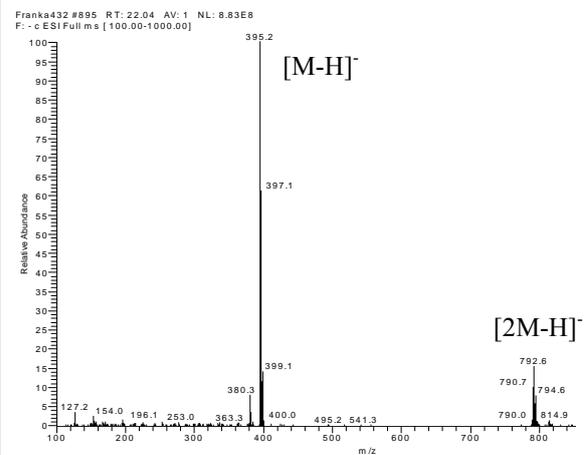
ESI-MS :



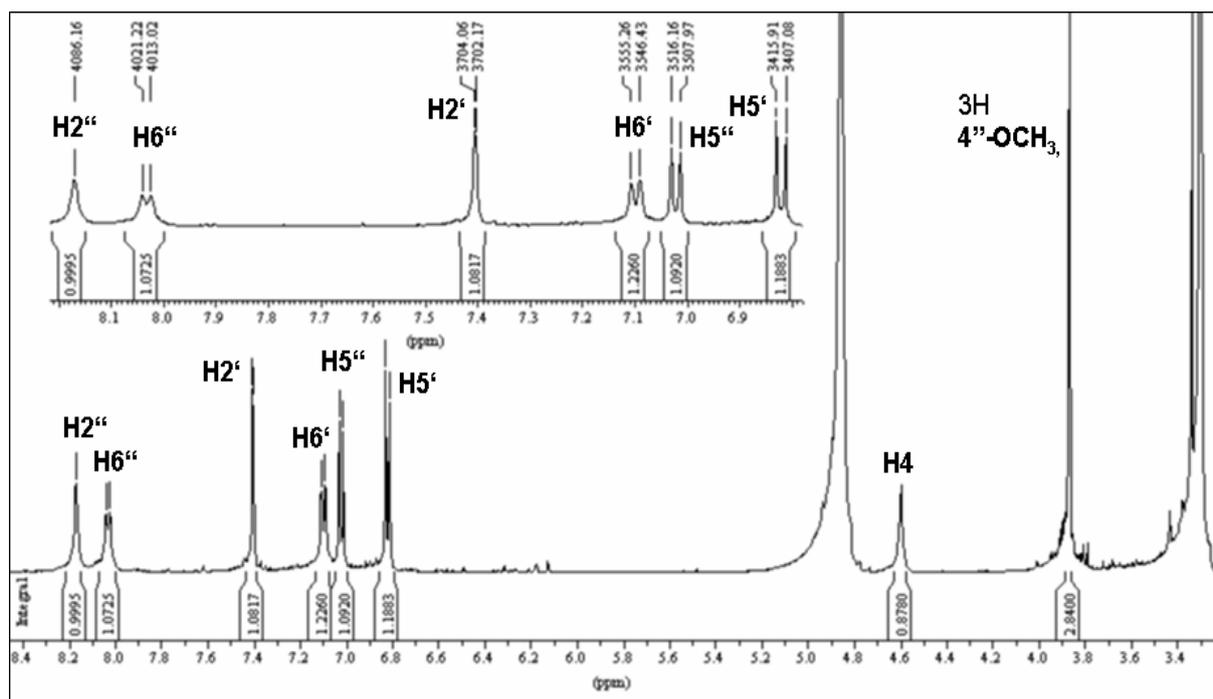
UV-Spektrum



ESI-MS 9



S16				S15		
Position	δ_H (J Hz)	δ_c	HMBC	δ_H (J Hz)	δ_c	HMBC
1		195.0				
2		105				
3		194.1				
4	4.81 s	79.6	1, 5	4.29 s	79.5	
4-OH	4.07 s			4.09 s		
5		82.0			~84	
5-OH	4.07 s			4.09 s		
1'		118.1			118.2	
2'	7.21 bs	128.4	4, 5, 1', 6'	7.21 bs	128.3	1', 4', 6', 5
3'		134.7			132.4	
4'		151.0			150.8	
5'	6.79 d (8.2)	115.0	1', 3', 4'	6.82 d (8.8)	115.2	1', 3', 4'
6'	6.99 d (8.2)	126.6	5, 2', 4'	6.99 d (8.8)	126.5	2', 4', 5'
1''		110			120.1	
2''		156		8.35 s	126.5	
3''	6.34 s	101.9	1'', 2'', 4'', 5''		128.3	
4''		152.1			151.2	
4''-OCH ₃	3.73 s	55.6	4''	3.81 s	55.9	4''
5''		116.4		7.06 d (8.2)	112.1	1'', 3'', 4''
6''	8.35 s	127.3	2, 1'', 2'', 4'', 5''	8.21 d (8.2)	125.3	

Tab.E10: NMR-Daten von S15 und S16, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)Abb.E19: ¹H-NMR-Spektrum von S15, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

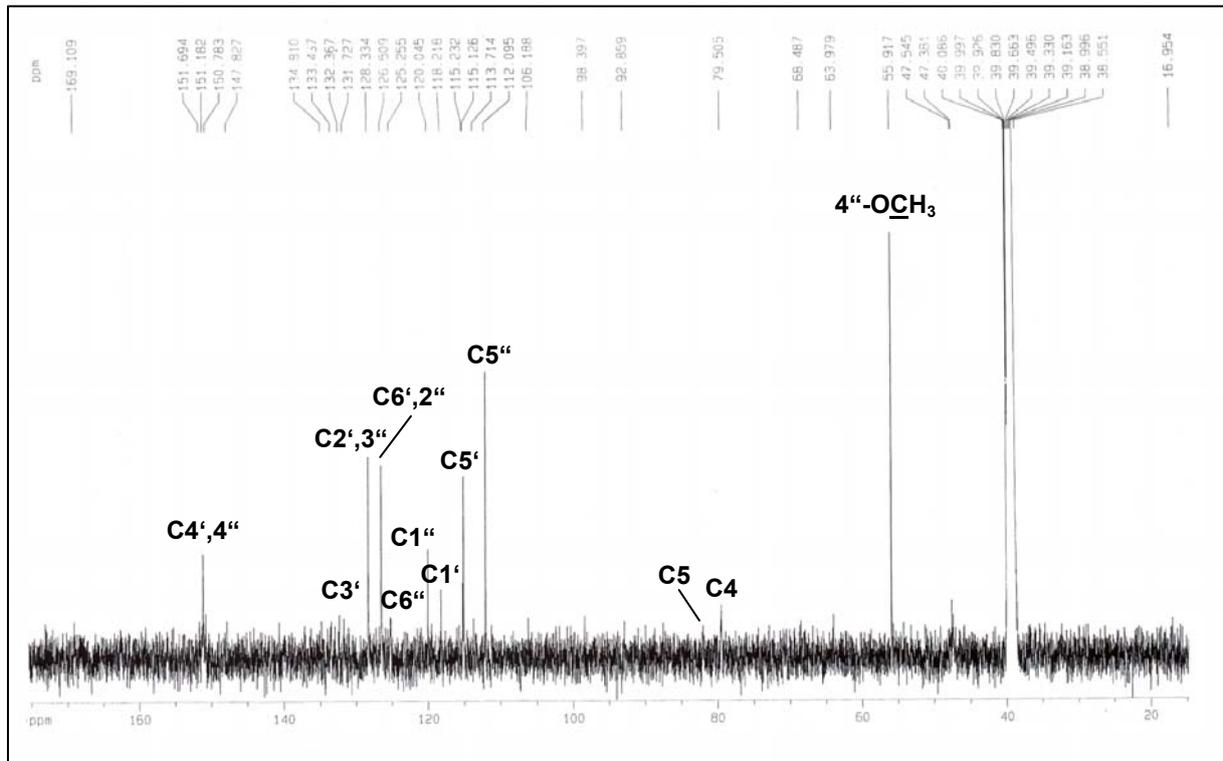


Abb.E20: ^{13}C -NMR-Spektrum von S15, gemessen in DMSO-d_6 (500 MHz)

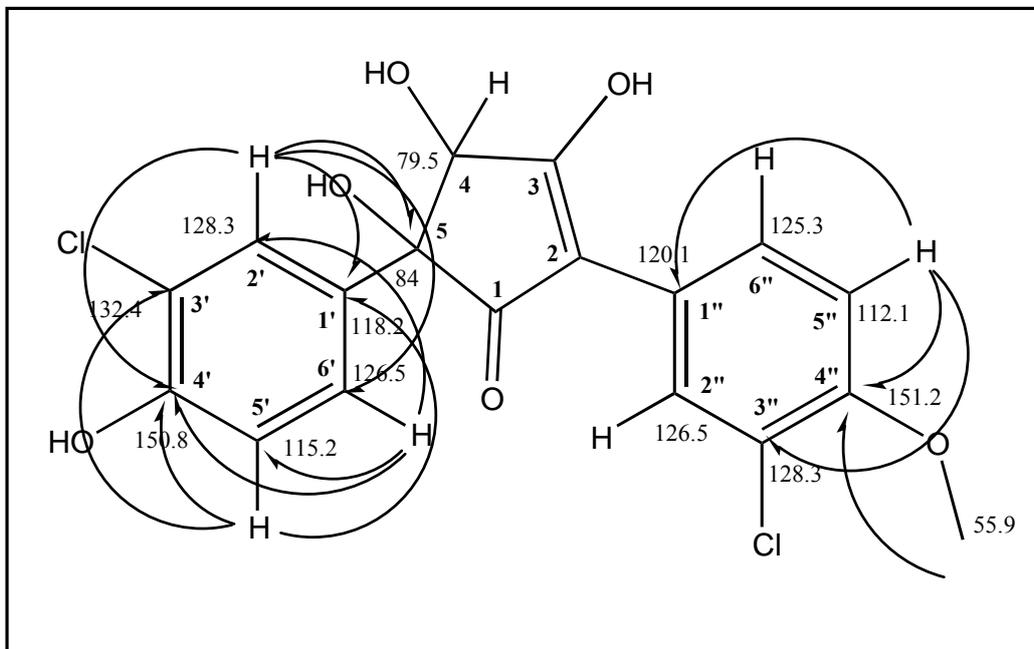


Abb.E21: HMBC-Korrelationen und ^{13}C -NMR-Daten von S15

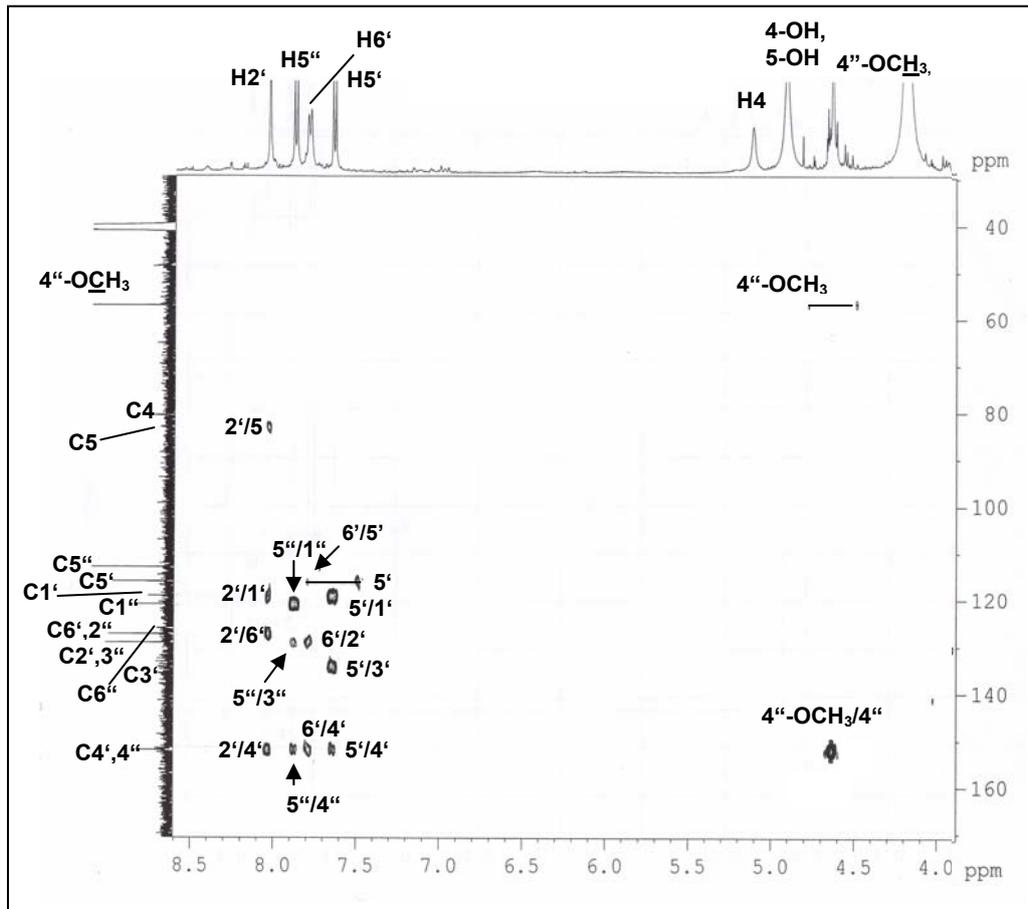


Abb.E22:

HMBC-Spektrum von S15, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

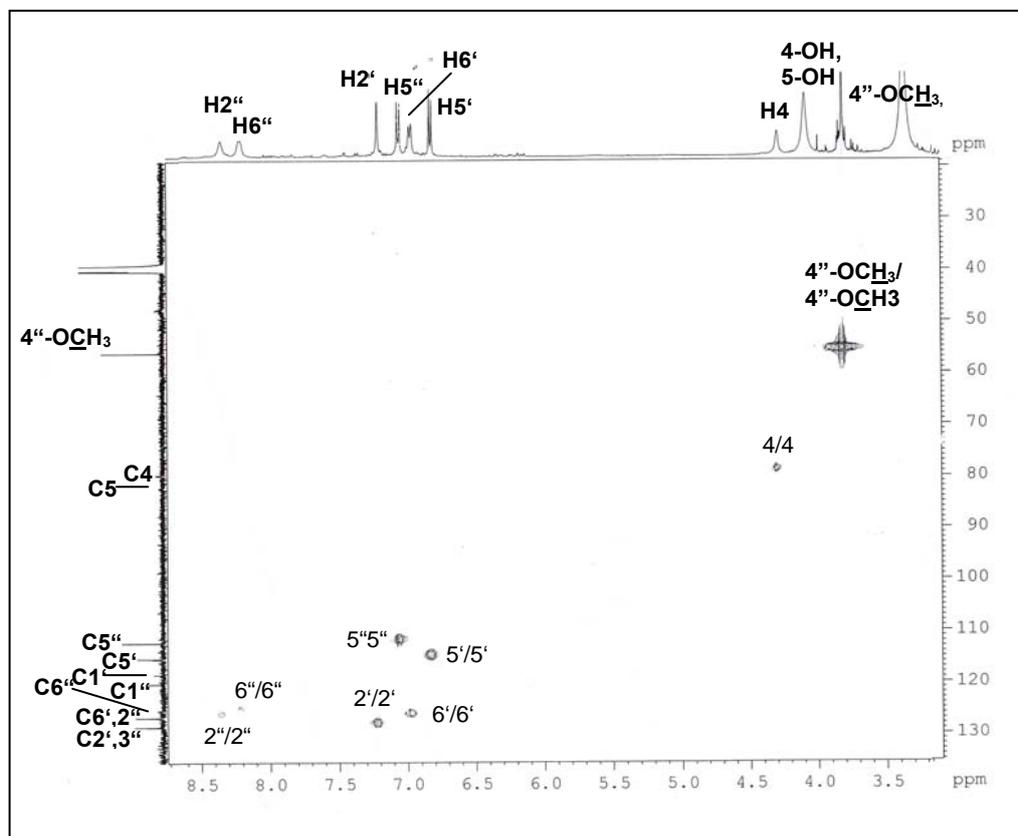


Abb.E23:

HMQC-Spektrum von S15, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

E. S16 (Neuer Naturstoff)

Ebenso wie der strukturell verwandte Naturstoff S15 (siehe oben) wurde die Substanz aus dem Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von *Aspergillus sydowii* mittels Sephadex-Säulenchromatographie isoliert (Isolierschema siehe Abb.E10). Die Substanz konnte außerdem in dem mit Methanol extrahierten Myzelium des Pilzes durch Auftrennung über „Vacuum-Liquid-Chromatographie“ und nachfolgender Kieselgel-Säulenchromatographie nachgewiesen werden.

Mithilfe von ESI-MS, HR-MS, ^1H - und ^{13}C -NMR sowie HMBC konnte die Struktur des Cyclopentanoids festgelegt werden (Tab.E10). Eine mögliche strukturelle Verwandtschaft zu S15 ließ bereits das UV-Spektrum mit den Maxima von 210 und 276 nm vermuten, es unterscheidet sich damit lediglich in dem zweiten Maximum. Das Molekulargewicht von 412 amu wurde dem Pseudomolekülionenpeak des ESI-MS-Spektrums entnommen, die Substanz wich demzufolge um 16 Masseneinheiten von S15 ab. Durch das HR-Massenspektrum konnte dies bestätigt sowie die Summenformel von $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_7$ abgeleitet werden. Das ^1H -NMR-Spektrum der Substanz, gemessen in CD_3OD , zeigte fünf Protonen im aromatischen Bereich, ein Proton bei 4.81 ppm und eine Methoxygruppe. Die Zugehörigkeit der aromatischen Protonen zu zwei Spinsystemen ließ sich zunächst aufgrund ihrer Kopplungskonstanten im ^1H -NMR-Spektrum, sowie der entsprechenden Korrelationen im HMBC bestimmen. Die Kopplungskonstante von 8.2 Hz zwischen H-5' und H-6' ließ auf eine *ortho*-Anordnung der Protonen zueinander schließen, die verbreiterten Signale von H-2' und H-6' auf deren *meta*-Konstellation. Im ^{13}C -NMR-Spektrum war C-4' stark tieffeldverschoben (150.0 ppm), was durch eine Hydroxylgruppe als Substituent erklärt werden konnte, ebenso wie C-3' (134.7 ppm), bedingt durch ein Chloratom als Substituent.

Einem zweiten Spinsystem ließen sich zwei Protonen zuordnen, die im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett erschienen. H-3'' und H-6'' mussten in *para*-Konstellation zueinander angeordnet sein, wie dem ^1H -NMR-Spektrum entnommen werden konnte und durch zahlreiche Korrelationen im HMBC-Spektrum bestätigt wurde. C-5'' zeigte ebenso wie C-3' eine Tieffeldverschiebung aufgrund des Chlorsubstituenten. Dass C-4'' sich in direkter Nachbarschaft zu einem Sauerstoff-Atom befand, ließ bereits seine chemische Verschiebung vermuten (152.1 ppm). Der Korrelation von 4''-OCH₃ zu 4'' im HMBC-Spektrum konnte schließlich entnommen werden, dass es sich hierbei um eine Methoxygruppe handelte,.

Als Bestandteil des Cyclopentanringes erschien H-4 im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett bei 4.81 ppm sowie die Hydroxylgruppen 4-OH und 5-OH bei einer chemischen Verschiebung von 4.07 ppm. Die Anordnung innerhalb dieses dritten Spinsystems ergab sich aus den

Korrelationen von H-4 zu C-1 und C-5 sowie von H6'' zu C-2, von H-2' zu C-4 und C-5 und von H-6' zu C-5 im HMBC-Spektrum. Mithilfe letztgenannter Korrelationen konnte auch die Verknüpfung der drei Ringsysteme miteinander bestimmt werden. C-1 zeigt als Carbonylfunktion im ^{13}C -NMR-Spektrum eine starke Tieffeldverschiebung, ebenso wie C-3 aufgrund der β -Stellung zu C-1 in einer α,β -ungesättigten Keton-Partialstruktur sowie der zusätzlichen Hydroxylierung. Es liegt somit eine vinyloge Carbonsäure vor.

Bei der vorliegenden Verbindung handelt es sich ebenfalls um einen neuen Naturstoff, der sich von S15 durch eine zusätzliche Hydroxylfunktion an C-2'' auszeichnet.

Für S16 wurde eine optische Drehung von $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -54° ermittelt.

S16 (Neuer Naturstoff)	
Systematischer Name:	2-(5-Chlor-2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)-5-(3-chlor-4-hydroxy-phenyl)-3,4,5-trihydroxy-cyclopent-2-enon
Probencode:	ENI-A1-E-S16, ENI-A1-MV-Si1
Quellorganismus:	<i>Aspergillus sydowii</i> (aus <i>Acanthophora spicifera</i>)
Substanzmenge:	19.9 mg
Beschreibung:	gelblich-braun, kristallin
Summenformel:	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_7$
Molekulargewicht:	412 g/mol
Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$:	-54° (c = 0.1, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	18.2 min
	ESI-MS :

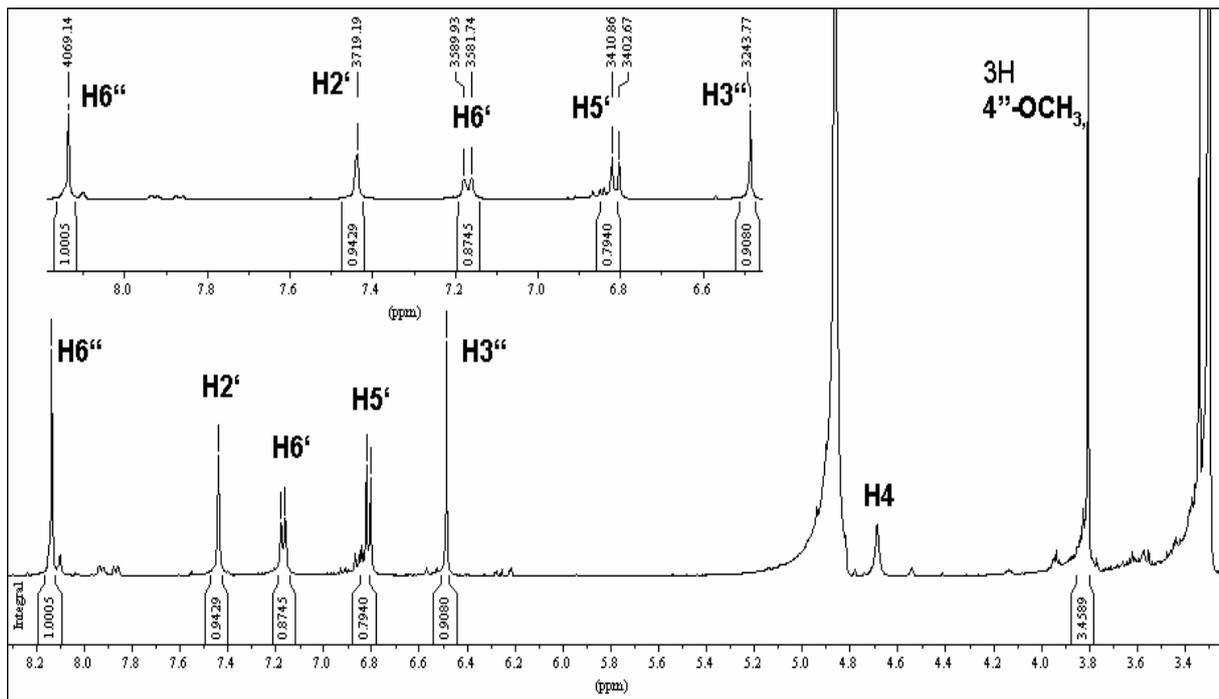
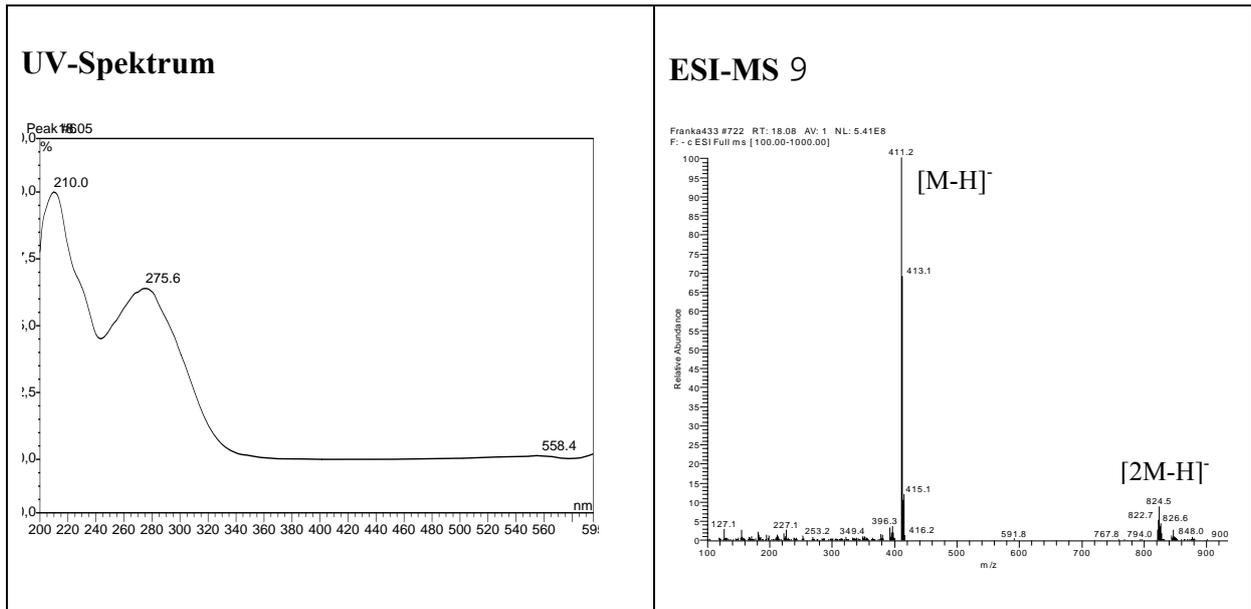


Abb.E24: ¹H-NMR-Spektrum von S16, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

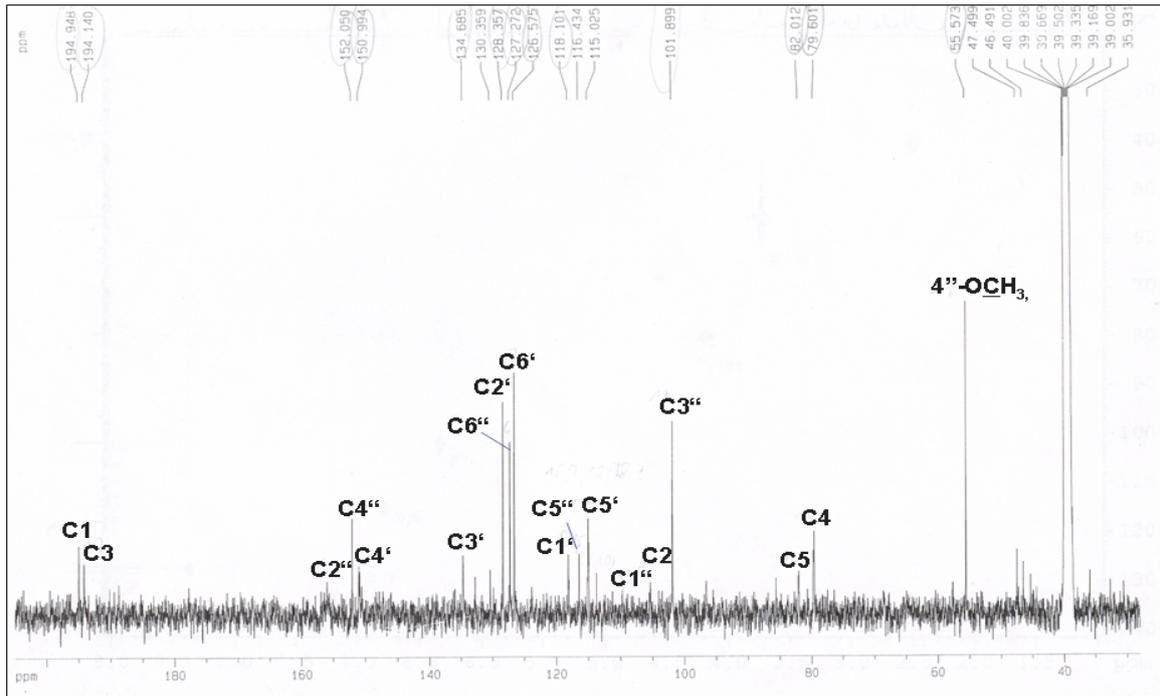


Abb.E25: ^{13}C -NMR-Spektrum von S16, gemessen in DMSO-d_6 (500 MHz)

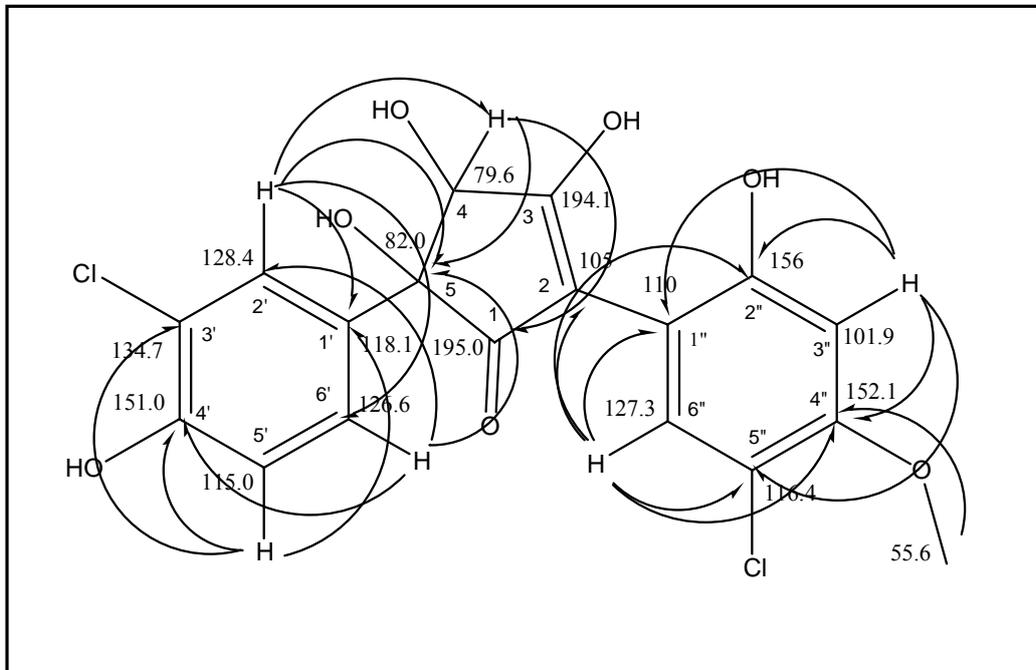


Abb.E26: HMBC-Korrelationen und ^{13}C -NMR-Daten von S16

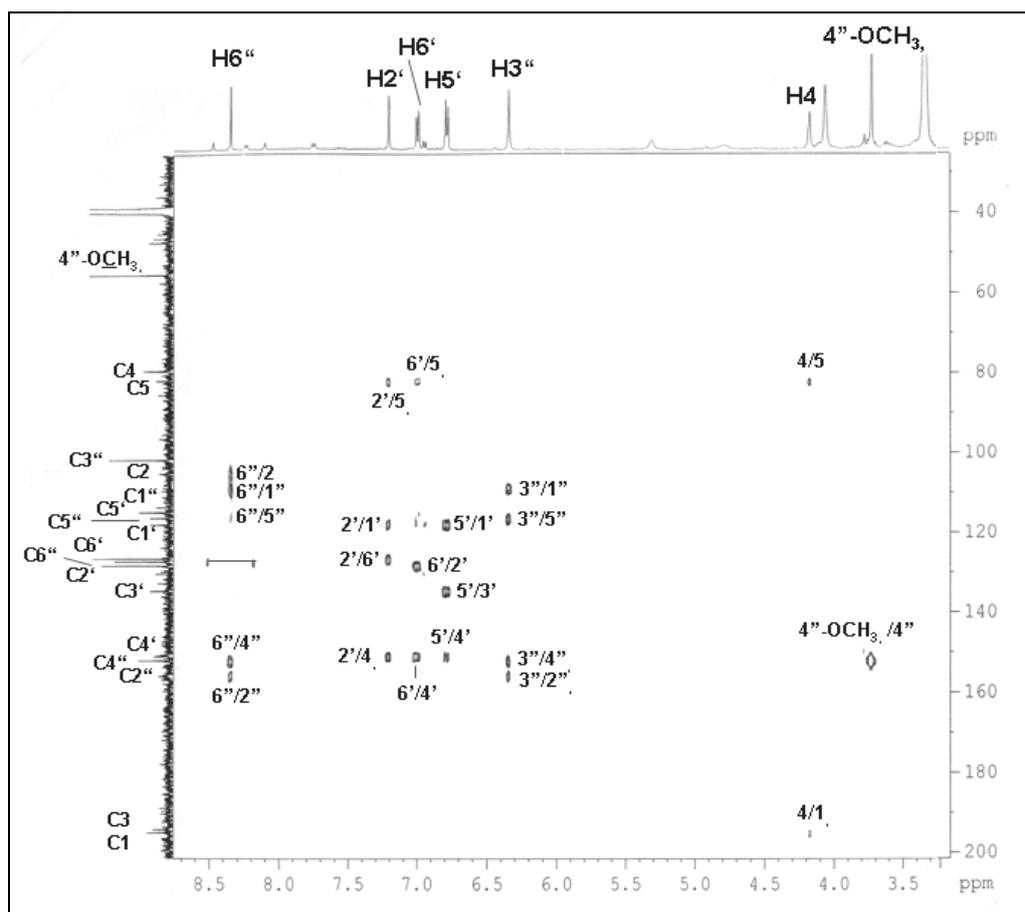


Abb.E27: HMBC-Spektrum von S16, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

3.2. Ergebnisse der Bearbeitung der algenassoziierten Pilze aus Qingdao (China)

3.2.4. Screening auf Bioaktivität

Im Gegensatz zu den aus tropischen Algen isolierten endophytischen Pilzen (siehe 3.1.1.) zeigen diese algenassoziierten Pilze der gemäßigten Klimate ein geringeres Spektrum an Bioaktivitäten (Vergleich der Bioaktivitäten mariner Pilze der tropischen und gemäßigten Klimate siehe 3.5.5). Getestet wurden jeweils die Ethylacetatextrakte der 300 ml Standkulturen in einer Konzentration von 25 mg/ml im antibiotischen Test und im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml. War bei dieser Konzentration eine nennenswerte Aktivität zu verzeichnen, wurde zusätzlich die Aktivität in einer Konzentration von 100 µg/ml getestet.

Bez. Pilzstamm	Identifikation Pilzstamm	Wirtsorganismus	Antibiotischer Assay HH [mm]		Brine Shrimp Assay 100 - 200 [µg/ml] Letalität [%]
			EC--BS--SC	CC--CH	
QEN 1	<i>Arthrinium sacchari</i>	<i>Grateloupia filicina</i>	0---0---0	0--0	-- - 0
QEN 2	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Gracilaria asiatica</i>	0---0---0	0--0	-- - 5
QEN 3	NN	<i>Gracilaria asiatica</i>	0---0---0	0--0	-- - 5
QEN 4	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Gracilaria asiatica</i>	0---0---0	0--0	-- - 10
QEN 5	<i>Eurotium repens</i>	<i>Sargassum siliquastrum</i>	0---0---0	0--0	-- - 0
QEN 6	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Sargassum thunbergii</i>	0---0---0	0--0	-- - 10
QEN 7	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>	0--- 7 ---0	0--0	95 - 100
QEN 8	NN	<i>Sargassum siliquastrum</i>	0---0---0	0--0	-- - 5
QEN 9	<i>Penicillium griseoroseum</i>	<i>Leathesia difformis</i>	0---0---0	0--0	-- - 0
QEN 10	<i>Eurotium repens</i>	<i>Leathesia difformis</i>	0---0---0	0--0	-- - 5
QEN 11	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Polysiphonia arceslate</i>	0---0---0	21--10	0 - 20
QEN 12	NN	<i>Sargassum siliquastrum</i>	0---0---0	0--0	5 - 25

NN= Identifikation liegt noch nicht vor

EC = *Escherichia coli*, BS = *Bacillus subtilis*, SC = *Saccharomyces cerevisiae*,
CC = *Cladosporium cucumerinum*, CH = *Cladosporium herbarum*

Tab.E11: Ergebnisse der Biotests der algenassoziierten Pilze aus Qingdao (China)

3.2.2. Inhaltsstoffe aus *Alternaria tenuissima* (QEN-4)

Dieser Stamm der Gattung *Alternaria* wurde aus der Rotalge *Gracilaria asiatica* isoliert. Der Ethylacetatextrakt des Pilzes zeigte eine schwache Aktivität im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml. Als Hauptinhaltsstoff des vorliegenden marinen Pilzes wurde das Mykotoxin Tenuazonsäure nachgewiesen.

A. Tenuazonsäure (QEN-4-RE)

Tenuazonsäure wurde in dem mit der Rotalge *Gracilaria asiatica* assoziierten Stamm *Alternaria tenuissima* nachgewiesen. Die Substanz dominierte den Ethylacetatextrakt, wie dem HPLC-Chromatogramm deutlich zu ersehen war, der aus diesem Grunde direkt analytisch vermessen werden konnte.

Das Molekulargewicht der Substanz von 197 amu und deren UV-Spektrum mit den Maxima 219 und 277 nm sowie die Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm ließen bereits durch ihre Übereinstimmung mit der aus dem schwammassoziierten Pilz *Alternaria alternata* (SPI-A2) isolierten Tenuazonsäure einen ersten Rückschluss auf deren Struktur zu. Die eindeutige Übereinstimmung der ¹H-NMR-Spektren beider Substanzen konnte dies bestätigen. Für Details zur Identifizierung, Strukturaufklärung und biologischen Aktivität sei auf Abschnitt 3.4.2.A verwiesen.

3.2.3. Inhaltsstoffe aus *Chaetomium globosum* (QEN-2)

Der vorliegende *Chaetomium globosum*-Stamm wurde aus der aus dem Pazifischen Ozean stammenden marinen Rotalge *Gracilaria asiatica* isoliert. Aus diesem Pilz konnte der Sekundärstoff Aureonitol isoliert werden.

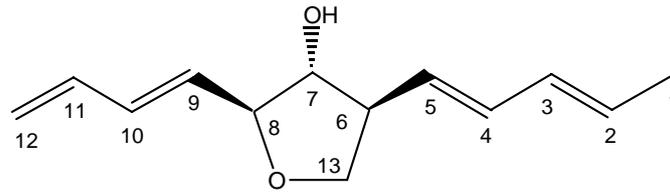
A. Aureonitol

Isoliert wurde die Substanz aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* mittels präparativer HPLC.

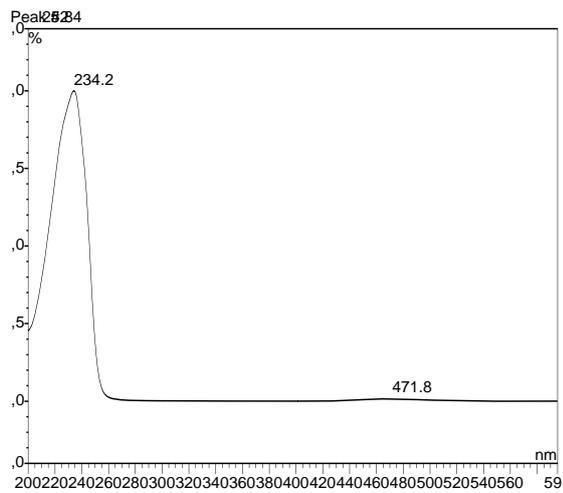
Das Molekulargewicht von 206 amu konnte durch ESI-MS bestimmt werden, das UV-Spektrum wies ein Maximum bei 234 nm auf. Die Struktur dieses Furanderivates ließ sich schließlich mithilfe der ¹H- und H-H-COSY-NMR-Spektren aufklären (Tab.E12).

Das ^1H -NMR-Spektrum wies zunächst 9 Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 5.07 - 6.41 ppm auf, die aufgrund der jeweiligen Kopplungskonstanten konjugierten Doppelbindungssystemen zuzuordnen waren. Das H-H-COSY-Spektrum ließ erkennen, dass es sich um zwei voneinander getrennte Spinsysteme handeln musste. Weiterhin zeigte das ^1H -NMR-Spektrum eine Methylgruppe (H₃-1), die aufgrund zweier benachbarten Protonen (H-2 und 3), die über eine Doppelbindung miteinander verbunden waren, als Doppeldublett erschien und somit am Ende einer der Seitenketten lokalisiert war. H-12 und H-12' markierten das Ende der zweiten Seitenkette, die Kopplungskonstanten zeigten sowohl eine vicinale, wie auch eine geminale Kopplung an, die geminale Kopplung ließ sich auch dem H-H-COSY-Spektrum entnehmen. Fünf weitere Protonen (H-6, 7, 8 und H₂-13) erschienen bei einer chemischen Verschiebung von 2.74 - 4.05 ppm. Dabei waren H-7, H-8 und H₂-13 durch ihre Nähe zu Sauerstoffsubstituenten stark tieffeldverschoben. Mithilfe des H-H-COSY-Spektrums konnten H-6, 7, 8 und H₂-13 schließlich einem hydroxylierten Tetrahydro-Furanring zugeordnet werden, wobei sich der Ringschluss zwischen C-8 und C-13 (über das Heteroatom) aus der Betrachtung des Molekulargewichtes ableiten ließ. Die Position der Verknüpfung des Ringes mit den Seitenketten konnte aus der Korrelation zwischen H-5 und H-6 im H-H-COSY-Spektrum ersehen werden. Die ^1H -NMR-Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten überein, ebenso wie der gemessene Wert der optischen Drehung von $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -8° [Abraham und Arfmann 1992].

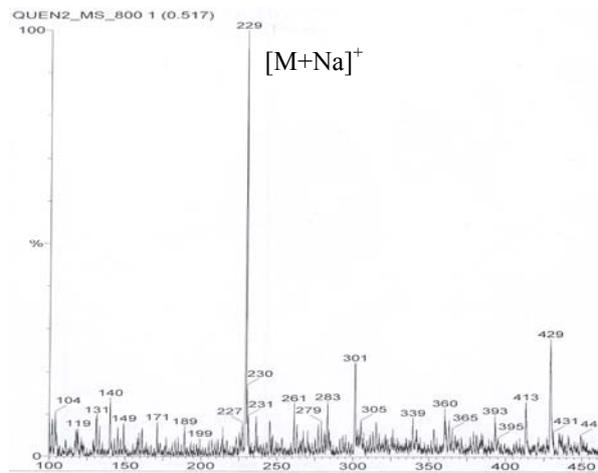
Aureonitol	
Systematischer Name:	2-Buta-1,3-dienyl-4-penta-1,3-dienyl-tetrahydro-furan-3-ol
Probencode:	QEN-2-P22
Quellorganismus:	<i>Chaetomium globosum</i> (aus <i>Gracilaria asiatica</i>)
Substanzmenge:	0.97 mg
Beschreibung:	weißes Pulver
Summenformel:	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Molekulargewicht:	206 g/mol
Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$:	-8° (c = 1.0, CHCl ₃)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	25.9 min



UV-Spektrum



ESI-MS :



Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY
1	1.71 dd (3H, 1.3, 6.9)	
2	5.64 dq (6.9)	
3	6.03 ddq	
4	6.12 dd (15.1)	
5	5.45 dd (8.8)	6
6	2.78 dddd	5, 7, 8
7	3.67 dd (8.2)	6, 8
8	4.03 m	6, 7
9	5.71 dd (6.9)	
10	6.29 dd (10.7)	
11	6.37 ddd	
12	5.25 dd (1.3, 17.0)	12'
12'	5.08 dd (1.9, 10.5)	12
13	AB 4.01-4.05 m	

Tab.E12:

NMR-Daten von Aureonitol, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

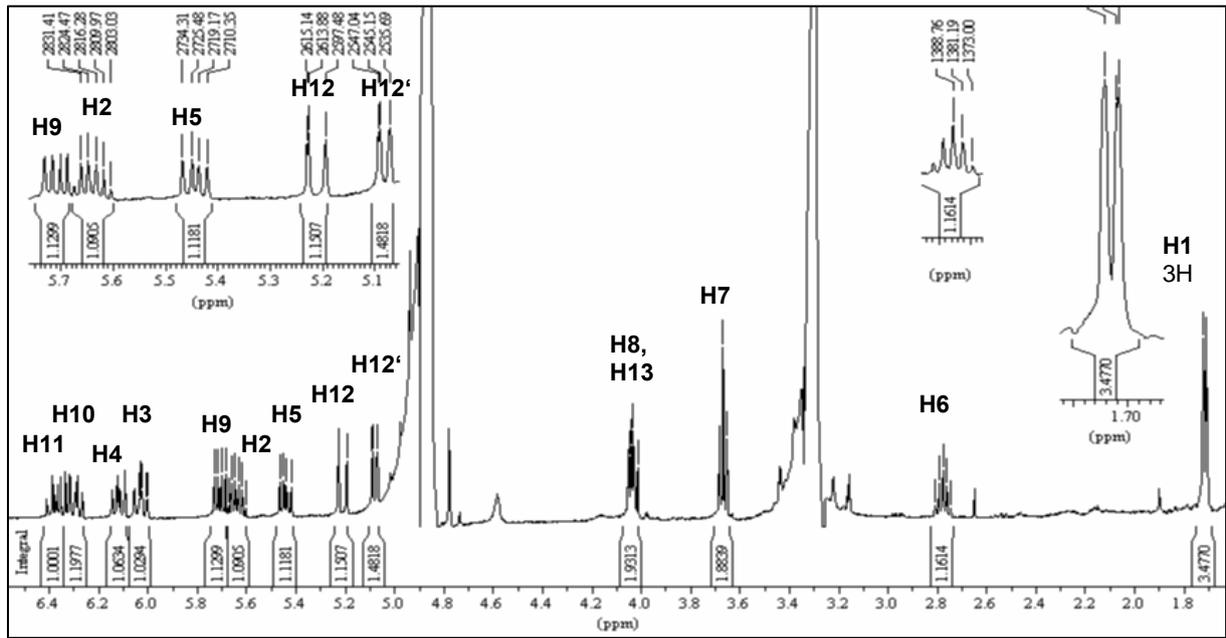


Abb.E28: ^1H -NMR-Spektrum von Aureonitol, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

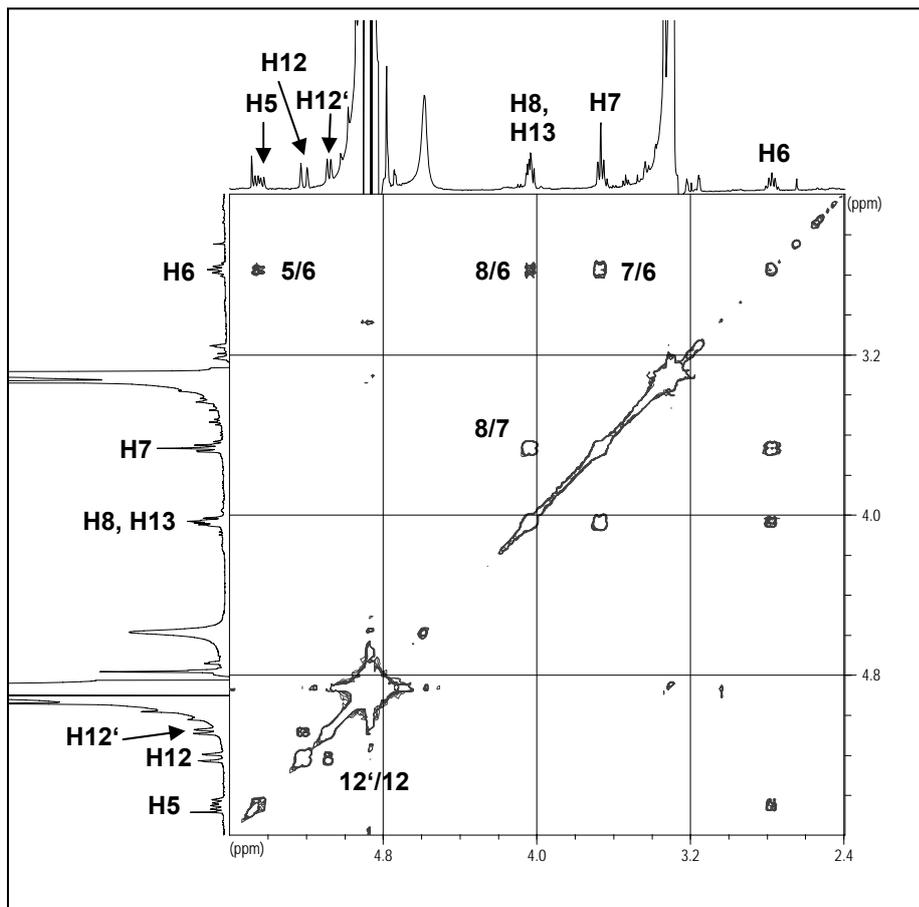


Abb.E29:

H-H-COSY-Spektrum von Aureonitol, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

3.2.4. Inhaltsstoffe aus *Cladosporium* sp. (QEN-6)

Dieser Pilz der Gattung *Cladosporium* wurde aus der Braunalge *Sargassum thunbergii* isoliert. Der Ethylacetatextrakt dieses algenassoziierten Pilzes zeigte eine moderate Aktivität im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die drei biogenetisch miteinander verwandten Verbindungen Viridicatin, Viridicatol und Cyclophenol in diesem Extrakt nachgewiesen werden.

A. Viridicatol

Viridicatol wurde nach vorheriger Fraktionierung mittels einer Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1) durch präparative HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Cladosporium* sp. isoliert. Das Molekulargewicht der Substanz von 253 amu konnte mithilfe der ESI-Massenspektroskopie ermittelt werden, das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 222, 306 und 317 nm.

Die Struktur dieses Chinolinons wurde mittels der ¹H-NMR-, H-H-COSY- und HMBC-Spektren aufgeklärt (Tab.E13). Im ¹H-NMR-Spektrum waren zunächst drei Protonen im tiefen Feld zu erkennen, zwei davon als relativ breite Signale im Bereich von 9.13 - 9.51 ppm, was auf Hydroxylfunktionen hindeutete. Bei dem scharfen Singulett bei 12.19 ppm musste es sich dagegen um eine NH-Gruppe handeln. Acht weitere Protonen konnten bei einer chemischen Verschiebung von 6.70 - 7.32 ppm detektiert werden, es lagen hier also aromatische Systeme vor. Dem H-H-COSY-Spektrum war dann zu entnehmen, dass es sich bei H-2', 4', 5' und 6' um ein ABCD-Spinsystem handelte. C-3' wurde aufgrund einer Korrelation zu C-5' im HMBC-Spektrum ebenfalls diesem Ringsystem zugeordnet. Über die Korrelationen von H-5' zu C-4 und H-2' zu C-4 konnte die Verknüpfung dieses hydroxylierten Benzolringes zu dem Chinolinon-Grundkörper festgelegt werden. H-6 bis H-9 bildeten im H-H-COSY-Spektrum ein weiteres ABCD-Spinsystem, dessen Position zu dem ankondensierten Heterocyclus über die Korrelationen von H-7 und H-9 zu C-5, H-6 und H-9 zu C-10 und H-6 zu C-4 im HMBC-Spektrum bestimmt werden konnte. Aufgrund von Signalüberlappungen, die zu Spinsystemen höherer Ordnung führten, gestaltete sich die Interpretation dieser Struktur als außerordentlich schwierig.

Viridicatol wurde 1953 erstmals isoliert [Cunningham *et al.* 1953], ¹H-NMR-Daten liegen lediglich für 3-O-Methylviridicatin vor [Hodge *et al.* 1988].

Ein weiterer Beweis der Struktur von Viridicatol konnte über die Fragmentierung im EI-Massenspektrum erbracht werden. Es wurden hier die charakteristischen Massenfragmente von m/z 236, 208 und 180 detektiert (Abb.E30) [McCamish *et al.*1970].

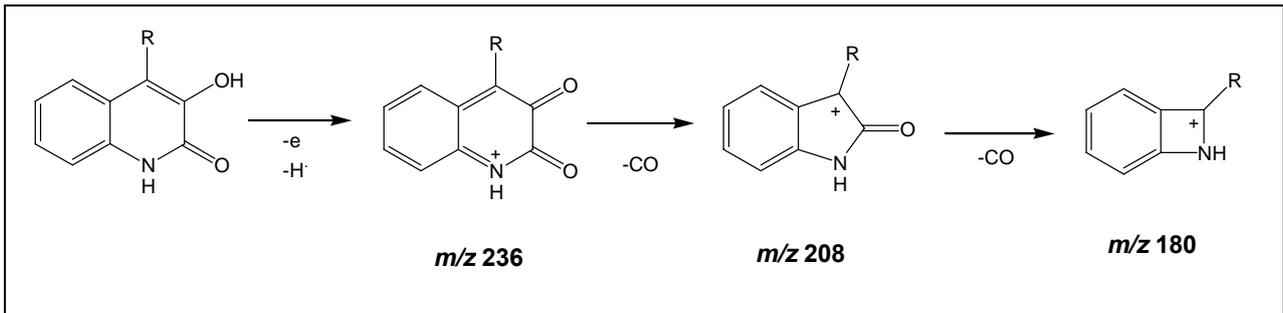
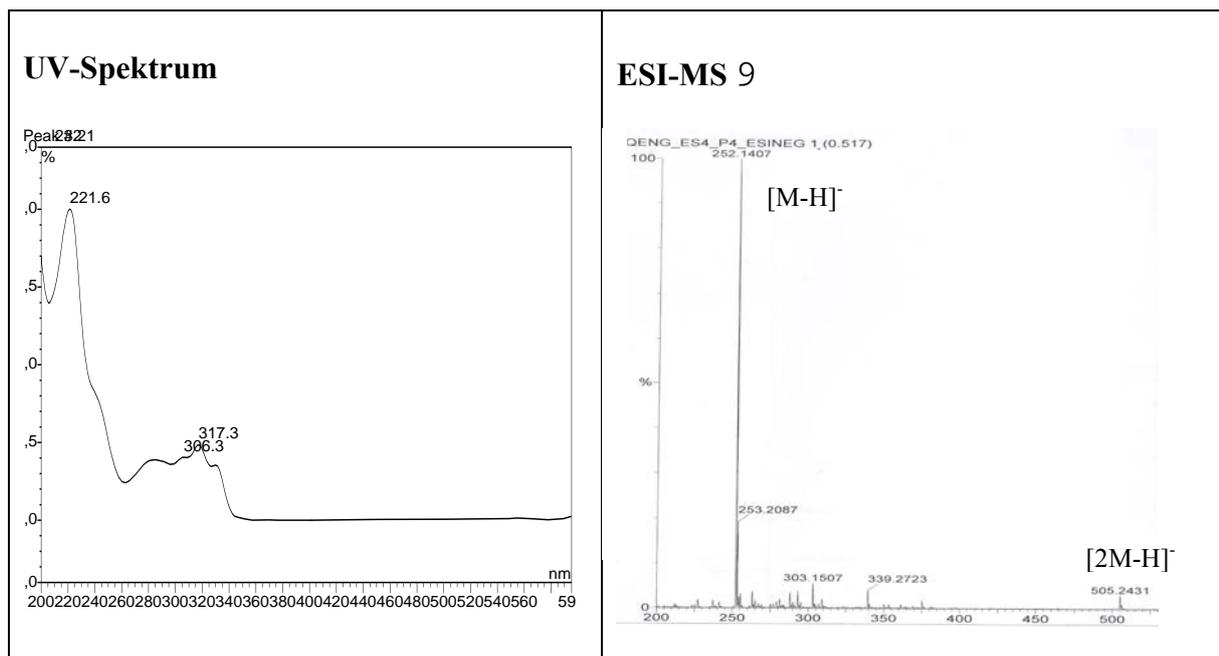


Abb.E30: EI-MS-Fragmentierung von Viridicatol [McCamish *et al.*1970]

Viridicatol	
Systematischer Name:	3-Hydroxy-4-(3-hydroxy-phenyl)-1H-chinolin-2-on
Probencode:	QEN6-S4-P4,5
Quellorganismus:	<i>Cladosporium</i> sp. (aus <i>Sargassum thunbergii</i>)
Substanzmenge:	4.5 mg
Beschreibung:	gelblich-orange, kristallin
Summenformel:	$C_{15}H_{11}NO_3$
Molekulargewicht:	253 g/mol
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	23.1 min
	ESI-MS :



Position	δ_{H} (J Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	H-H-COSY	HMBC
1	12.19 bs			
2				
3	9.13 bs	157.4		
4		124.2		
5		124.2		
6	7.09 m	126.3	7,8	4, 8, 10
7	7.28 m	120.7	6,8,9	5, 7
8	7.07 m	126.3	6,7,9	6, 9
9	7.33 m	115.0	7,8	5, 9, 10
10		133.0		
1'		134.8		
2'	6.72 bs	120.4	4',6'	4, 2', 4', 6'
3'	9.51 bs	157.1		
4'	6.70 bs	116.6	2',5',6'	2', 6'
5'	7.31 m	129.3	4,6	4, 1', 3', 5'
6'	6.81 dq (1.6, 7.3)	114.6	2',4',5'	3, 2', 4'

^a Werte dem HMBC-Spektrum entnommen

Tab.E13: NMR-Daten von Viridicatol, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

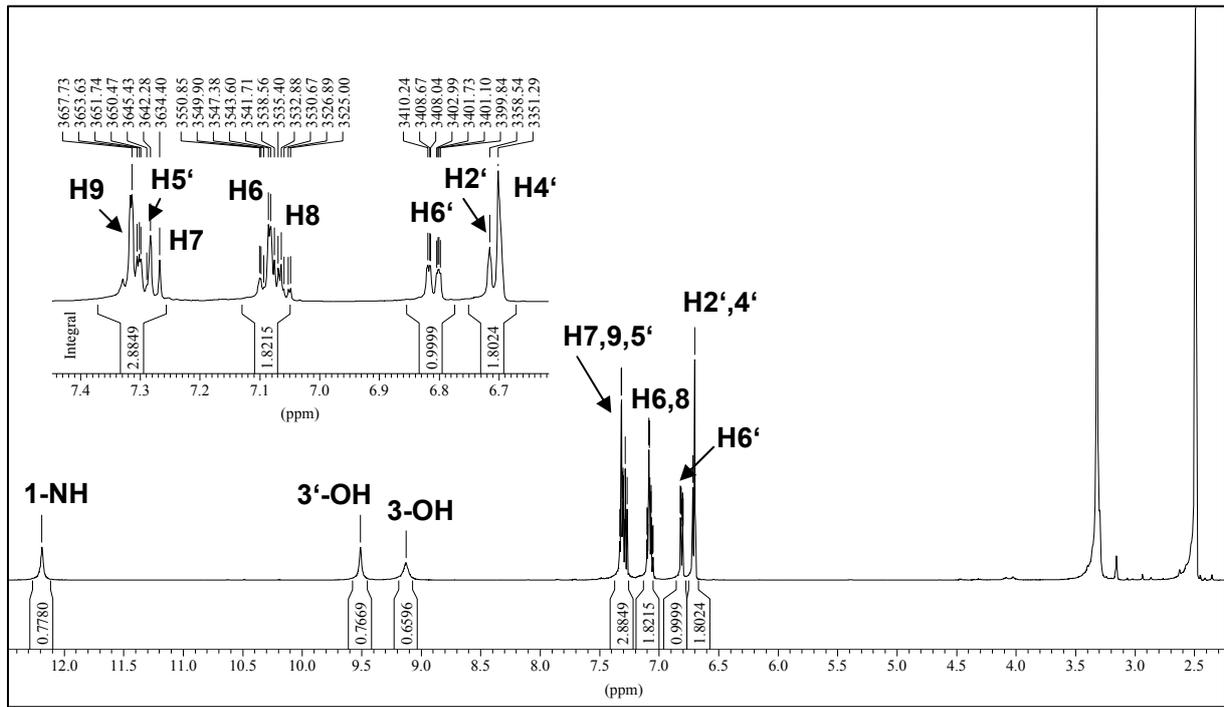


Abb.E31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Viridicatol, gemessen in DMSO-d_6 (500 MHz)

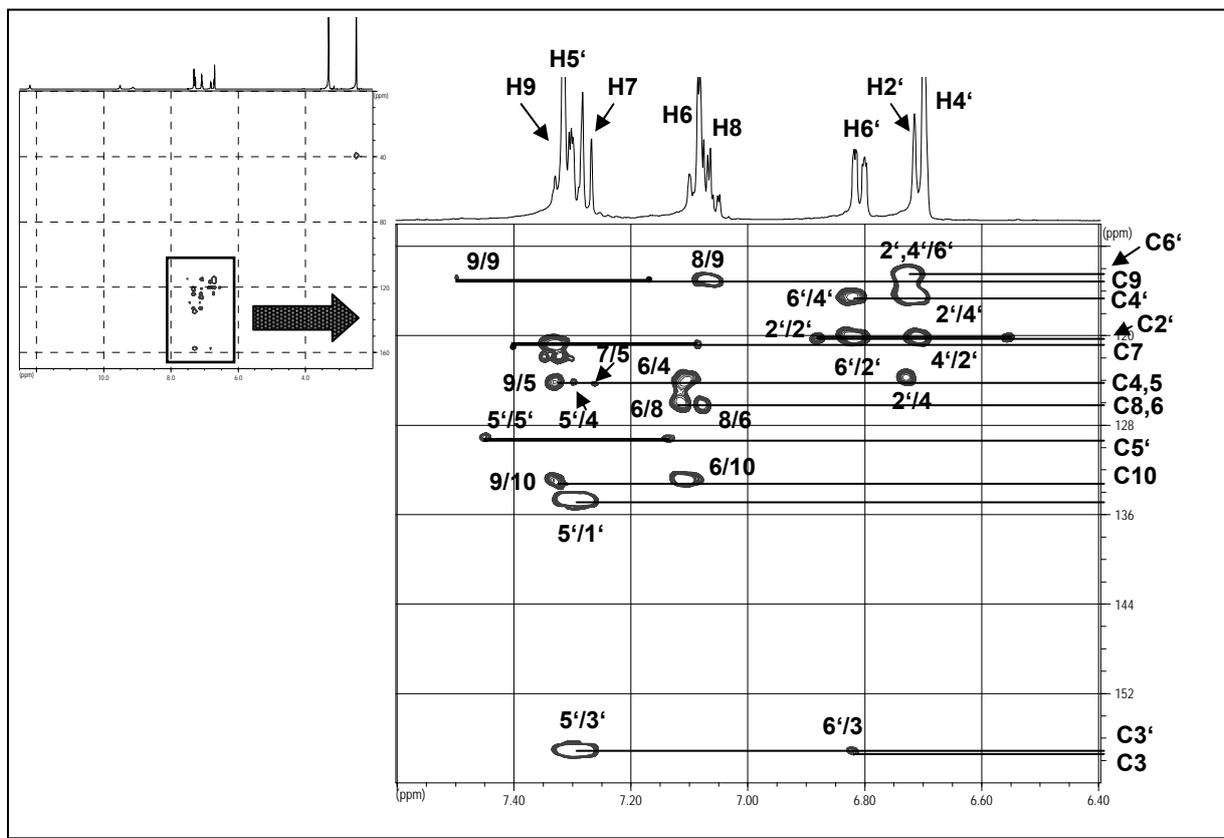


Abb.E32: HMBC-Spektrum von Viridicatol, gemessen in DMSO-d_6 (500 MHz)

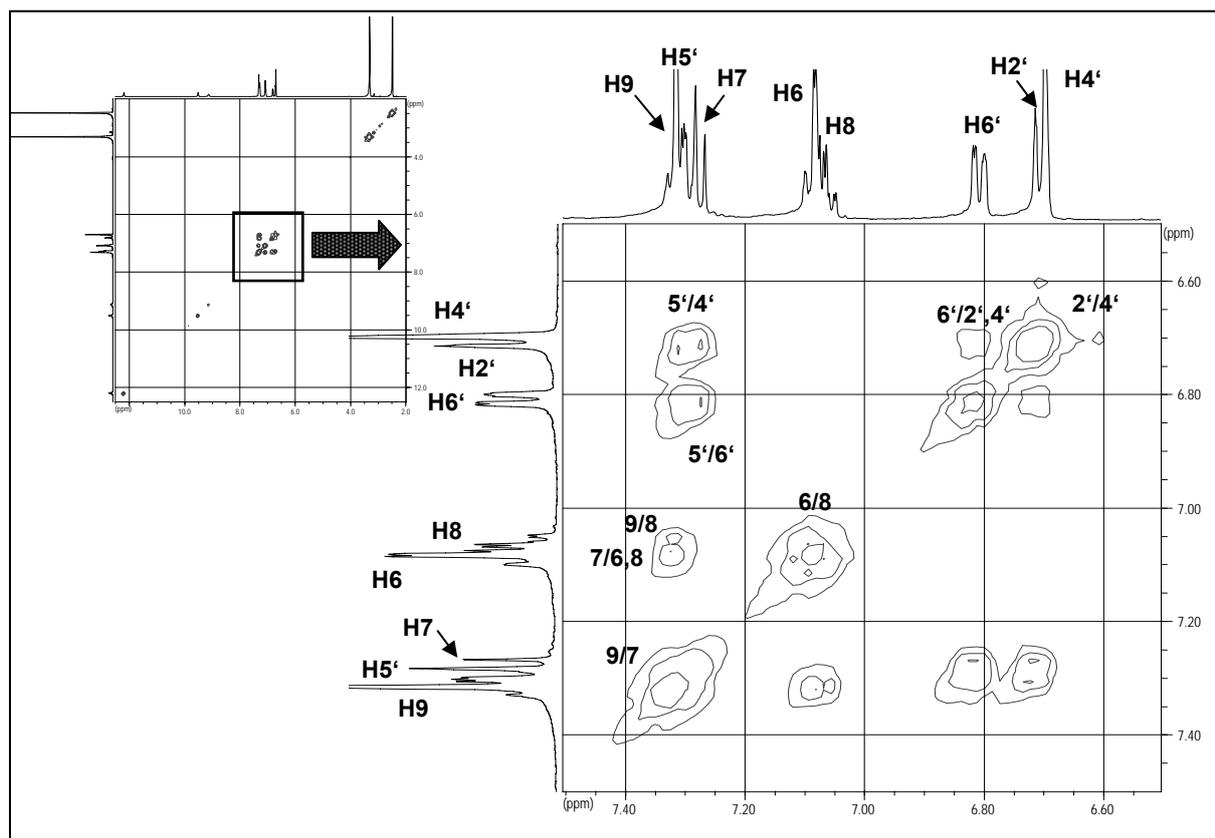


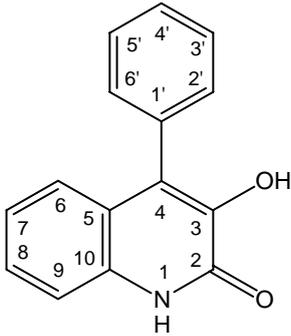
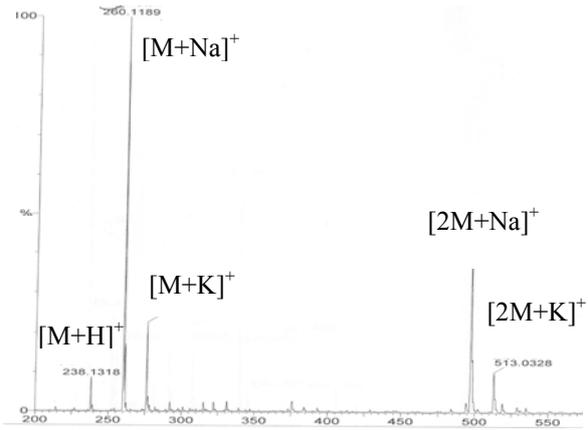
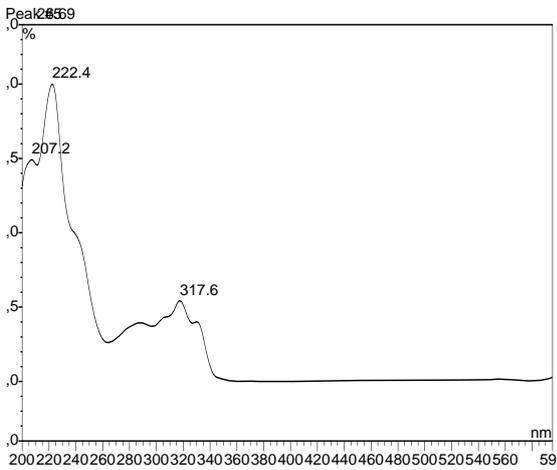
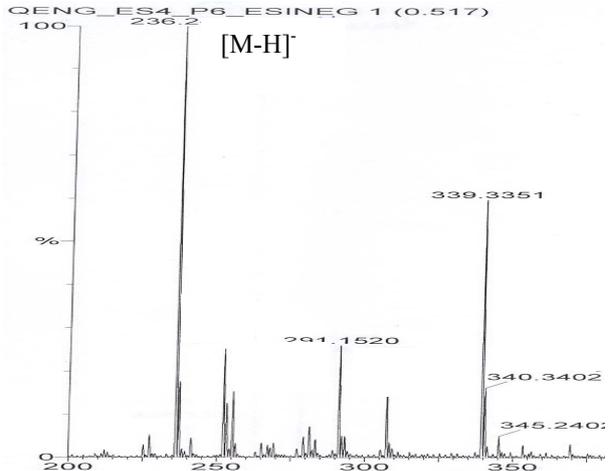
Abb.E33: H-H-COSY-Spektrum von Viridicatol, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

B. Viridicatin

Dieses Chinolinon wurde ebenso wie Viridicatol (siehe oben) mittels präparativer HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Cladosporium* sp. nach vorheriger Fraktionierung durch eine Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1) isoliert.

Die Struktur von Viridicatin konnte durch Vergleich mit Viridicatol bestimmt werden. Das UV-Spektrum der Substanz wies charakteristische Maxima bei 222, 306 und 317 nm auf und war damit nahezu identisch mit dem von Viridicatol. Das Molekulargewicht wurde über ESI-Massenspektrometrie ermittelt und war somit 16 amu niedriger als das des verwandten Chinolinons. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte zwei Protonen im Tieffeld, eine NH-Gruppe (1-NH) bei 12.19 ppm und eine OH-Gruppe (3-OH) bei 9.18 ppm (Tab.E14). Weiterhin waren 9 Protonen mit einer chemischen Verschiebung von 7.03 - 7.54 ppm zu erkennen, die zwei aromatischen Systemen zugeordnet werden konnten. Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren ergab das Vorhandensein eines monosubstituierten Phenylrestes für Viridicatin und somit den Verlust der 3'-Hydroxylierung des Viridicatols für die vorliegende Verbindung.

Die Substanz wurde 1953 erstmals von Cunningham *et al.* 1953 isoliert, $^1\text{H-NMR}$ -Daten liegen lediglich für 3-O-Methylviridicatin vor [Hodge *et al.* 1988].

Viridicatin	
<p>Systematischer Name: 3-Hydroxy-4-phenyl-1H-chinolin-2-on Probencode: QEN6-S4-P6; QEN6-S2-PE Quellorganismus: <i>Cladosporium</i> sp. (aus <i>Sargassum thunbergii</i>) Substanzmenge: 1.1 mg Beschreibung: gelblich-orange, kristallin Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ Molekulargewicht: 237 g/mol Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 26.6 min</p>	
	<p>ESI-MS :</p> 
<p>UV-Spektrum</p> 	<p>ESI-MS 9</p> 

Position	δ_H (J Hz)	Position	δ_H (J Hz)
1	12.19 bs	9	7.41 m
2		10	
3	9.18 bs	1'	
4		2'	7.48-7.54 m ^b
5		3'	7.28-7.31 m ^c
6	7.03-7.07 m ^a	4'	7.03-7.07 m ^a
7	7.32 ddd (1.3, 6.9)	5'	7.28-7.31 m ^c
8	7.03-7.07 m ^a	6'	7.48-7.54 m ^b

Tab.E14:

a,b,c Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

NMR-Daten von Viridicatin, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

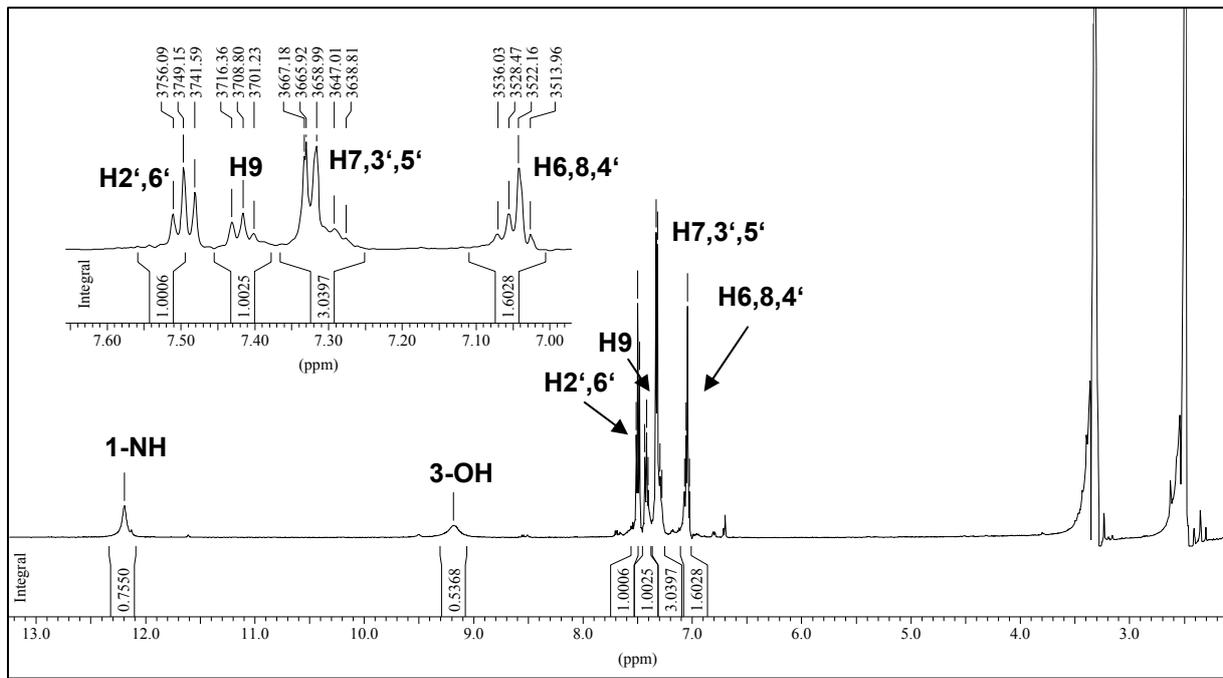


Abb.E34: ¹H-NMR-Spektrum von Viridicatin, gemessen in DMSO-d₆ (500 MHz)

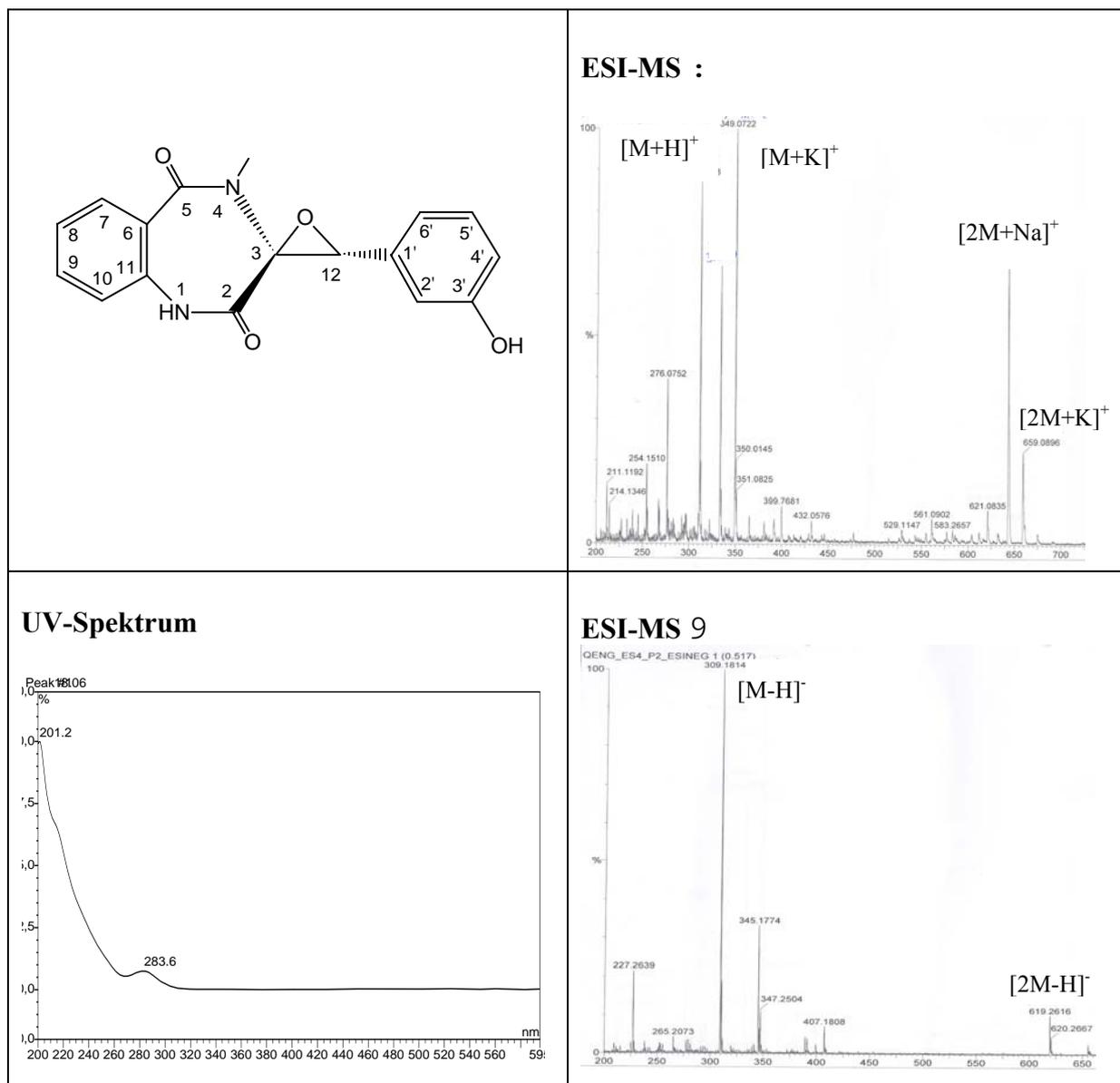
C. Cyclopenol

Die Substanz wurde aus dem Ethylacetatextrakt von *Cladosporium* sp. nach Fraktionierung durch eine Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1) mittels präparativer HPLC isoliert.

Die Struktur dieser Spiroverbindung aus einem Benzodiazepin und einem Oxiran konnte mithilfe von ¹H-NMR und H-H-COSY-Spektroskopie aufgeklärt werden. Das Molekulargewicht von 310 amu wurde anhand des Pseudomolekülionenpeaks im ESI-MS-Spektrum bestimmt.

Im ¹H-NMR-Spektrum konnten zunächst 8 Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 6.10-7.55 ppm detektiert werden, die somit Teil von aromatischen Systemen sein mussten (Tab.E15). Anhand ihrer Kopplungskonstanten und der Korrelationen im H-H-COSY-Spektrum konnten H-2', 4', 5' und 6' einem gemeinsamen ABCD-System zugeordnet werden. Die Hochfeldverschiebung von H-2' und H-4' ließ sich durch ihre Nachbarschaft zu einer Hydroxylgruppe als Substituent erklären. H-7 bis H-10 konnten aufgrund zahlreicher Korrelationen im H-H-COSY-Spektrum einem weiteren Spinsystem, wiederum einem Benzolring mit ABCD-Konstellation, zugeordnet werden. Dabei zeigten H-8, H-9 und H-10 Signalüberlappungen, H-7 war dagegen ins tiefere Feld verschoben. H-12 war Teil eines Oxiranringes, was die chemische Verschiebung von 4.07 ppm bereits vermuten ließ. Weiterhin zeigte das ¹H-NMR-Spektrum eine Methylgruppe, die aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung (3.20 ppm) an ein Heteroatom gebunden sein musste und als N-CH₃-Gruppe identifiziert werden konnte. Sämtliche Daten zeigen Übereinstimmung mit den in der Literatur für Cyclopenol angegebenen Werten [Hodge *et al.*1988]. Die Substanz weist drei Stereozentren auf, der Wert für die optische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20}$: -311° und ist damit mit dem in der Literatur angegebenen Wert von -309° vergleichbar [DNP 2004].

Cyclopenol	
Systematischer Name:	4-Methyl-3'-phenylspiro[3 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-3,2'-oxiran]-2,5(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i>)-dion
Probencode:	QEN6-S4-P2; QEN6-S2-PF
Quellorganismus:	<i>Cladosporium</i> sp. (aus <i>Sargassum thunbergii</i>)
Substanzmenge:	0.8 mg
Beschreibung:	braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄
Molekulargewicht:	310 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	-311° (c = 1.3, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	17.9 min



Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY	Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY
1			9	7.14-7.16 m ^a	7
2			10	7.14-7.16 m ^a	7
3			11		
4			12	4.07 s	
4-N-CH ₃	3.20 s (3H)		1'		
5			2'	6.14 t (1.9)	6'
6			3'		
7	7.55 m	8, 9, 10	4'	6.10 bd (7.6)	5'
8	7.14-7.16 m ^a	7	5'	7.00 t (7.9)	4', 6'
			6'	6.69 ddd (1.0, 2.5, 8.2)	2', 5'

^a Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

Tab.E15: NMR-Daten von Cyclophenol gemessen in CD₃OD (500 MHz)

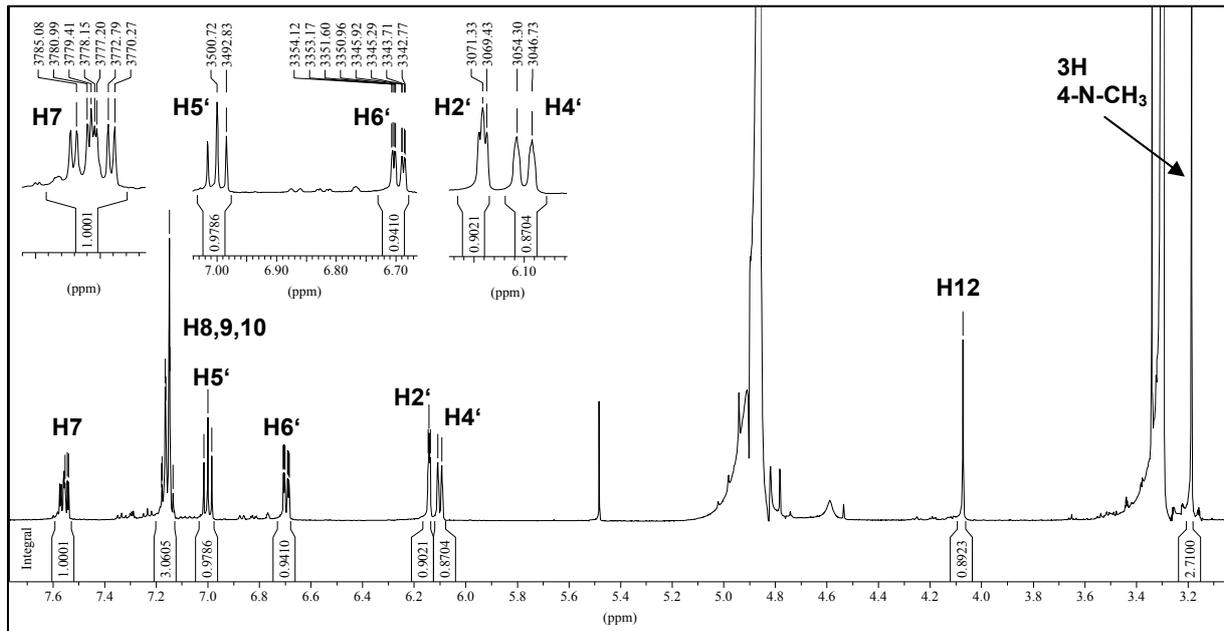


Abb.E35: ¹H-NMR-Spektrum von Cyclopenol, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

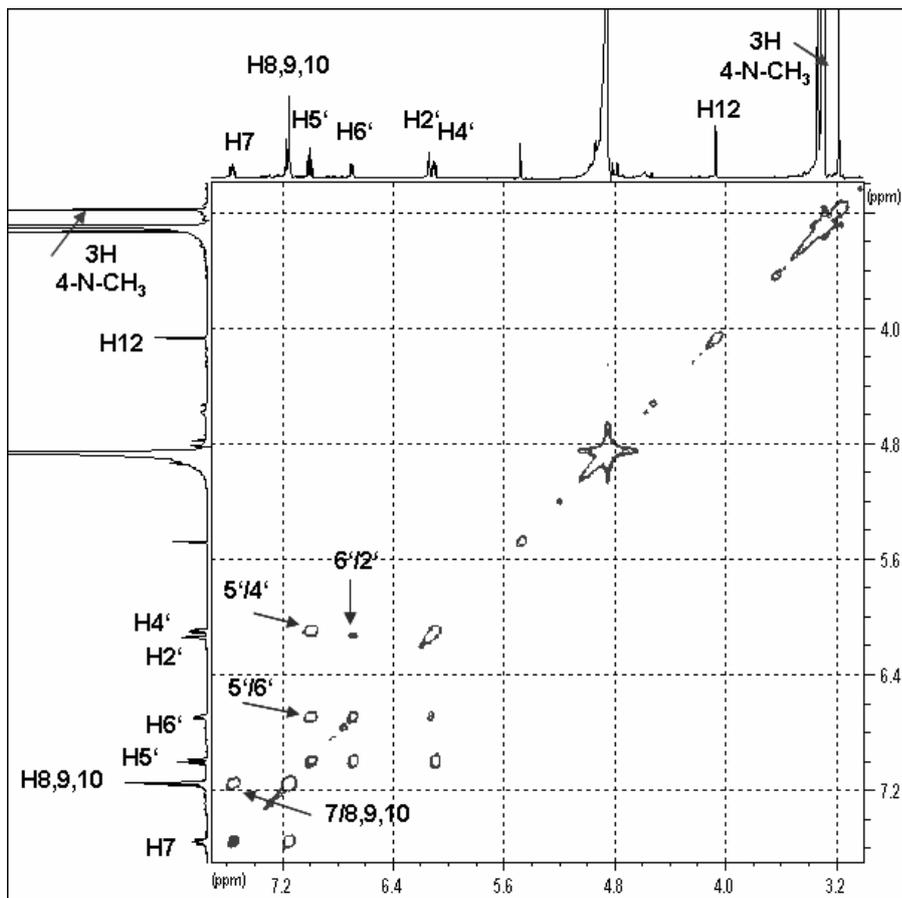


Abb.E36:

H-H-COSY-Spektrum von Cyclopenol, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

3.2.5. Inhaltsstoffe aus *Chaetomium globosum* (QEN-11)

Der hier vorliegende marine Pilz war assoziiert mit der Rotalge *Polysiphonia arceslate*. Der Ethylacetatextrakt der Substanz zeigte eine starke fungizide Aktivität im Biotest gegenüber den Testorganismen *Cladosporium herbarum* und *Cladosporium cucumerinum*, sowie eine moderate Aktivität im „Brine Shrimp Assay“ bei einer Konzentration von 200 µg/ml. Aus diesem Extrakt konnten die Naturstoffe Neoechinulin A, Cladosporin und vier weitere Derivate von Cladosporin isoliert werden.

A. Neoechinulin A

Isoliert wurde das Diketopiperazin aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* mittels präparativer HPLC nach vorheriger Fraktionierung durch eine Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1). Die Struktur konnte neben Bestimmung des Molekulargewichtes von 323 amu über ESI-MS mithilfe des ¹H-NMR-Spektrums aufgeklärt werden. Das UV-Spektrum zeigte charakteristische Maxima bei 224, 282 und 339 nm. Das ¹H-NMR-Spektrum wies zunächst vier Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 7.07 - 7.41 ppm auf, bedingt durch ihre Zugehörigkeit zu einem aromatischen Ring (H-4 bis H-7). Ihre Kopplungskonstanten ließen auf ihre Zuordnung innerhalb des Ringes und das Vorliegen eines ABCD-Systems schließen. H-16 und H₂-17 konnten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von 5.07 - 6.13 ppm sowie anhand der Kopplungskonstanten einer gemeinsamen Doppelbindung zugeordnet werden (Tab.E16). Die Kopplungskonstante zwischen H-16 und H-17A (10.7 Hz) ließ auf eine *cis*-Konfiguration der beiden Protonen zueinander schließen. H-17B hingegen war zu H16 *trans*-angeordnet, was die Kopplungskonstante von 17.7 Hz belegte. Bestätigt wurde die Konstellation dieser Doppelbindung außerdem durch die geminale Kopplung von 1.3 Hz zwischen H-17A und H-17B. Weiterhin im Spektrum erkennbar war das Vorhandensein von drei Methylgruppen, deren chemische Verschiebung keine direkte Nachbarschaft zu einem Heteroatom vermuten ließ. 12-CH₃ musste aufgrund seiner Erscheinung als Dublett einem weiteren Proton benachbart sein, welches aufgrund der gemeinsamen Kopplungskonstante von 6.9 Hz als H-12 identifiziert werden konnte.

Die ¹H-NMR-Daten zeigten Übereinstimmung mit den Literaturwerten [Marchelli *et al.* 1977]. Der Wert der optischen Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: -49° konnte die Stereochemie an dem chiralen Zentrum an Position 12 festlegen.

Neoechinulin A

Systematischer Name: 3-[2-(1,1-Dimethyl-allyl)-1H-indol-3-ylmetylen]-6-methyl-piperazin-2,5-dion

Probencode: QEN11-S3-P11

Quellorganismus: *Chaetomium globosum* (aus *Polysiphonia arceslate*)

Substanzmenge: 2.47 mg

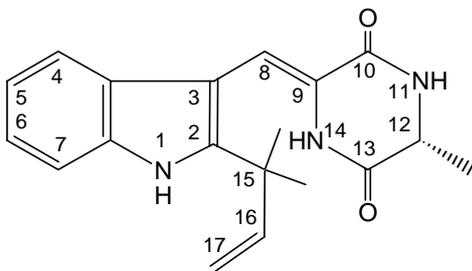
Beschreibung: braun, kristallin

Summenformel: C₁₉H₂₁N₃O₂

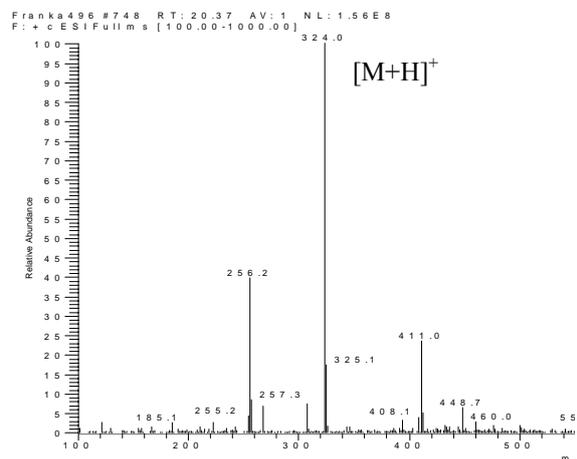
Molekulargewicht: 323 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: -49° (c=0.1, MeOH)

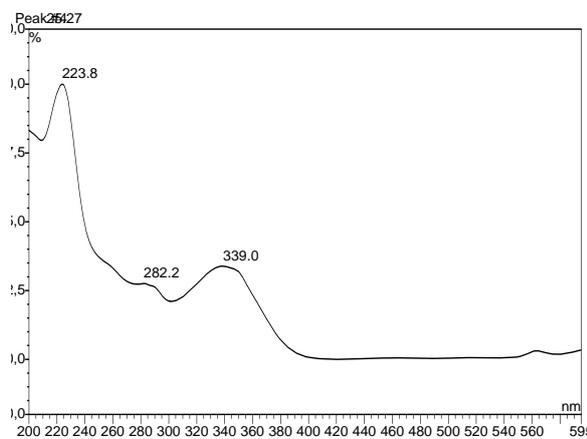
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 25.3 min



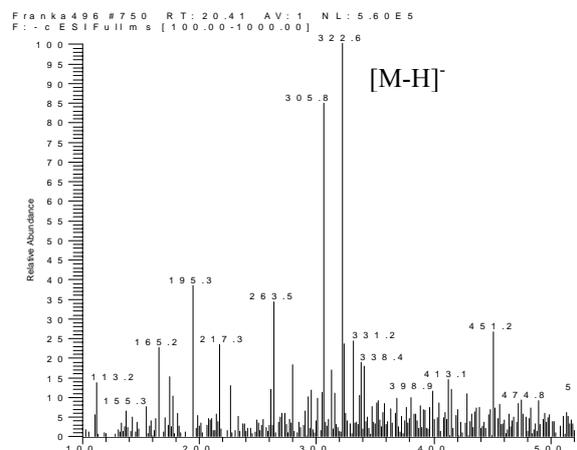
ESI-MS :



UV-Spektrum



ESI-MS 9



Position	δ_H (J Hz)	Position	δ_H (J Hz)
1		11	
2		12	4.23 q (6.9)
3		12-CH ₃	1.52 d (3H, 6.9)
4	7.24 bd (7.6)	13	
5	7.13 dt (1.3, 8.2)	14	
6	7.07 dt (1.3, 7.6)	15	
7	7.41 bd (8.2)	15-CH ₃	1.54 s, 1.56 s (6H)
8	7.20 s	16	6.10 dd (10.7, 17.7)
9		17	A 5.11 dd (1.3, 10.7) B 5.09 dd (1.3, 17.7)
10			

Tab.E16: NMR-Daten von Neoechinulin A, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

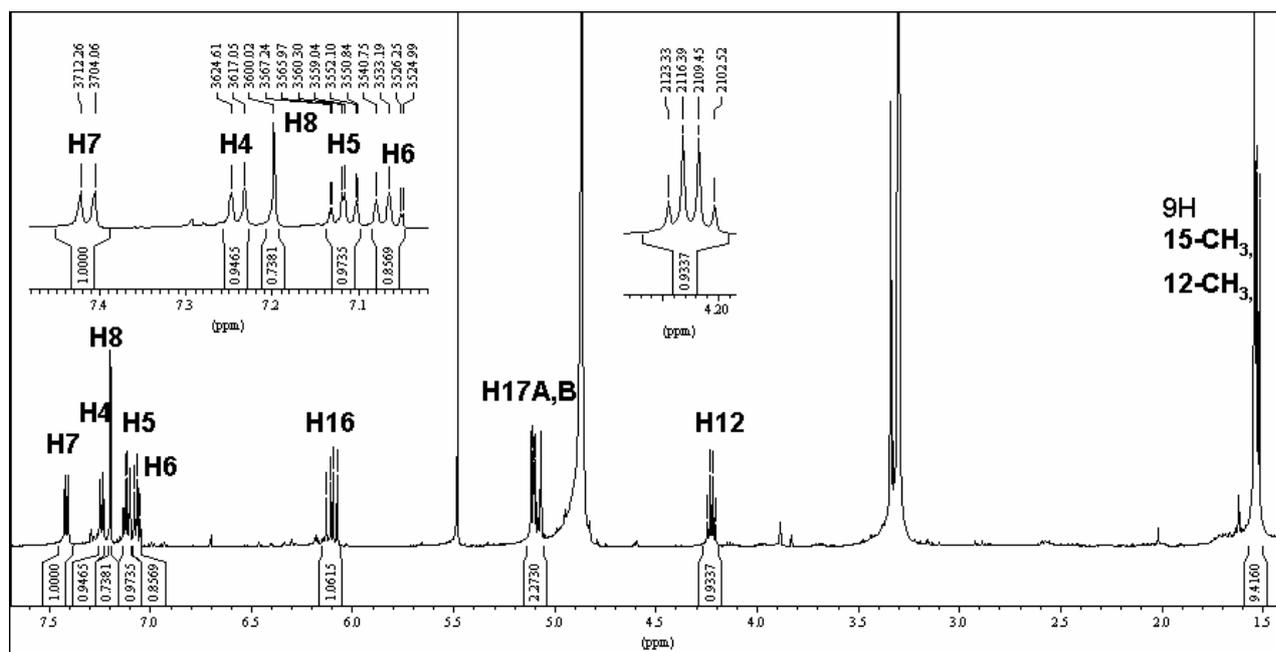


Abb.E37: ¹H-NMR-Spektrum von Neoechinulin A, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

B. Cladosporin (Asperentin)

Die Substanz wurde aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* mithilfe der präparativen HPLC nach vorheriger Fraktionierung durch eine Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1) isoliert.

Das Molekulargewicht von 292 amu konnte durch ESI-MS anhand eines deutlichen Pseudomolekülionpeaks festgelegt werden. Das UV-Spektrum zeigt drei Maxima bei 215, 268 und 299 nm. Die Struktur der Substanz ließ sich mithilfe der ¹H-NMR-, HMBC- und H-H-COSY-Spektren festlegen (Tab.E17).

Das ¹H-NMR-Spektrum wies zunächst zwei aromatische, *meta*-koppelnde Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 6.19 bzw. 6.21 ppm auf. Das in DMSO gemessene ¹H-NMR-Spektrum zeigte zusätzlich eine Hydroxylgruppe bei 11.07 ppm (8-OH), die aufgrund der Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung mit der Ketogruppe an Position 1 stark ins Tieffeld verschoben war. Weiterhin ließ das ¹H-NMR-Spektrum auf das Vorhandensein einer Methylgruppe sowie von 12 aliphatischen Protonen schließen. H-3, 10 und 14 waren dabei tieffeldverschoben, was durch ihre Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen begründet werden konnte. Aus Korrelationen von H₂-4 zu C-4a, 5 und 8a des Benzolringes im HMBC-Spektrum war die Verknüpfung der Protonen mit dem aromatischen System zu entnehmen. H₂-4 zeigte weiterhin Korrelationen zu C-3 und C-9, worüber sich die Natur der Verknüpfung zu einem weiteren aliphatischen Spinsystem über eine CH₂-Brücke belegen ließ. H-9A zeigte Korrelationen zu C-10 und 11 im HMBC- und H-10 im H-H-COSY-Spektrum, während H-11B wiederum mit C-12 und 13 korrelierte, so dass daraus die Positionen innerhalb dieses aliphatischen Spinsystems geschlossen werden konnten. Durch die Korrelation von H₃-15 zu H-14 im H-H-COSY- und die Korrelation zu C-13 im HMBC-Spektrum wurde die Anordnung der Methylgruppe festgelegt. Die Position des Heteroatoms im Ring ließ sich durch die chemischen Verschiebungen der benachbarten Kohlenstoffatome C-10 und C-14 bestimmen (jeweils 67.4 ppm). Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur für Cladosporin angegebenen Werten [Fujimoto *et al.* 1999; Jacyno *et al.* 1993].

Das Molekül besitzt drei Stereozentren an den Positionen 3, 10 und 14, die optische Drehung wurde mit $[\alpha]_D^{20}$: -25° bestimmt und stimmt damit mit dem Literaturwert von -24.8° überein [Fujimoto *et al.* 1999].

Cladosporin (Asperentin)

Systematischer Name: 6,8-Dihydroxy-3-(6-methyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl)-isochroman-1-on

Probencode: QEN11-S3-P12

Quellorganismus: *Chaetomium globosum* (aus *Polysiphonia arceslate*)

Substanzmenge: 8.8 mg

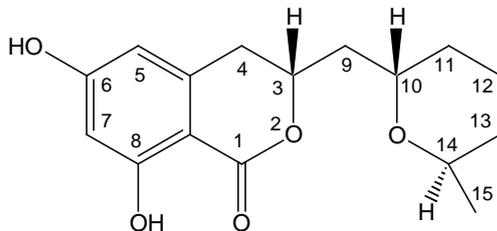
Beschreibung: orange-braun, kristallin

Summenformel: C₁₆H₂₀O₅

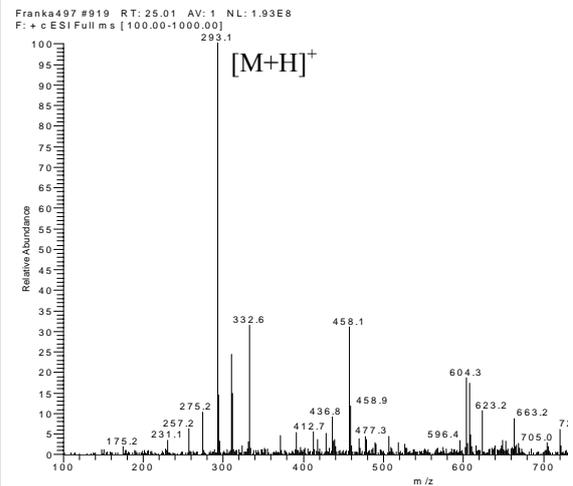
Molekulargewicht: 292 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: -25° (c = 0.96, EtOH)

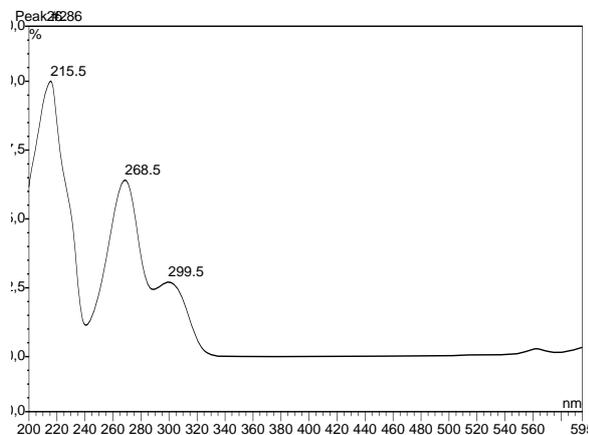
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 26.9 min



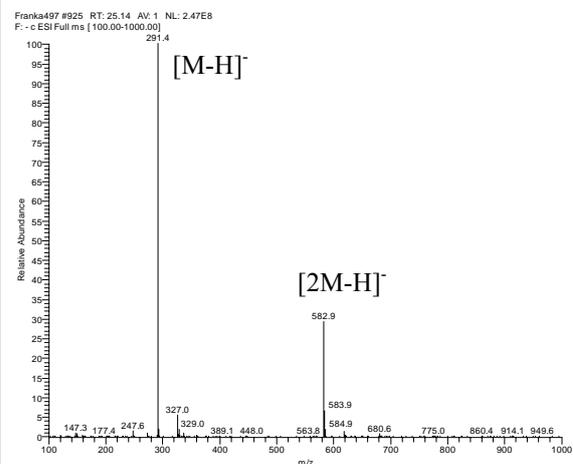
ESI-MS :



UV-Spektrum



ESI-MS 9



Position	δ_{H} (J Hz) ^c	δ_{H} (J Hz) ^d	δ_{C} ^{a,c}	H-H-COSY ^c	HMBC ^c
1					
2					
3	4.65 m	4.60 m	77.2	4, 9A, 9B	4a
4	AB 2.84-2.94 m	2.81-2.96 m	33.3	3, 5	3, 4a, 5, 8a, 9
4a			142.8		
5	6.19 d (2.2)	6.16 d (1.9)	107.1	4, 7	4, 6, 7, 8
6			165.4		
7	6.21 d (2.2)	6.21 bs	101.0	5	5, 6, 8
8		11.07 s	165.4		
8a			101.0		
9	A 2.12 ddd (3.5, 10.0, 14.5) B 1.77 m	2.06 m 1.69 m	37.8	3, 9B, 10 3, 9A, 10	4, 10, 11 3, 4
10	4.12 m	3.95 m	67.4	9A, 9B, 11B	12
11	A 1.65-1.79 m ^b B 1.38 m	1.55-1.63 m ^b 1.28 m	30.4	10	12, 13
12	A 1.65-1.79 m ^b B 1.65-1.79 m ^b	1.55-1.63 m ^b 1.55-1.63 m ^b	17.3		
13	A 1.65-1.79 m ^b B 1.32 m	1.55-1.63 m ^b 1.20 m	31.7	14	11, 12
14	3.91 m	3.80 m	67.4	12, 13, 15	12
15	1.17 d (3H, 6.6)	1.08 d (3H, 6.3)	18.6	14	13

^a Werte aus dem HMBC entnommen

^b Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

^c Werte gemessen in CD₃OD (500 MHz)

^d Werte gemessen in DMSO (500 MHz)

Tab.E17: NMR-Daten von Cladosporin (Asperentin)

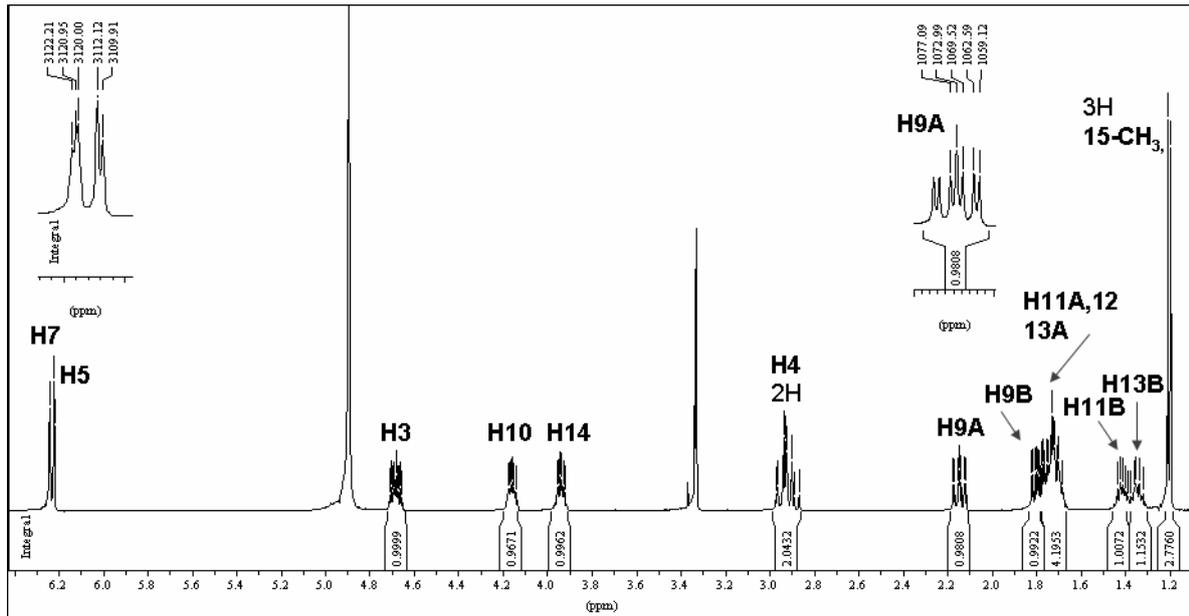


Abb.E38: ^1H -NMR-Spektrum von Cladosporin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

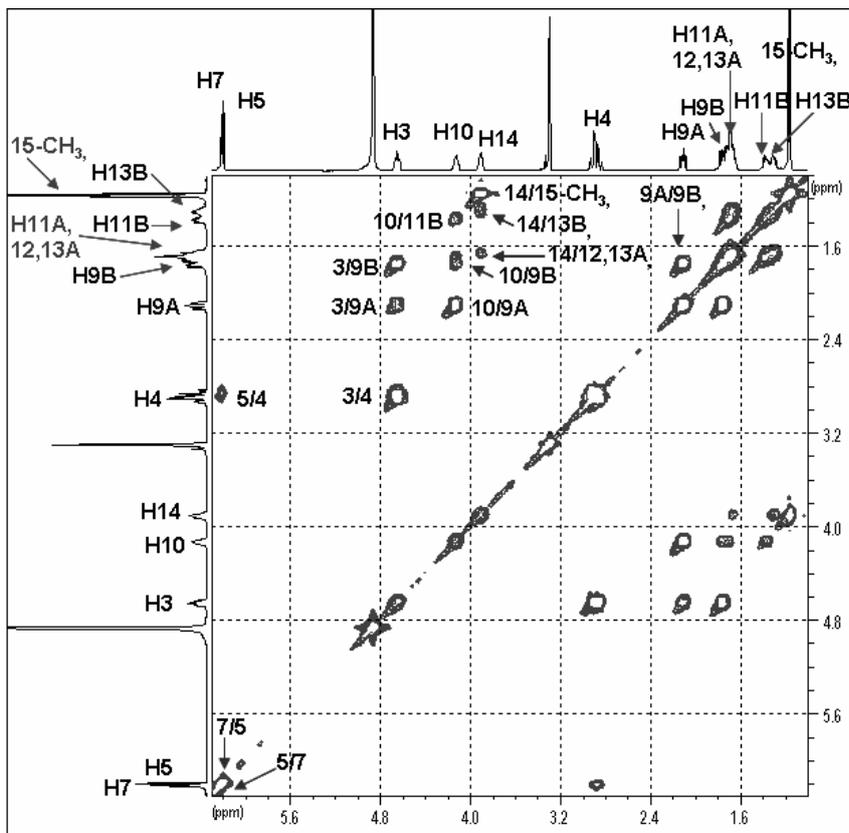


Abb.E39:

H-H-COSY-Spektrum von Cladosporin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

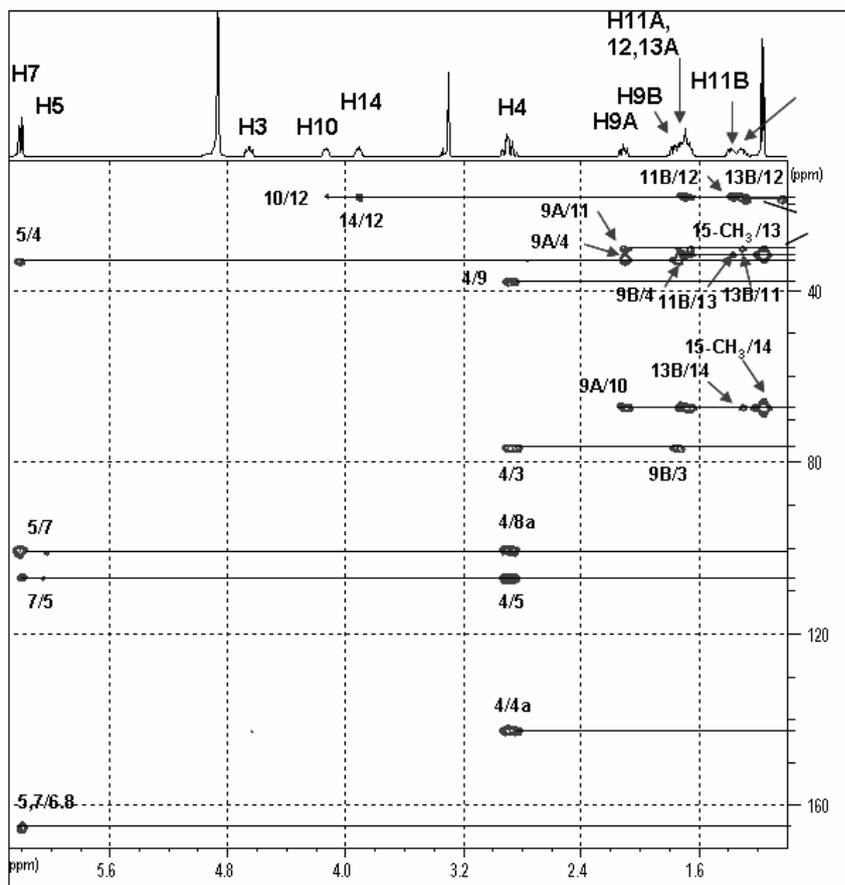


Abb.E40:

HMBC-Spektrum von Cladosporin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

C. 5'-Hydroxyasperentin-8-methylether

Dieses Cladosporin-Derivat wurde ebenso aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* mittels präparativer HPLC nach vorheriger Fraktionierung durch eine Sephadexsäule ($\text{DCM}:\text{CH}_3\text{OH}$; 1:1) isoliert.

Die Struktur des Moleküls konnte neben Bestimmung des Molekulargewichtes von 322 amu durch ESI-MS mithilfe von ^1H -NMR- und H-H-COSY-Spektren festgelegt werden (Tab.E18). Die Substanz wies damit eine Massendifferenz von 30 amu gegenüber Cladosporin (siehe oben) auf, das UV-Spektrum war praktisch identisch mit dem von Cladosporin. Die NMR-Spektren zeigten weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen sowie Korrelationen mit den für Cladosporin gemessenen und unter 3.2.5.B beschriebenen. Lediglich an Position 8 befand sich anstelle der für Cladosporin beschriebenen Hydroxylgruppe eine Methoxygruppe, was durch das Fehlen des Signals für 8-OH bestätigt werden konnte. An Position 13 befand sich eine weitere Hydroxylgruppe, was sich aufgrund der veränderten chemischen Verschiebung von H_2 -12 sowie der veränderten Signalaufspaltungen in diesem Spinsystem gegenüber Cladosporin erkennen ließ.

5'-Hydroxyasperentin-8-methylether

Systematischer Name: 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl)-8-methoxy-isochroman-1-on

Probencode: QEN11-S3-P6

Quellorganismus: *Chaetomium globosum* (aus *Polysiphonia arceslate*)

Substanzmenge: 1.9 mg

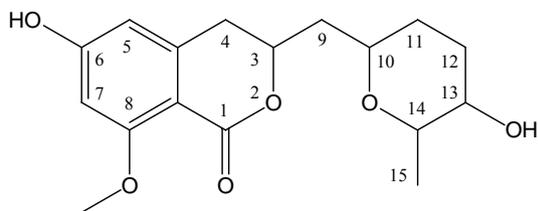
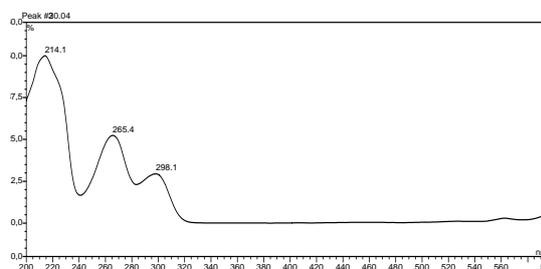
Beschreibung: orange-braun, kristallin

Summenformel: C₁₇H₂₂O₆

Molekulargewicht: 322 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: liegt nicht vor

Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 19.9 min

**UV-Spektrum**

Position	δ_H (J Hz) ^b	δ_H (J Hz) ^c	H-H-COSY ^b
1			
2			
3	4.50 m	4.32 m	4
4	AB 2.81-2.83 m	2.66-2.80 m	3, 5
4a			
5	6.26 d (2.2)	6.18 bs	4, 7
6			
7	6.38 d (2.2)	6.30 bs	5
8			
8a			
8-OCH ₃	3.83 s (3H)	3.71 s (3H)	
9	AB 1.70-1.89 m ^a	1.61-1.74 m ^a	
10	3.95 m	3.82 m	11B, 14, 15
11	A 1.70-1.89 m ^a B 1.32 m	1.61-1.74 m ^a 1.55 m	10
12	AB 1.70-1.89 m ^a	1.61-1.74 m ^a	
13	ca. 3.3	ca. 3.3	

14	3.69 m	3.53 m	10
15	1.19 d (3H, 6.6)	1.06 d (3H, 6.6)	10

^a Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

^b Werte gemessen in CD₃OD (500 MHz)

^c Werte gemessen in DMSO (500 MHz)

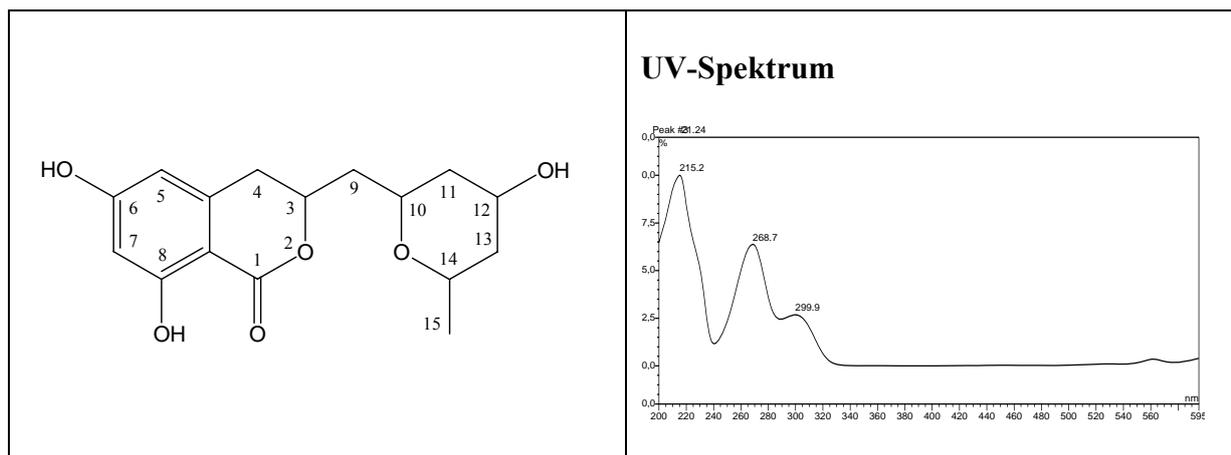
Tab.E18: NMR-Daten von 5'-Hydroxyasperentin-8-methylether

D. 4'-Hydroxyasperentin

4'-Hydroxyasperentin wurde ebenso wie die anderen Cladosporin-Derivate aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* isoliert.

Das Molekulargewicht von 4'-Hydroxyasperentin konnte durch ESI-Massenspektrometrie ermittelt werden und betrug 308 amu. Es unterschied sich damit um 16 amu gegenüber Cladosporin, das UV-Spektrum war dagegen praktisch identisch. Die Struktur der Verbindung konnte mithilfe von ¹H-NMR- und H-H-COSY-Spektroskopie aufgeklärt werden (Tab.E19). Die NMR-Daten zeigten weitgehende Übereinstimmung sowohl in den chemischen Verschiebungen wie auch den Korrelationen mit den für Cladosporin (3.2.5.B) ermittelten. Abweichend konnte an Position 12 eine weitere Hydroxylgruppe beobachtet werden, was sich aufgrund der veränderten chemischen Verschiebungen von H-11A und B, H-12 und H-13A und B sowie der veränderten Signalaufspaltungen in diesem Spinsystem gegenüber Cladosporin erkennen ließ.

4'-Hydroxyasperentin	
Systematischer Name:	6,8-Dihydroxy-3-(4-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl)-isochroman-1-on
Probencode:	QEN11-S3-P7
Quellorganismus:	<i>Chaetomium globosum</i> (aus <i>Polysiphonia arceslate</i>)
Substanzmenge:	3.0 mg
Beschreibung:	orange-braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₆ H ₂₀ O ₆
Molekulargewicht:	308 g/mol
Drehwert [α]_D²⁰:	liegt nicht vor
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	21.2 min



Position	δ_H (J Hz) ^d	δ_H (J Hz) ^e	H-H-COSY ^d
1			
2			
3	4.61 m	4.55 m	4, 9A, 9B
4	AB 2.89-2.94 m	2.81-2.95 m	3
4a			
5^a	6.18 d (2.2)	6.15 bs	4, 7
6			
7^a	6.20 bs	6.20 bs	5
8		11.06 s	
8a			
9	A 2.29 ddd (3.5, 11.0) B 1.74-1.80 m ^b	2.20 m 1.43 m	3, 9B, 10 3, 9A, 10
10	4.38 m	4.17 m	9, 11
11	A 1.74-1.80 m ^b B 1.62 m	1.64-1.70 m ^c 1.00 dd (10.7, 12.0)	9, 10 10, 14, 13B
12	3.77 m	3.65 m	13B, 15
13	A 1.92 m B 1.82 m	1.77 bd (12.9) 1.64-1.70 m ^c	12, 14, 15 11, 14
14	3.93 m	3.76 m	11, 13, 15
15	1.16 d (3H, 6.0)	1.06 d (3H, 6.0)	12, 13, 14

^a Signale austauschbar

^{b,c} Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

^d Werte gemessen in CD₃OD (500 MHz)

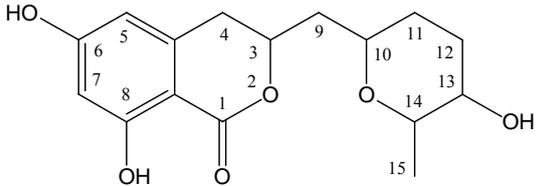
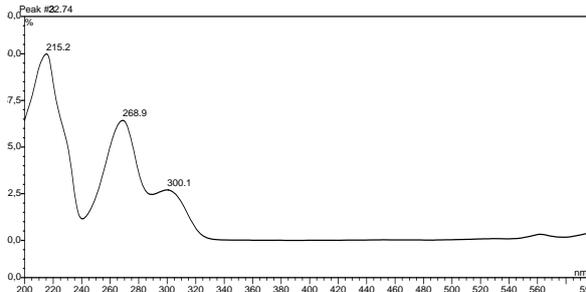
^e Werte gemessen in DMSO (500 MHz)

Tab.E19: NMR-Daten von 4'-Hydroxyasperentin

E. 5'-Hydroxyasperentin

Die Substanz stammt aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum*, aus dem sie mittels präparativer HPLC nach vorheriger Fraktionierung durch eine Sephadexsäule (DCM:CH₃OH; 1:1) isoliert wurde.

Die Struktur konnte neben Bestimmung des Molekulargewichtes von 308 amu durch ESI-MS mithilfe von ¹H-NMR- und H-H-COSY- und HMBC-Spektren festgelegt werden (Tab.E20) 5'-Hydroxyasperentin weist damit eine Massendifferenz von 16 amu gegenüber Cladosporin auf. Das UV-Spektrum ist nahezu identisch mit dem von Cladosporin, die NMR-Spektren zeigten weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen sowie Korrelationen mit den für Cladosporin gemessenen (3.2.5.B). Abweichend von Cladosporin befindet sich an Position 13 eine weitere Hydroxylgruppe, was die chemische Verschiebung des zugehörigen C-Atoms C-13 ins Tieffeld (65.7 ppm) bewirkte, die dem HMBC-Spektrum entnommen werden konnte. Für die optische Drehung wurde ein Wert von $[\alpha]_D^{20}$: -30° ermittelt.

5'-Hydroxyasperentin	
Systematischer Name:	6,8-Dihydroxy-3-(5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl)-isochroman-1-on
Probencode:	QEN11-S3-P8
Quellorganismus:	<i>Chaetomium globosum</i> (aus <i>Polysiphonia arceslate</i>)
Substanzmenge:	6.0 mg
Beschreibung:	orange-braun, kristallin
Summenformel:	C ₁₆ H ₂₀ O ₆
Molekulargewicht:	308 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	- 30° (c = 0.1, MeOH)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	22.7 min
	UV-Spektrum 

Position	δ_{H} (J Hz)	δ_{C} ^a	H-H-COSY	HMBC
1				
2				
3	4.66 m	76.8	4	
4	AB 2.82-2.92 m	33.3	3, 5	3, 4a, 5, 8a, 9
4a		142.8		
5	6.18 d (2.2) ^c	106.3	4, 7	4, 6, 7, 8, 8a
6		165.4		
7	6.20 d (2.2) ^c	100.6	5	5, 8a
8		165.4		
8a		100.6		
9	AB 1.70-1.93 m ^b	39.1		
10	3.97 m	71.5	11B, 14, 15	11, 14, 15
11	A 1.70-1.93 m ^b B 1.33 m	25.9	10	9, 13, 14
12	AB 1.70-1.93 m ^b	28.8		
13	1.70-1.93 m ^b	65.7		
14	3.70 d (4.4)	67.8	10	12, 15
15	1.19 d (3H, 6.9)	12.0	10	10, 14

^a Werte dem HMBC entnommen

^b Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

^c Signale austauschbar

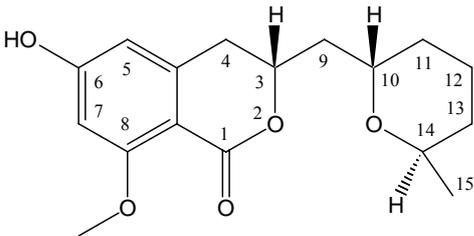
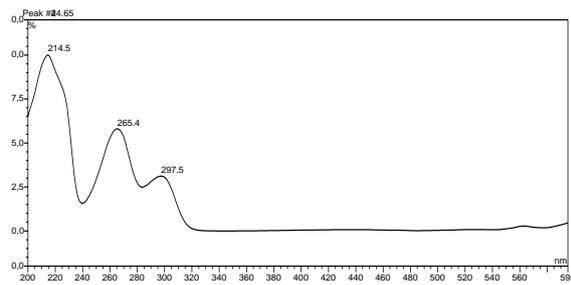
Tab.E20: NMR-Daten von 5'-Hydroxyasperentin, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

F. Asperentin-8-methylether

Asperentin-8-methylether wurde nach vorheriger Fraktionierung mittels Sephadex-Säulenchromatographie aus dem Ethylacetatextrakt von *Chaetomium globosum* durch präparative HPLC isoliert.

Das Molekulargewicht von 306 amu konnte mithilfe der ESI-Massenspektrometrie bestimmt werden und unterschied sich damit um 14 amu von Cladosporin, die UV-Spektren der beiden Substanzen sind identisch. Über die ¹H-NMR- und H-H-COSY-Spektren konnte schließlich die Struktur dieses Cladosporin-Derivates festgelegt werden (Tab.E21). Die NMR-Spektren zeigten weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen sowie Korrelationen mit den für Cladosporin gemessenen und unter 3.2.5.B beschriebenen. Abweichend befand sich an Position 8 anstelle der bei Cladosporin befindlichen Hydroxylgruppe eine Methoxygruppe, was durch das Fehlen des Signals für 8-OH bestätigt werden konnte. Die gemessenen ¹H-NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen [Fujimoto *et*

al. 1999] überein. Der gemessene Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: $+72^\circ$ zeigte ebenso Übereinstimmung mit dem in der Literatur angegebenen [Fujimoto *et al.* 1999].

Asperentin-8-methylether	
Systematischer Name:	6-Hydroxy-8-methoxy-3-(6-methyl-tetrahydro-pyran-2-ylmethyl)-isochroman-1-on
Probencode:	QEN11-S3-P10
Quellorganismus:	<i>Chaetomium globosum</i> (aus <i>Polysiphonia arceslate</i>)
Substanzmenge:	2.7 mg
Beschreibung:	orange-braun, kristallin
Summenformel:	$C_{17}H_{22}O_5$
Molekulargewicht:	306 g/mol
Drehwert $[\alpha]_D^{20}$:	$+72^\circ$ (c = 0.1, $CHCl_3$)
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	24.6 min
	UV-Spektrum 

Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY	Position	δ_H (J Hz)	H-H-COSY
1			9	A 2.09 dddd (3.5, 3.8) B 1.65-1.75 m ^a	3, 10
2					
3	4.50 m	4, 9A			
4	AB 2.83-2.86 m	3	10	4.12 m	9A, 11B
4a			11	A 1.65-1.75 m ^a B 1.38 m	10
5	6.28 (2.2)	4, 7			
6			12	AB 1.65-1.75 m ^a	
7	6.40 (2.2)	4, 5	13	A 1.65-1.75 m ^a B 1.32 m	14
8					
8a			14	3.91 m	13B, 15
8-OCH₃	3.83 s (3H)		15	1.16 d (3H; 6.6)	14

^a Signal nicht aufzulösen aufgrund von Signalüberlappung

Tab.E21: NMR-Daten von Asperentin-8-methylether, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

3.3. Ergebnisse der Bearbeitung der mangrovenassoziierten Pilze aus Hainan (China)

3.3.1. Screening auf Bioaktivität

Untersucht wurden die Ethylacetatextrakte der 300 ml Standkulturen in einer Konzentration von 25 mg/ml im antibiotischen Test und im „Brine Shrimp Assay“ auf allgemeine toxische Wirkung bei einer Konzentration von 200 µg/ml. War in dieser Konzentration eine nennenswerte Aktivität zu verzeichnen, wurde zudem die antibiotische Aktivität in der Konzentration von 100 µg/ml getestet. Dabei zeigten fünf der untersuchten Extrakte eine potente toxische Wirkung im „Brine Shrimp Assay“ und acht der Extrakte potente antibakterielle Wirkung gegenüber *Bacillus subtilis*, vergleichbar mit den Positivkontrollen Penicillin und Streptomycin. Antifungale Aktivität ließ sich dagegen bei nur zwei Extrakten dieser mangrovenassoziierten Pilze feststellen.

Bezeichnung Pilzstamm	Identifikation Pilzstamm	Wirtsorganismus	Antibiotischer Assay		Brine Shrimp Assay			
			HH [mm]	BS--EC--SC CC--CH	100 - 200 [µg/ml]	Letalität [%]		
MGC-1.2	NN	<i>Heritiera littoralis</i>	0	0	0	--	-	0
MGC-1.3	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Heritiera littoralis</i>	15	0	0	--	-	5
MGC-2.2	NN	<i>Rhizophora mucronata</i>	0	0	0	--	-	5
MGC-4.3	NN	<i>Bruguiera sexangula</i>	0	0	0	--	-	10
MGC-4.4	<i>Botryosphaeria lutea</i>	<i>Bruguiera sexangula</i>	15	0	0	--	-	0
MGC-5.1	<i>Neurospora terricola</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	0	0	0	--	-	0
MGC-5.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	15	0	0	--	-	0
MGC-5.6	NN	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	12	0	0	--	-	0
MGC-6.1	<i>Pestialotiopsis microspora</i>	<i>Sonneratia alba</i>	0	0	0	15	-	35
MGC-6.2	NN	<i>Sonneratia alba</i>	0	0	0	--	-	0
MGC-8.2	NN	<i>Sonneratia</i> sp.	0	0	0	--	-	0
MGC-8.3	NN	<i>Sonneratia</i> sp.	0	0	0	--	-	0
MGC-8.4	NN	<i>Sonneratia</i> sp.	0	0	0	--	-	0
MGC-9.2	NN	<i>Avicennia marina</i>	0	0	0	30	-	25
MGC-10.2	NN	<i>Laguncularia racemosa</i>	0	0	0	--	-	0
MGC-12.3	NN	<i>Aegiceras corniculatum</i> Blanco	0	0	10	100	-	100

MGC-12.4	NN	<i>Aegiceras corniculatum Blanco</i>	0 – 0 – 0	-- - 5
MGC-13.1	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Sonneratia caseolaris</i>	7 – 0 – 0	-- - 0
MGC-13.2	NN	<i>Sonneratia caseolaris</i>	10 – 0 – 0	-- - 0
MGC-14.1	NN	<i>Kandelia candel</i>	10 – 0 – 0	70 - 85
MGC-14.4	<i>Hypoxyylon fendleri</i>	<i>Kandelia candel</i>	0 – 0 – 0	40 - 40
MGC-14.5	NN	<i>Kandelia candel</i>	0 – 0 – 0	-- - 0
MGC-15.3	NN	<i>Excoecaria agallocha</i>	0 – 0 – 0	-- - 0
MGC-15.4	NN	<i>Excoecaria agallocha</i>	7 – 0 – 0	25 - 50
MGC-16.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Xylocarpus granatum</i>	0 – 0 – 8	-- - 0

NN= Identifikation liegt noch nicht vor

Tab.E22: Ergebnisse der Biotests der mangrovenassoziierten Pilze aus Hainan (China)

3.4. Ergebnisse der Bearbeitung der schwammassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)

3.4.3. Screening auf Bioaktivität

Getestet wurde der Ethylacetatextrakt der 300 ml Standkultur von *Alternaria alternata* in einer Konzentration von 25 mg/ml im antibiotischen Test und 100 bzw. 200 µg/ml im „Brine Shrimp Assay“. Dabei zeigte der Extrakt eine starke antibakterielle Wirkung gegenüber *Bacillus subtilis*, in sogar größerem Ausmaß als die Positivkontrollen Penicillin und Streptomycin und außerdem antifungale Aktivität gegenüber dem Testorganismus *Cladosporium cucumerinum*. Allgemeine toxische Aktivität wurde nicht festgestellt.

Bezeichnung Pilzstamm	Identifikation Pilzstamm	Wirtsorganismus	Antibiotischer Assay		Brine Shrimp Assay 100 - 200 [µg/ml] Letalität [%]
			HH [mm] EC--BS--SC	CC--CH	
SPI-A2	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Axinella tenudigatata</i>	0 – 19 – 0	15 – 0	0 - 0

Tab.E23: Ergebnisse der Biotests der schwammassoziierten Pilze aus Kerala (Indien)

3.4.4. Inhaltsstoffe aus *Alternaria alternata* (SPI-A2)

Dieser Stamm der Gattung *Alternaria* wurde aus dem marinen Schwamm *Axinella tenudigata* des tropischen Indischen Ozeans isoliert. Der Ethylacetatextrakt des Pilzes zeigte im Biotest eine starke antibakterielle sowie eine antifungale Aktivität. In dem Extrakt konnten das Mykotoxin Tenuazonsäure sowie die zwei Dibenzopyron-Derivate Alternariol und Djalonenson nachgewiesen werden.

A. Tenuazonsäure

Isoliert wurde diese vinyloge Carbonsäure aus dem Butanolextrakt von *Alternaria alternata* mittels der Sephadex-Säulenchromatographie unter Verwendung eines Elutionsmittelgemisches aus Dichlormethan und Methanol (8:2, v/v). Die Strukturaufklärung erfolgte über ¹H-NMR, H-H-COSY und HMQC-Spektroskopie. Das Molekulargewicht der Substanz konnte über den Pseudomolekülionenpeak des ESI-MS-Spektrums als 197 amu bestimmt werden. Das UV-Spektrum wies zwei Maxima bei 219 und 277 nm auf.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte zunächst drei Methylgruppen. H₃-11 erschien als Dublett, es konnte somit eine benachbarte CH-Funktion vermutet werden (Tab.E24), H₃-10 bildete demnach ein Triplett mit einer benachbarten CH₂-Gruppe. Aufgrund der Korrelationen im H-H-COSY-Spektrum konnten H-8, H₂-9, H₃-10 und H₃-11 dem gemeinsamen Spinsystem einer 2-Butyl-Seitenkette zugeordnet werden. Über die Korrelation von H-8 zu H-5 wurde die Verknüpfung der Seitenkette zu dem Pyrrolring gezeigt. Das Vorhandensein eines Stickstoffs konnte aus dem ungeradzahligen Molekulargewicht der Verbindung abgeleitet werden. Die Methylgruppe an Position 7 war aufgrund der Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe ins Tieffeld verschoben, wie dem HMQC-Spektrum, sowie auch dem ¹H-NMR-Spektrum zu entnehmen war. Die ¹H-NMR-Daten stimmten mit den in der Literatur für Tenuazonsäure angegebenen [Steyn und Rabie 1976; Nolte *et al.* 1980] überein.

Der optische Drehwert der Verbindung von $[\alpha]_D^{20}$: -136° zeigt ebenfalls Übereinstimmung mit dem in der Literatur angegebenen Wert [DNP 2004].

Die Substanz erwies sich im Zytotoxizitätstest gegen die Zelllinien L5178Y (Lymphomzellen der Maus) und gegen HeLa (menschliche Gebärmutteradenomzellen) als sehr aktiv. Für L5178Y konnte eine ED₅₀ > 8.2 µg/ml und für HeLa eine ED₅₀ > 10 µg/ml nachgewiesen werden.

Tenuazonsäure

Systematischer Name: 3-Acetyl-5-sec-butyl-4-hydroxy-1,5-dihydro-pyrrol-2-on

Probencode: SPI-A2-B-S3

Quellorganismus: *Alternaria alternata* (aus *Axinella tenudigatata*)

Substanzmenge: 57.1 mg

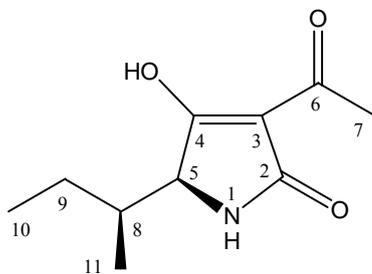
Beschreibung: rötlich-braun, viskos

Summenformel: C₁₀H₁₅NO₃

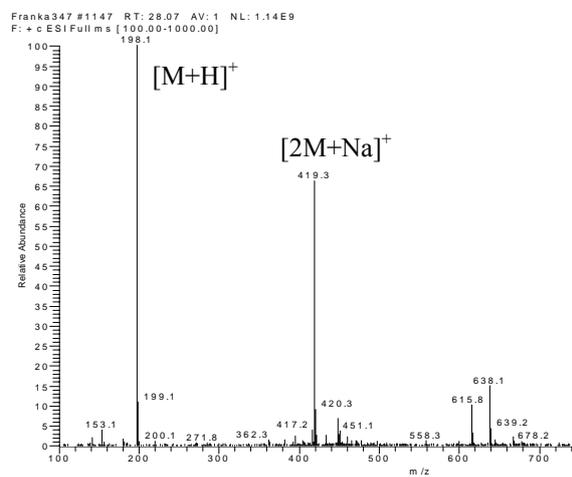
Molekulargewicht: 197 g/mol

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$: -136° (c = 0.2, CHCl₃)

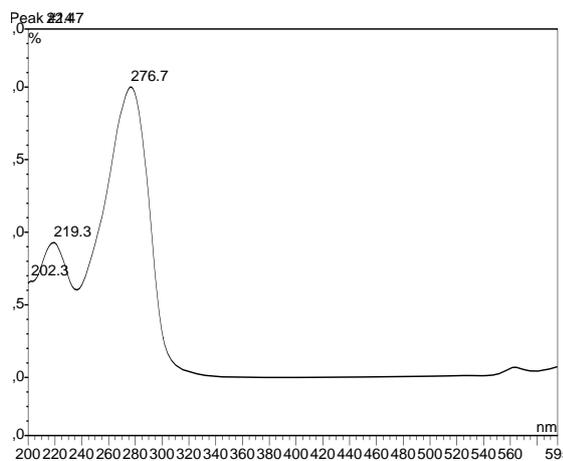
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient): 22.5 min



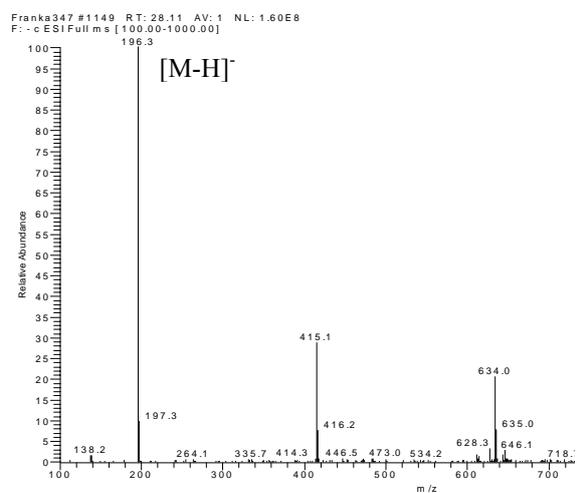
ESI-MS :



UV-Spektrum



ESI-MS 9



Position	δ_{H} (J Hz)	H-H COSY	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1			
2			
3			
4			
5	3.60 bs	8	66.1
6			
7	2.34 s (3H)		26.7
8	1.90 m	5, 9A, 9B, 11	37.7
9	A 1.35 m B 1.14 m	8, 9B, 10 8, 9A, 10	24.4
10	0.87 t (3H, 7.6)	9A, 9B	12.0
11	0.99 d (3H, 6.9)	8	16.1

^a Werte dem HMQC-Spektrum entnommen

Tab.E24: NMR-Daten von Tenuazonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

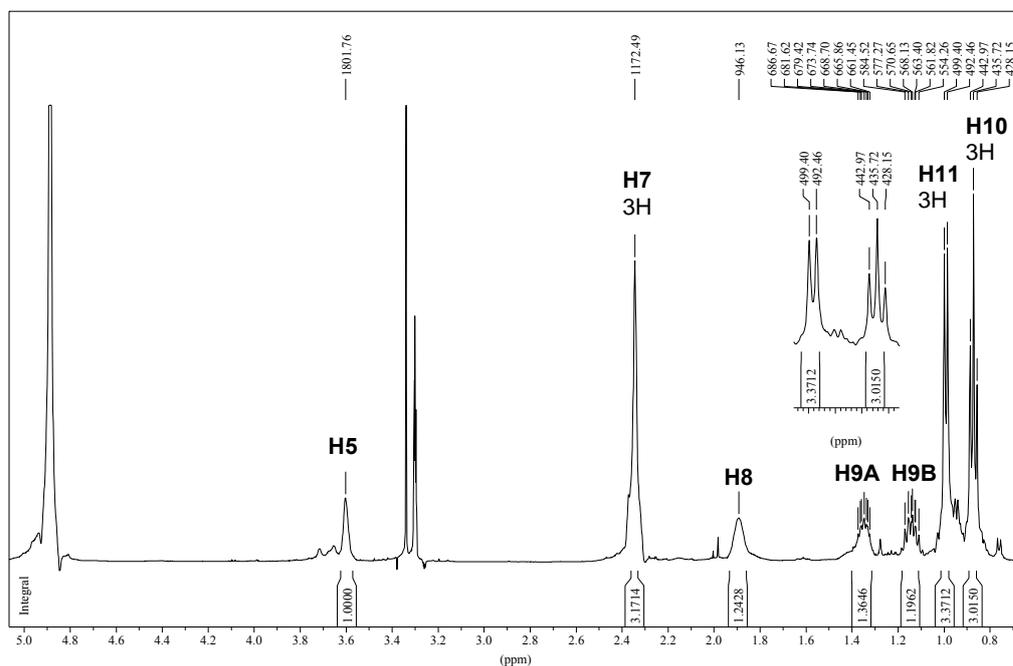


Abb.E41: ¹H-NMR-Spektrum von Tenuazonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

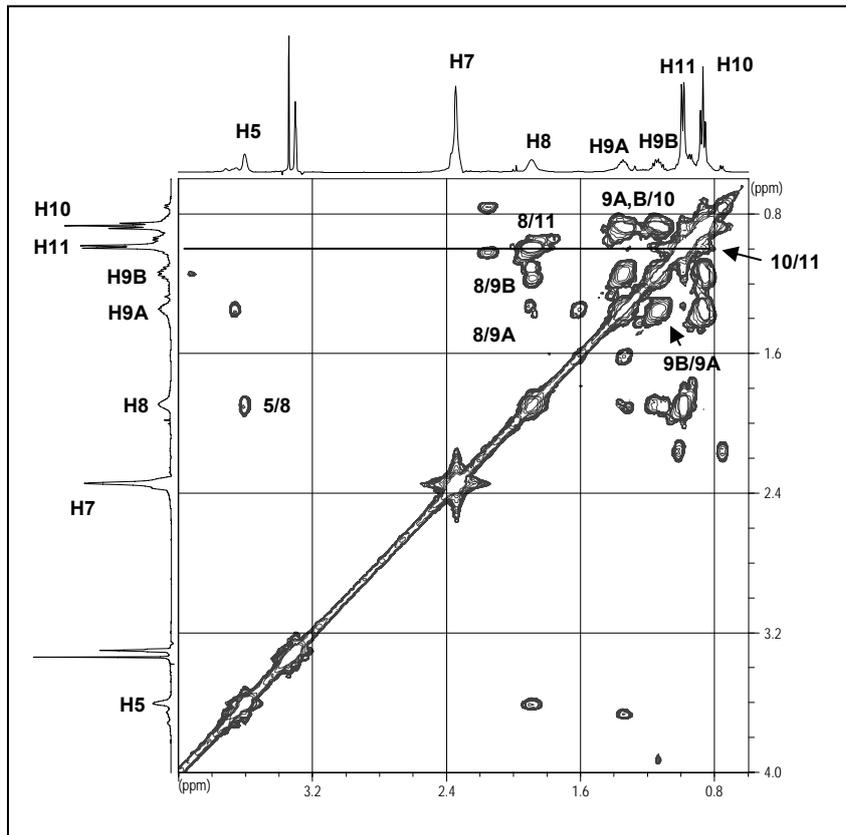


Abb.E42:

H-H-COSY-Spektrum von Tenuazonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

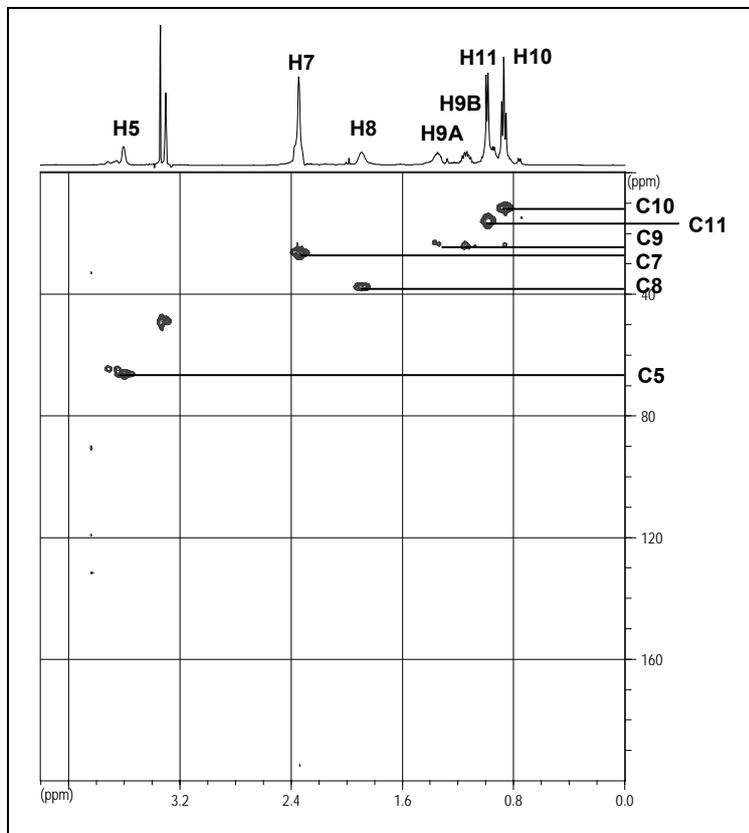


Abb.E43:

HMBC-Spektrum von Tenuazonsäure, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

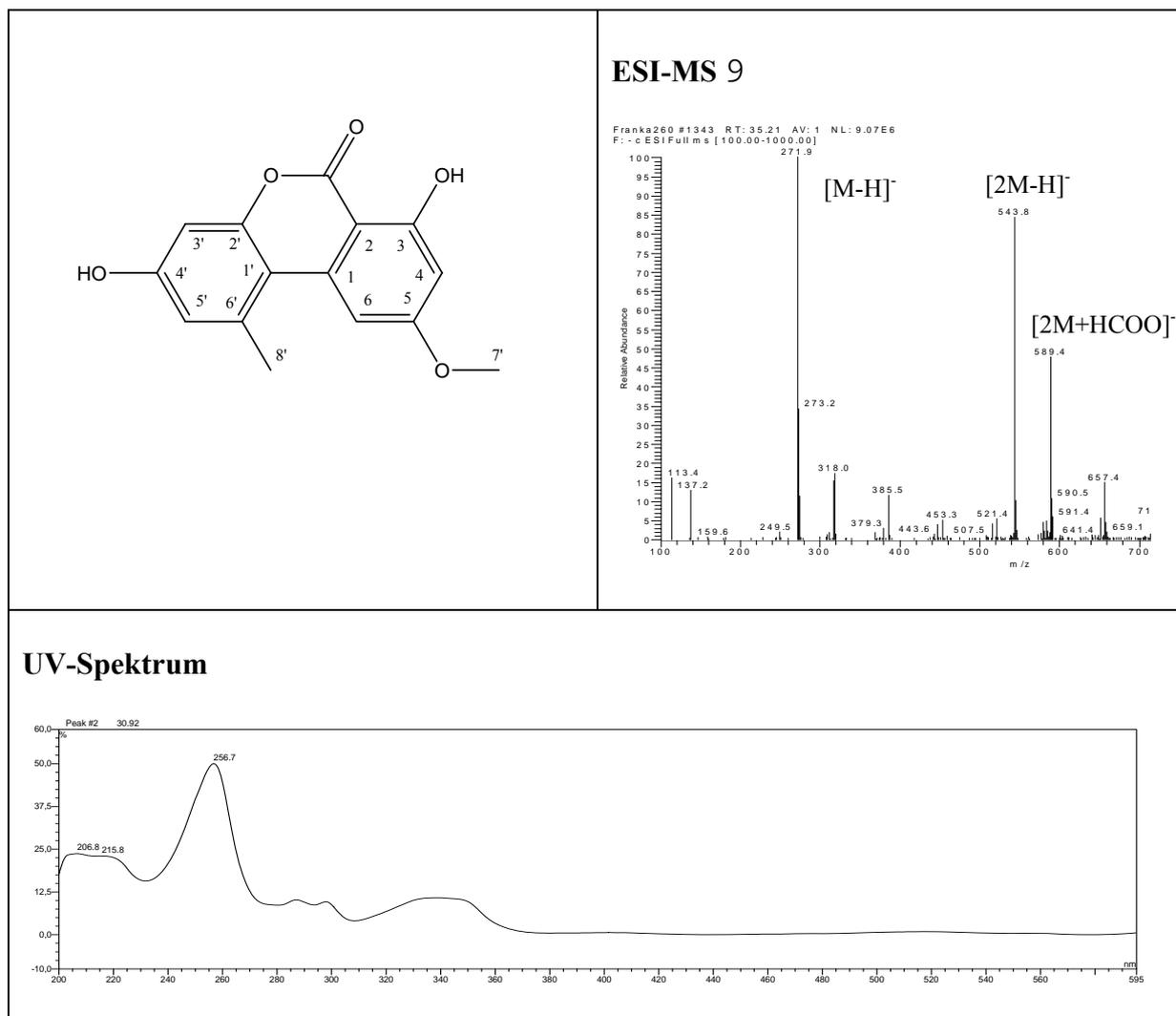
B. Djalonenson (Alternariol-monomethyl-ether)

Isoliert wurde Djalonenson aus dem Ethylacetatextrakt von *Alternaria alternata* mittels präparativer HPLC.

Das Molekulargewicht von 272 amu wurde über ESI-MS bestimmt und wies damit eine Massendifferenz von 14 amu zu Alternariol (siehe unten) auf. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 216, 257 und 340 nm. Die Struktur der Substanz konnte schließlich mittels ¹H-NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

Das Spektrum zeigte das Vorhandensein von 4 Protonen, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von 6.44 - 7.18 ppm aromatischen Systemen zugeordnet werden konnten (Tab.E25). Aus der gemeinsamen Kopplungskonstanten von 1.9 Hz wurde geschlossen, dass H-4 und H-6 einem gemeinsamen Spinsystem angehörten, in dem sie sich in *meta*-Position zueinander befinden mussten. Gleiches konnte für H-3' und H-5' vermutet werden (Kopplungskonstante 2.5 Hz). Weiterhin wurde H₃-7' aufgrund der chemischen Verschiebung von 3.80 ppm ins Tieffeld sowie der Integration als Methoxyfunktion identifiziert, H₃-8' dagegen mit einer chemischen Verschiebung von 2.66 ppm als Methylgruppe, die direkt mit einem aromatischen System verknüpft war. Die ¹H-NMR-Daten stimmten mit den in der Literatur für Djalonenson angegebenen überein [Onocha *et al.* 1995]. Weiterhin wurde die hier vorliegende Substanz einem Vergleich mit dem von G. Brauers [Brauers 2003] im Rahmen seiner Dissertation isolierten Djalonenson aus einem schwammassoziierten Pilz HPLC-analytisch sowie massenspektrometrisch unterzogen und eindeutige Übereinstimmung festgestellt.

Djalonenson (Alternariol-monomethyl-ether)	
Systematischer Name:	3,7-Dihydroxy-9-methoxy-1-methyl-benzo[c]chromen-6-on
Probencode:	SPI-A2-P-6S
Quellorganismus:	<i>Alternaria alternata</i> (aus <i>Axinella tenudigata</i>)
Substanzmenge:	0.6 mg
Beschreibung:	gelb-orange
Summenformel:	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Molekulargewicht:	272 g/mol
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	30.9 min



Position	δ_H (J Hz)	Position	δ_H (J Hz)
1		1'	
2		2'	
3		3'	6.50 d (2.5)
4	6.44 d (1.9)	4'	
5		5'	6.59 d (2.5)
6	7.18 d (1.9)	6'	
		7'	3.80 s (3H)
		8'	2.66 s

Tab.E25: NMR-Daten von Djalonenson, gemessen in CD₃OD (500 MHz)

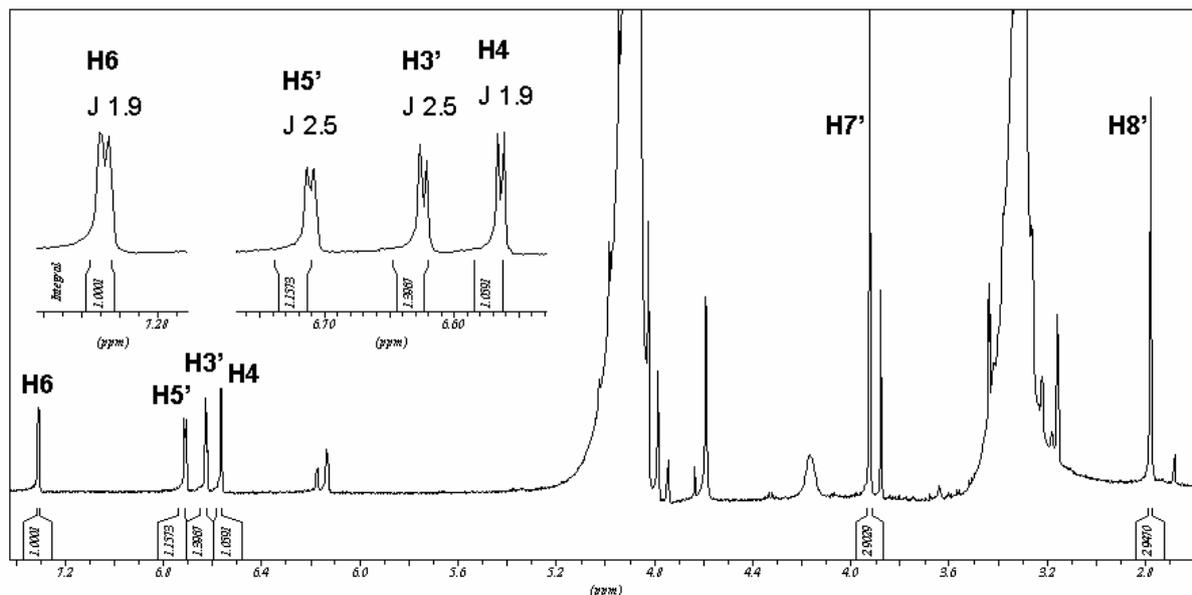
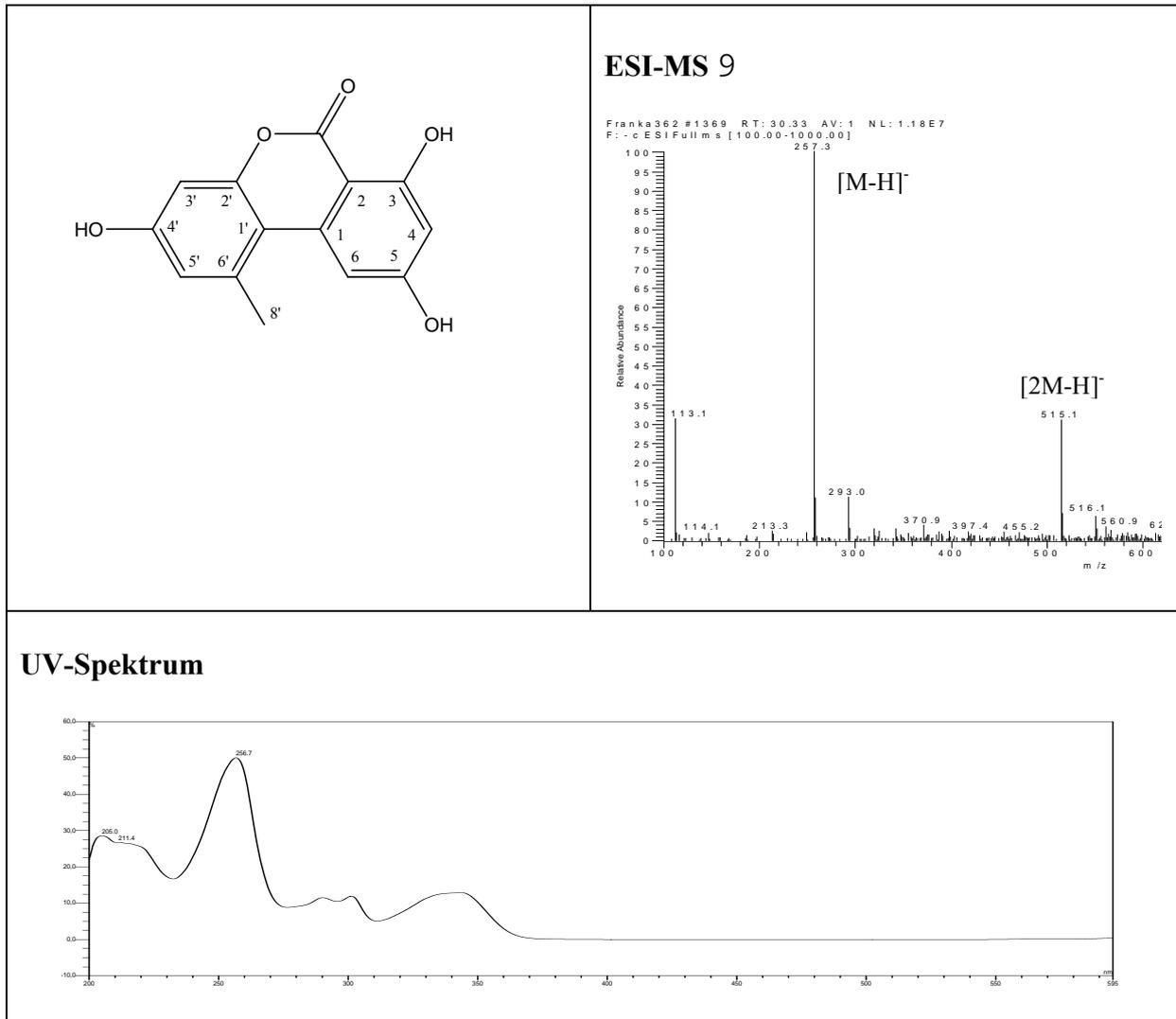


Abb.E44: ^1H -NMR von Djalonensin, gemessen in CD_3OD (500 MHz)

C. Alternariol

Die Substanz konnte im Butanolextrakt von *Alternaria alternata* nach erfolgter Fraktionierung über eine Sephadexsäule nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht von 258 amu wurde anhand eines eindeutigen Pseudomolekülionpeaks im ESI-MS-Spektrum bestimmt und unterschied sich damit um 14 amu von Djalonensin (siehe oben). Das UV-Spektrum war mit dem von Djalonensin praktisch identisch. Weiterhin konnte die Struktur durch Direktvergleich mit der von G. Brauers im Rahmen seiner Doktorarbeit aus dem schwammassoziierten Pilz *Penicillium citreonigrum* isolierten Substanz bestätigt werden [Brauers 2003], UV- und MS-Spektrum sowie die Retentionszeit der analytischen HPLC zeigten eindeutige Übereinstimmung.

Alternariol	
Systematischer Name:	3,7,9-Trihydroxy-1-methyl-benzo[c]chromen-6-on
Probencode:	SPI-A2-B-S9
Quellorganismus:	<i>Alternaria alternata</i> (aus <i>Axinella tenudigata</i>)
Substanzmenge:	9.4 mg
Beschreibung:	gelb-orange
Summenformel:	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$
Molekulargewicht:	258 g/mol
Retentionszeit HPLC (Standard-Gradient):	30.7 min



3.5. Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Stoffwechsel mariner Pilze

Die Naturstoffproduktion in Mikroorganismen wird in nicht geringem Maße von äußeren Faktoren beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielt dabei die enge Verknüpfung der Stoffwechsel von Endophyt und Wirt. Doch auch weitere Faktoren, die besonders für die Wahl der Kultivierungsbedingungen eine Rolle spielen, wie der Salzgehalt des Mediums, der Zeitpunkt der Probennahme und die Kultivierung in Stand- bzw. Schüttelkultur, sind entscheidend. Diese Bedingungen wurden beispielhaft an dem algenassoziierten Pilz *Aspergillus sydowii* sowie dem schwammassoziierten Pilz *Phialophora olivacea* untersucht.

3.5.1. Einfluss der Wirt-Endophyt-Wechselwirkung auf die Bildung von Sekundärstoffen

Als ein Hinweis auf die komplizierten und noch unzureichend untersuchten Wechselwirkungen zwischen Endophyt und jeweiligem Wirt wurden alle Algenspezies, aus denen im Rahmen dieses Projektes marine Pilze isoliert worden waren (siehe Tab.E1), auf ihr Inhaltsstoffmuster untersucht und mit dem der Endophyten verglichen. Bei keinem der untersuchten Pilze konnten mithilfe HPLC-analytischer Methoden Übereinstimmungen der gebildeten Naturstoffe mit denen des assoziierten Endophyten nachgewiesen werden. Verdeutlicht ist dies am Beispiel von *Caulerpa peltata* und dem assoziierten Pilz *Eurotium amstellodami* (ENI-C1) in Abb.E45.

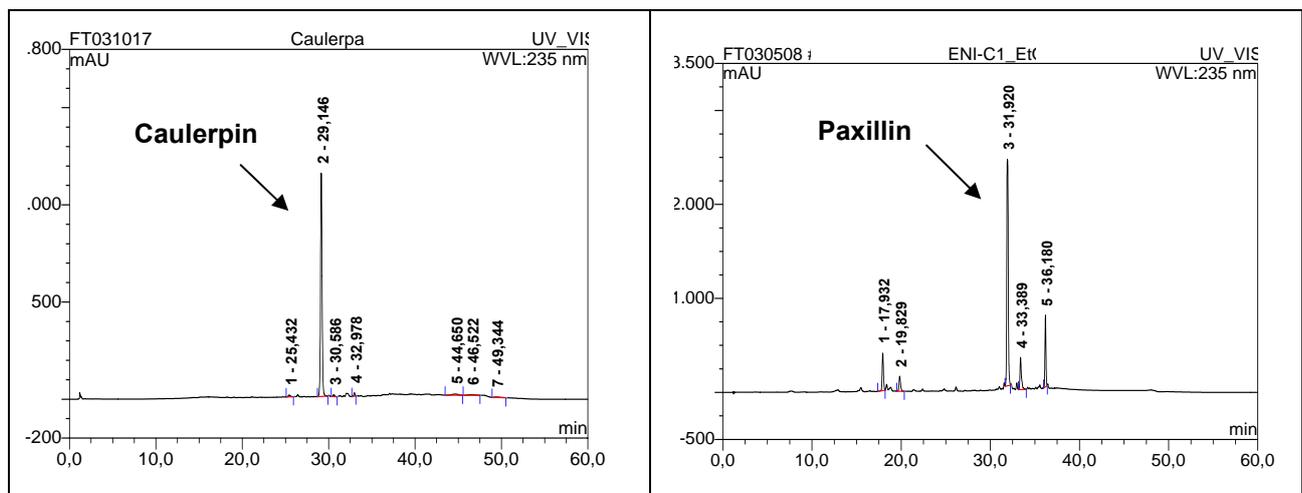


Abb.E45: Vergleich der Inhaltsstoffmuster von *Caulerpa peltata* (linke Abb.) und dem assoziierten marinen Pilz *Eurotium amstellodami*

3.5.2. Einfluss des Zusatzes von getrockneter Wirtspflanze zum Kulturmedium auf das Wachstum

In diesem Versuch wurde das Wachstumsverhalten von Pilzen mariner Herkunft auf verschiedenen Nährmedien untersucht. Hierzu wurden aus Mangroven isolierte Pilze (Tab.E22) zum Vergleich parallel auf zwei Kulturmedien inkubiert, einem Standard-Malzextraktmedium und einem Medium, das statt Malzextrakt das Material der jeweiligen getrockneten und pulverisierten Wirtspflanze enthielt. Der Salzgehalt war in beiden Fällen identisch und den im natürlichen Habitat vorherrschenden angepasst. Besonders deutlich konnte ein Unterschied im Wachstumsverhalten bei MGC 13.4 beobachtet werden, einem aus dem Blatt von *Sonneratia caseolaris* (Sonneratiaceae) isolierten Pilz, dessen Identifizierung noch nicht vorliegt. Auf der Kulturplatte mit Wirtspflanzenzusatz konnte ein deutlich schnelleres und üppigeres Wachstum beobachtet werden als zum jeweils gleichen Zeitpunkt auf der Kulturplatte mit Malzextraktmedium (Abb.E46).

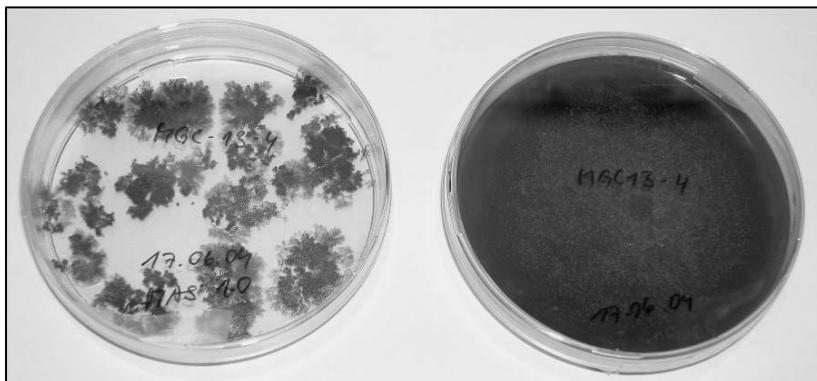


Abb.E46:

Mangrovenassoziierter Pilz MGC 13.4 im Vergleich auf zwei verschiedenen Kulturmedien: Malzextraktmedium (links); mit getrocknetem Material der Wirtspflanze versetzt (rechts)

3.5.3. Einfluss der Salinität auf die Bildung von Sekundärstoffen

Eine Korrelation zwischen dem Salzgehalt des Kulturmediums und der Biomasse an Myzelium, sowie der Menge und Zusammensetzung an von dem algenassoziierten Pilz *Aspergillus sydowii* gebildeten Naturstoffen ist deutlich aus den gemessenen Daten (Tab.E26) ersichtlich. Vermessen wurden die Ethylacetatextrakte der Standkulturen per HPLC.

Salzgehalt Medium [%]	Masse EtOAc-Extrakt [mg]	Biomasse Myzel [g]	Masse EtOAc-Extrakt pro Masseneinheit Myzel [mg/g]
0	194	14.20	13.66
1	284	11.20	25.36
2	267	9.90	26.97
3	210	9.10	23.08
4	174	8.50	20.47

Tab.E26: Biomasse an Myzelium und gebildeten Naturstoffen in Abhängigkeit vom Salzgehaltes im Kulturmedium

A. Einfluss des Salzgehaltes auf die Biomasse an Myzel

Aus Abb.E48 wird deutlich ersichtlich, dass die gebildete Biomasse an Myzelium mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Das Maximum an Biomasse ist demnach bei salzfreiem Kulturmedium zu verzeichnen.



Abb.E47:

Aspergillus sydowii-Kulturen, im Vergleich 0, 1, 2, 3 und 4% (v.l.n.r.) Meersalzgehalt im Medium nach einer Woche

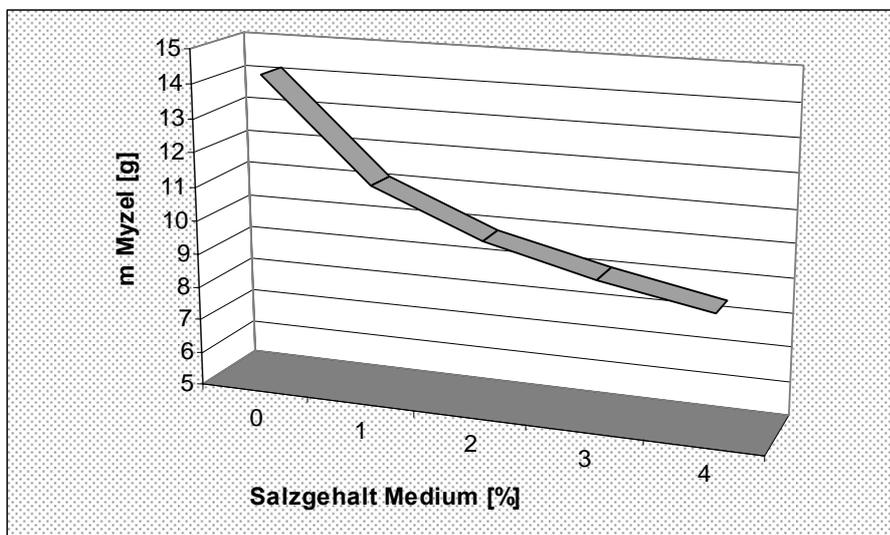


Abb.E48:

Biomasse des Myzeliums in Abhängigkeit vom Salzgehalt im Kulturmedium

B. Einfluss des Salzgehaltes auf die Menge an gebildeten Naturstoffen

Bereits visuell ist in Abb.E49 zu erkennen, dass der Salzgehalt des Kulturmediums einen Einfluss auf Art und Menge der von dem Pilz gebildeten Naturstoffe ausübt. Bestätigt wurde diese Annahme durch die in Abb.E50 und E51 dargestellten Messergebnisse. Abb.E50 zeigt, dass die absolute Menge an gebildeten Naturstoffen bei 1,2 und 3% Salzgehalt deutlich über der von salzfreiem Medium liegt. Ein Maximum wird bei 2% Salzgehalt mit 284 mg erreicht im Vergleich zu 194 mg bei salzfreiem Medium. Aus Abb.E51 wird ersichtlich, dass mit zunehmendem Gehalt an Meersalz im Medium auch die relativ pro Masseneinheit Myzelium gebildete Menge an Naturstoffen zunimmt mit einem Maximalwert bei 2% Salzgehalt.

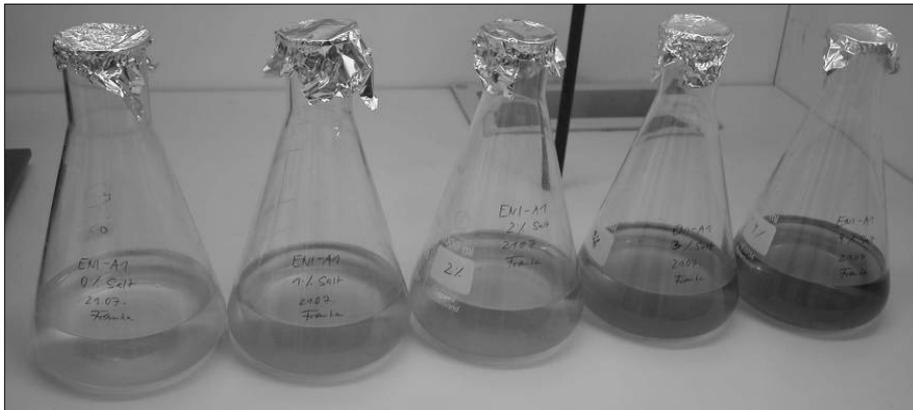


Abb.E49:

Ethylacetatextrakte von *Aspergillus sydowii*-Kulturen mit 0, 1, 2, 3 und 4% Meersalzgehalt im Medium (v.l.n.r.)

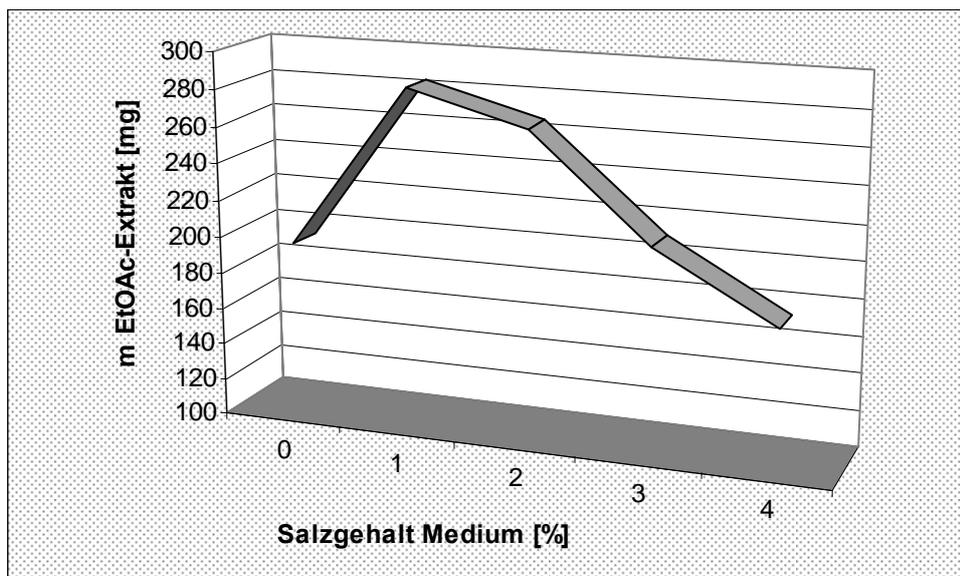


Abb.E50:

Biomasse der gebildeten Naturstoffe (Ethylacetatextrakt) in Abhängigkeit vom Salzgehalt im Kulturmedium

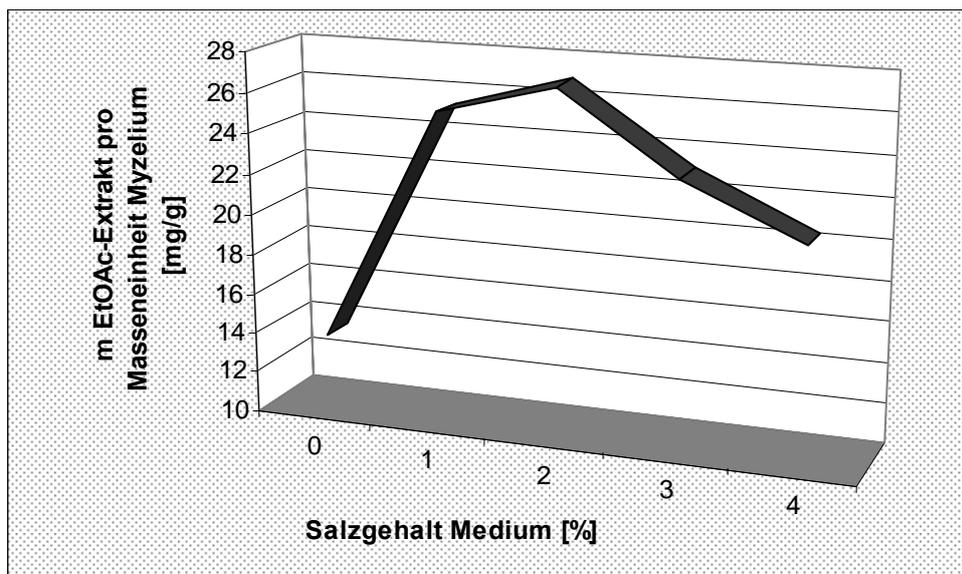


Abb.E51:

Biomasse der gebildeten Naturstoffe (Ethylacetatextrakt) pro Masseneinheit Myzelium in Abhängigkeit vom Salzgehalt im Kulturmedium

C. Einfluss des Salzgehaltes auf die Zusammensetzung von gebildeten Naturstoffen

Jeder der von *Aspergillus sydowii* gebildeten Naturstoffe zeigt eindeutig in seiner Bildung ein Abhängigkeitsverhältnis vom Salzgehalt im Medium. Die Bildung der Substanzen B (Sydowsäure), C (Hydroxysydonsäure), D und F (Sydonsäure) besitzt ihr Optimum bei einer Meersalzkonzentration von 1%, die der Substanzen A und E steigt mit zunehmender Salzkonzentration an, Substanz A wird sogar erst ab einer Salzkonzentration von 3% gebildet.

Salzgehalt Medium [%]	Naturstoff A [mAU]	Naturstoff B [mAU]	Naturstoff C [mAU]	Naturstoff D [mAU]	Naturstoff E [mAU]	Naturstoff F [mAU]
0	0	121.3	7.1	10.6	5.1	53.2
1	0	536.9	27.8	99.1	17.7	130
2	0	415.9	18.1	78.5	36.8	123.2
3	26.9	328.6	7.1	23.6	84.9	76.2
4	57.9	401.5	9.7	92.6	142.7	33.3

Tab.E27: Die Menge der gebildeten Naturstoffe A-F in Abhängigkeit vom Salzgehalt im Kulturmedium; (B = Sydowsäure, C = Hydroxysydonsäure, F = Sydonsäure)

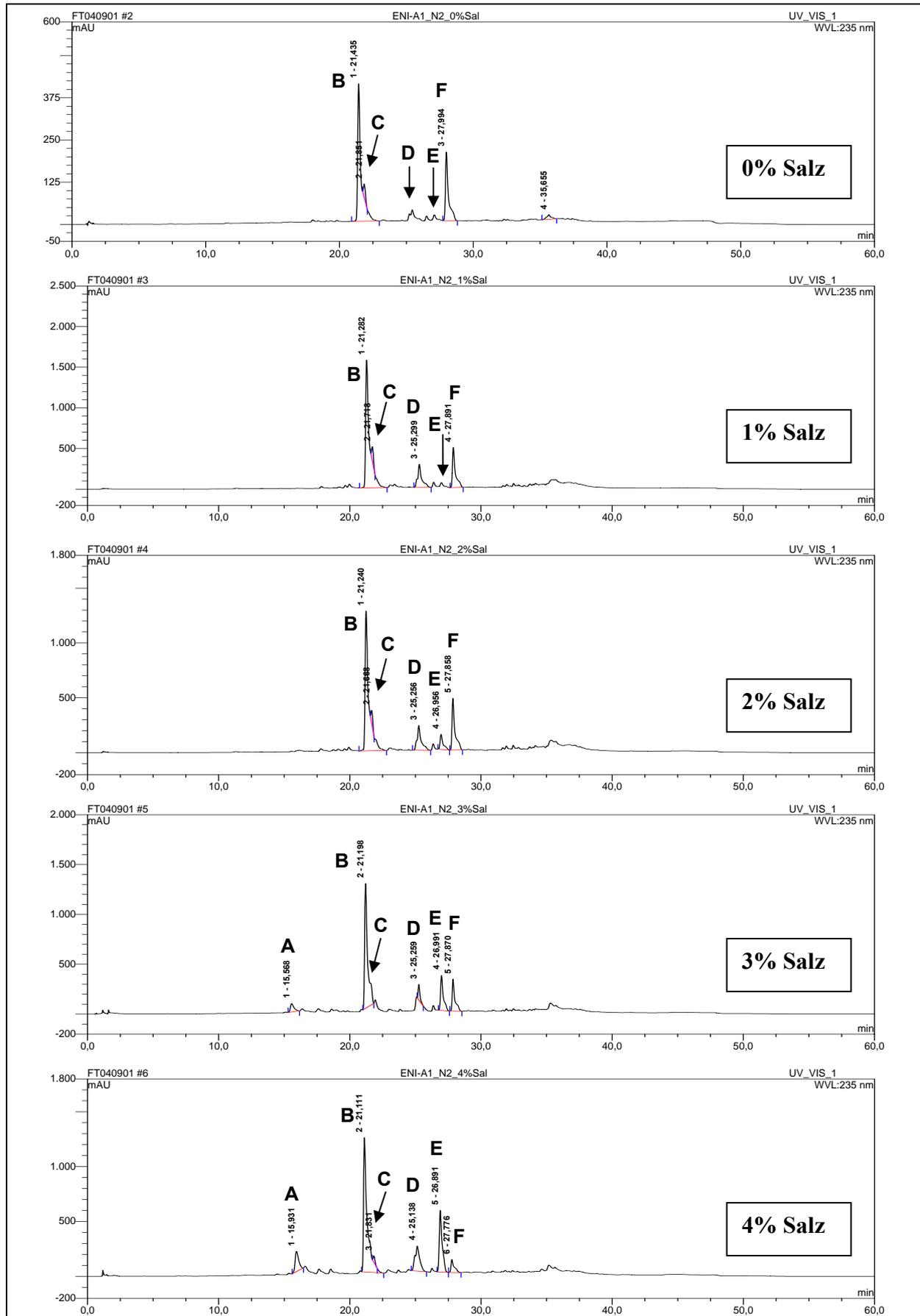


Abb.E52: HPLC-Chromatogramme der Ethylacetatextrakte von *Aspergillus sydowii*-Kulturen unter Zusatz von 0- 4% Meersalz zum Kulturmedium

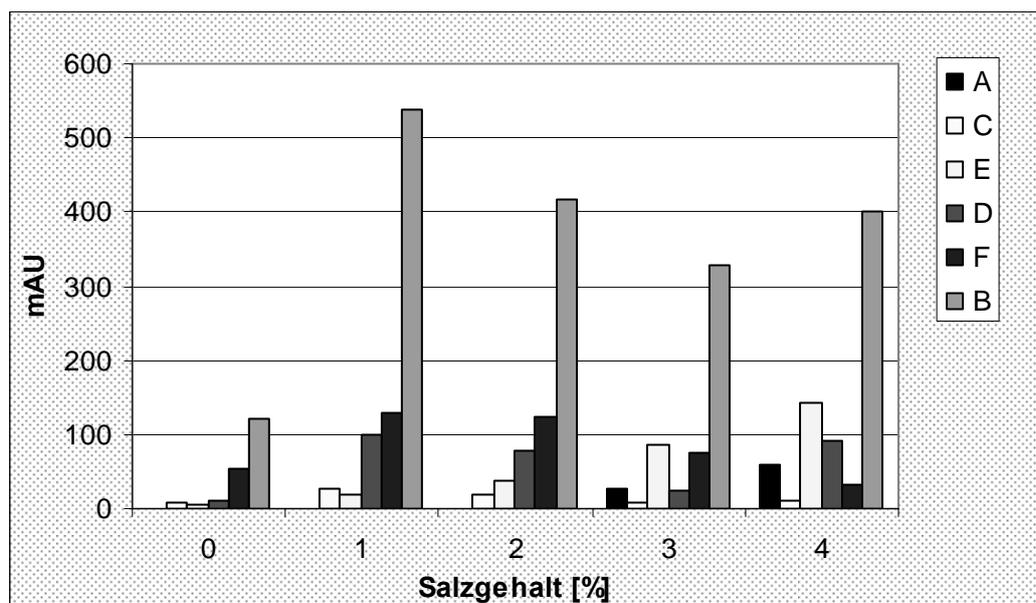


Abb.E53:

Das Inhaltsstoffmuster der Ethylacetatextrakte von *Aspergillus sydowii*-Kulturen in Abhängigkeit vom Salzgehalt im Kulturmedium

3.5.4. Die Bildung von Sekundärstoffen in Abhängigkeit von der Zeit

In diesem Test wurde die Produktion von Naturstoffen durch den schwammassoziierten Pilz *Phialophora olivacea* über einen Zeitraum von 6 Wochen hinweg überprüft. Untersucht wurden sowohl die gebildete Biomasse an Myzelium wie auch die relativ zum Myzeliumanteil gebildete Menge und Zusammensetzung an Sekundärstoffen. Dazu wurden pro Woche jeweils zwei Kulturen entnommen, mit den Lösungsmitteln Methanol und Butanol extrahiert und HPLC-analytisch vermessen. Zeitgleich wurden Flüssigkulturen desselben Pilzes als Schüttelkultur inkubiert und nach drei bzw. sechs Wochen entnommene Proben in gleicher Weise untersucht und mit den Ergebnissen der Standkulturen verglichen.

t [Wo]	Biomasse Myzel [g]	Masse MeOH-Extrakt [mg]	Masse BuOH-Extrakt [mg]	Masse MeOH-Extr./m Myzel [mg/g]	Masse BuOH-Extr./m Myzel [mg/g]	rel. Masse an Ges.extr. pro Masseneinheit Myzelium [mg/g]
3	4.5	89	184	19.8	40.9	60.7
6	5.6	127	182	22.7	32.5	55.2

Tab.E28: Biomasse an Myzelium und Sekundärstoffen von Schüttelkulturen von *Phialophora olivacea* in Abhängigkeit von der Zeit

t [Wo]	Biomasse Myzel [g]	Masse MeOH-Extrakt [mg]	Masse BuOH-Extrakt [mg]	Masse MeOH-Extr./m Myz. [mg/g]	Masse BuOH-Extr./m Myz. [mg/g]	rel. Masse an Ges.extr. pro Masseneinheit Myzelium [mg/g]
1	15.1	590	267	39.1	17.7	56.8
2	25.4	950	145	37.4	5.7	43.1
3	26.8	344	484	12.8	18.1	30.9
4	26.6	635	905	23.9	34	57.9
5	22.7	652	577	28.7	25.4	54.1
6	21.4	690	398	32.2	18.6	50.8

Tab.E29: Biomasse an Myzelium und Sekundärstoffen von Standkulturen von *Phialophora olivacea* in Abhängigkeit von der Zeit

A. Einfluss des Zeitfaktors auf die gebildete Biomasse an Myzelium

Aus Abb.E54 wird ersichtlich, dass dem anfangs starken Zuwachs an Biomasse nach zwei Wochen eine stationären Phase folgt, nach vier Wochen ist die Biomasse wieder reduziert, liegt jedoch noch immer über dem nach einer Woche gemessenen Wert.

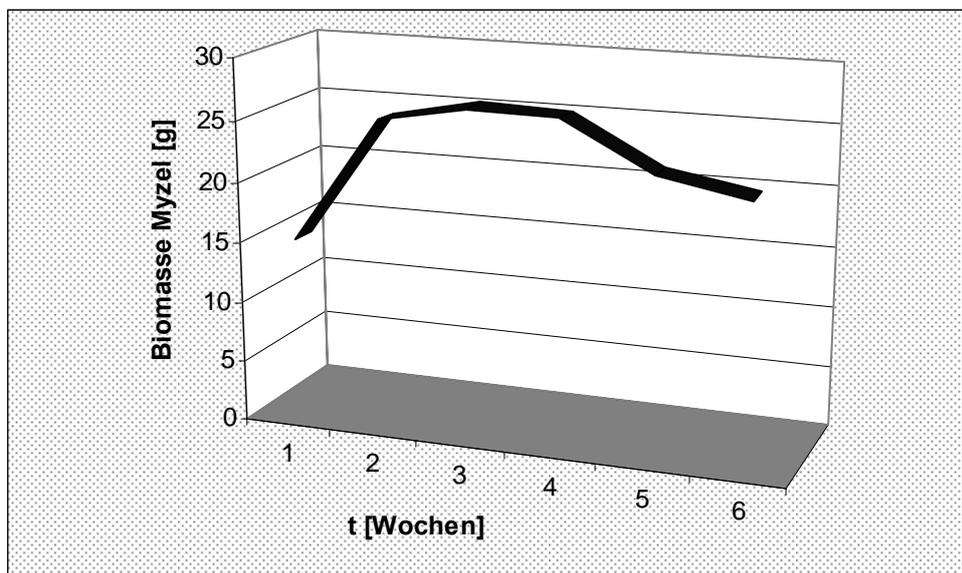


Abb.E54:

Biomasse an Myzelium in Standkultur in Abhängigkeit von der Zeit

B. Einfluss des Zeitfaktors auf die gebildete Menge an Sekundärstoffen

Abb.E55 verdeutlicht, dass die pro Masseneinheit Myzelium gebildete Menge an Sekundärstoffen einer Schwankung innerhalb des Zeitraumes von sechs Wochen unterworfen

ist. Der Gesamtanteil gebildeter Naturstoffe nimmt über den Zeitraum von drei Wochen zunächst ab, erreicht nach vier Wochen einen plötzlichen Anstieg und somit das Maximum an Sekundärstoffproduktion innerhalb des gesamten Zeitraumes, um dann kontinuierlich wieder abzunehmen. Der Anteil polarer Naturstoffe (Extraktion mit Methanol) erreicht dabei sein Minimum ebenfalls in der dritten Woche und ein Maximum in der zweiten. Die Bildung weniger polarer Sekundärstoffe (Extraktion mit Butanol) erreicht ein Maximum nach vier Wochen, um dann kontinuierlich wieder abzunehmen.

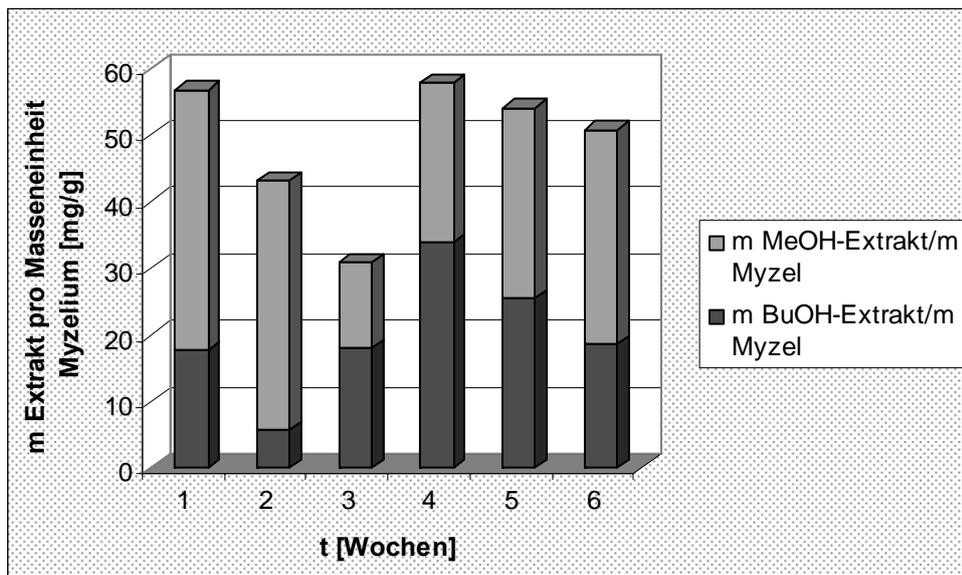


Abb.E55:

Biomasse an Sekundärstoffen in Standkultur in Abhängigkeit von der Zeit

C. Einfluss des Zeitfaktors auf die Zusammensetzung der gebildeten Sekundärstoffe

Über den Zeitraum von sechs Wochen blieb die Zusammensetzung der Extrakte nahezu unverändert, alle Sekundärstoffe konnten zu jedem Zeitpunkt der Probennahme mithilfe der analytischen HPLC detektiert werden.

D. Vergleich von Standkultur und Schüttelkultur in Abhängigkeit von der Zeit

Der Vergleich der gebildeten Biomasse an Myzelium (Tab.E28 und E29) zeigt einen weitaus größeren Massenzuwachs in der Standkultur im Vergleich zur Schüttelkultur, ebenso wie die absolute Menge an Sekundärstoffen gemessen an der Masse des Gesamtextraktes. Die relativ pro Masseneinheit Myzelium gebildete Menge an Naturstoffen dagegen ist nach einem Zeitraum von drei Wochen in der Schüttelkultur deutlich größer, nach sechs Wochen bei

beiden Kulturen vergleichbar groß (Abb.E56). Die Zusammensetzung der Extrakte beider Kultivierungsmethoden ist nahezu identisch.

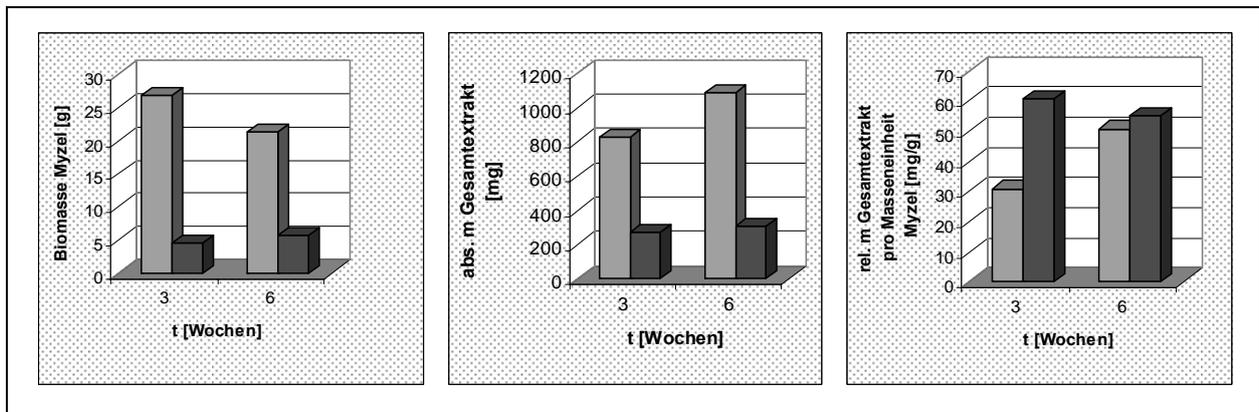


Abb.E56: Bildung von Biomasse Myzelium und Sekundärstoff-Gesamtextrakt (Methanol und Butanol) in Standkultur und Schüttelkultur in Abhängigkeit von der Zeit
 ■ Standkultur; ■ Schüttelkultur

3.5.5. Vergleich der Bioaktivitäten mariner Pilze der gemäßigten und tropischen Klimate

Um den Einfluss der Klimazonen auf die Bioaktivität von marinen Pilzen zu untersuchen, wurden die Ethylacetatextrakte von 12 Pilzen der gemäßigten Klimate (Qingdao/China, Pazifischer Ozean) und 13 der Tropen (Kerala/Indien, Indischer Ozean) miteinander verglichen. Untersucht wurden die allgemeine Toxizität im „Brine Shrimp Assay“ mit *Artemia salina* als Testorganismus in einer Konzentration von 200 µg/ml, die antifungale Aktivität mit *Cladosporium cucumerinum* und *Cl. herbarum* sowie *Saccharomyces cerevisiae* und die antibakterielle Aktivität mit *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* als Testorganismen in einer Konzentration von 25 mg/ml. Die gemessenen Daten sind Tab.E1 und E11 zu entnehmen. Aus Abb.E57 und E58 wird deutlich ersichtlich, dass sämtliche Bioaktivitäten bei den marinen Pilzen des Indischen Ozeans stärker ausgeprägt waren. Besonders deutlich lässt sich ein Unterschied in Hinblick auf die antibakterielle Aktivität erkennen. So zeigten beispielsweise 11 von 13 der Pilzextrakte aus Indien potente Aktivität gegen *E. coli*, bei den Pilzen aus Qingdao dagegen kein einziger, gegenüber *B. subtilis* betrug das Verhältnis 5 : 1. Abb.E58 verdeutlicht einen Direktvergleich sämtlicher Bioaktivitäten bezogen auf einen Maximalwert an Inhibition. Im Falle der antifungalen und antibakteriellen Aktivität wurden die erzielten Ergebnisse zu den Maximalwerten der Positivkontrollen Streptomycin, Gentamycin und Nystatin (Tab.M4) in Bezug gesetzt, für den Brine Shrimp Assay auf die maximale Letalität von 100 % bezogen.

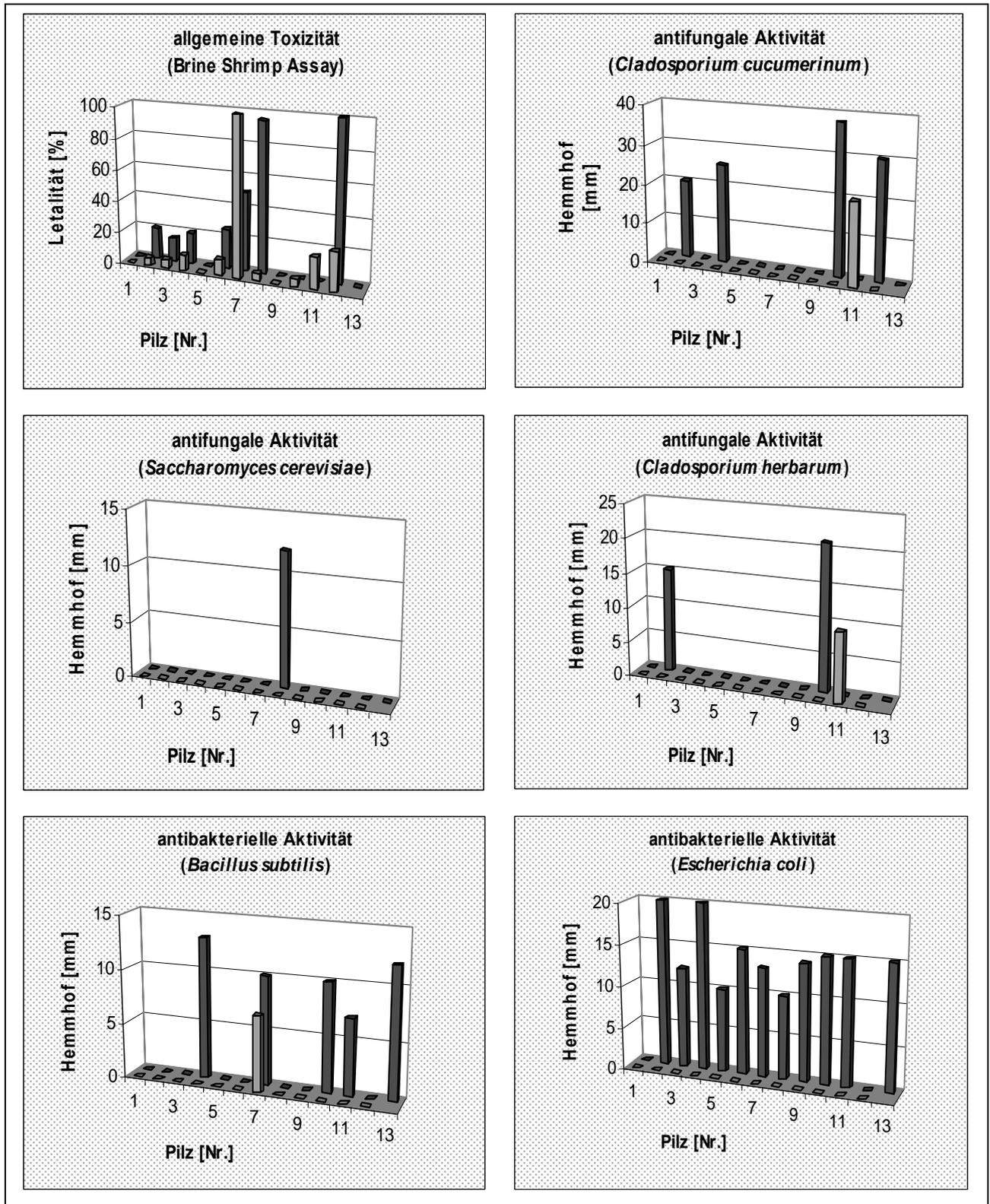


Abb.E57: Allgemeine Toxizität, antifungale und antibakterielle Aktivität im Vergleich

- (hi.) algenassoziierte Pilze der tropischen Klimate (Indischer Ozean; Kerala)
- (v.) algenassoziierte Pilze der gemäßigten Klimate (Pazifischer Ozean; Qingdao)

Pilz [Nr.] entsprechend der Reihenfolge der aufgeführten Spezies in Tab.E1 und Tab.E11

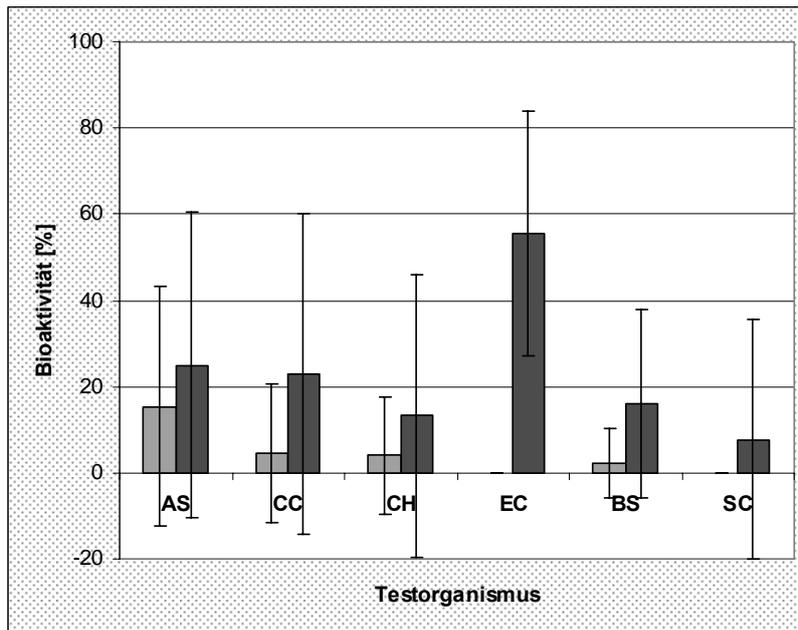


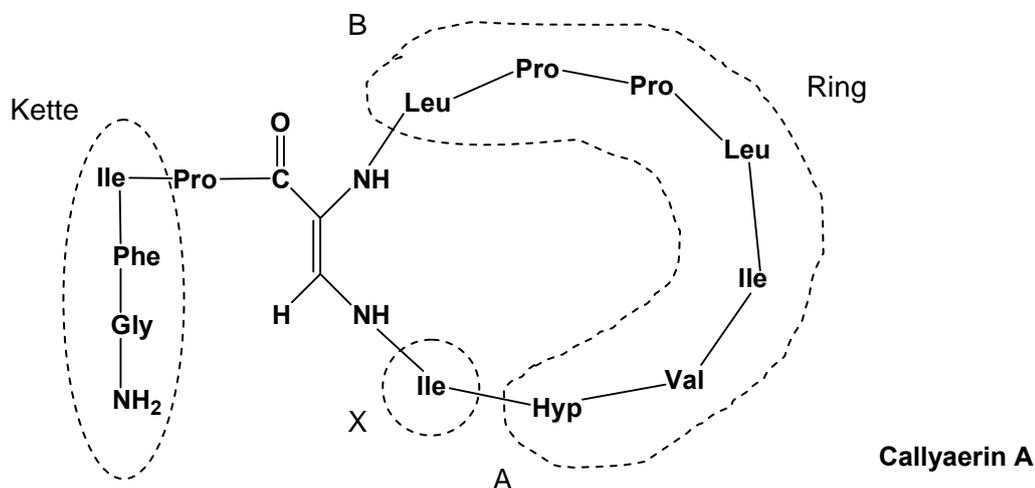
Abb.E58:

Relative Bioaktivitäten im Vergleich;

AS=*Artemia salina* (Brine Shrimp Assay); CC=*Cladosporium cucumerinum*,
 CH=*Cladosporium herbarum*, EC=*E.coli*, BS=*B.subtilis*, SC=*Saccharomyces cerevisiae*
 ■ algenassoziierte Pilze der gemäßigten Klimate (Pazifischer Ozean; Qingdao)
 ■ algenassoziierte Pilze der tropischen Klimate (Indischer Ozean; Kerala)

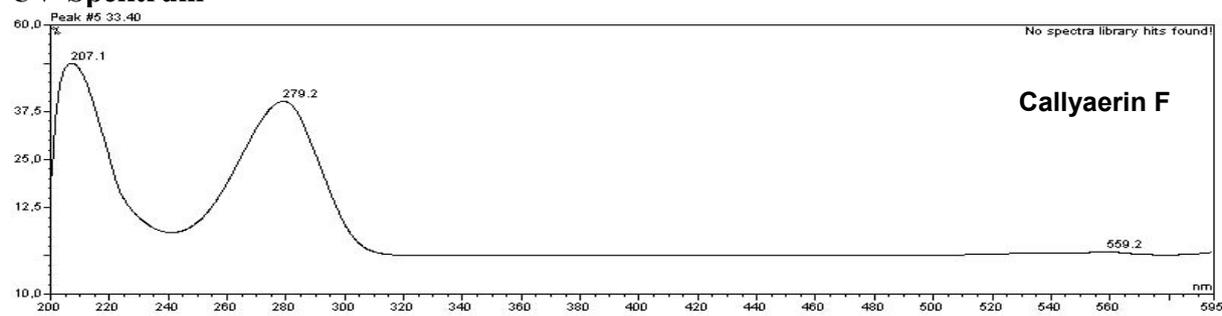
3.6. Bestimmung der absoluten Konfiguration der Schwamminhaltsstoffe Callyaerin A-F

Callyaerin A-F	
Probencode:	(A) 121r; (B) 123r; (C) 951r; (D) 119r, 462g; (E) 453g; (F) 454g
Quellorganismus:	<i>Callyspongia aerizusa</i> (mariner Schwamm)
Substanzmenge [mg]:	(A) 15.3; (B) 10.1; (C) 9.9; (D) 6.3; (E) 1.8; (F) 1.2
Beschreibung:	(A-E) weißes Pulver
Molekulargewicht:	(A) 1356; (B) 1280; (C) 1268; (D) 1386; (E) 1262; (F) 1094
Retentionszeit HPLC [min] (Standard-Gradient):	(A) 34.16; (B) 34.48; (C) 33.27; (D) 33.45; (E) 33.79; (F) 33.38



No.	X	Ring A nach B	Kette
(A)	Ile	Hyp-Val-Ile-Leu-Pro-Pro-Leu	Ile-Phe-Gly-NH ₂
(B)	Ile	Hyp-Ile-Ile-Leu-Pro-Pro-Leu	Ile-Ile-NH ₂
(C)	His	Hyp-Leu-Leu-Pro-Pro-Val	Leu-Phe-Gly-NH ₂
(D)	Ile	Ile-Phe-Pro-Hyp-Pro-Leu	Ile-Asn-Ala-Ile-NH ₂
(E)	Leu	Pro-Phe-Phe-Pro-Pro-Val	Ile-Ile-Gly-NH ₂
(F)	Val	Pro-Val-Phe-Pro	Leu-Phe-Ile-NH ₂

UV-Spektrum



Die vorliegenden Cyclopeptide Callyaerin A-F wurden von Cho-Cho Min an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aus dem Indonesischen Schwamm *Callyspongia aerizusa* isoliert. Es handelt sich hierbei um neue Naturstoffe, die sich durch die für Peptide ungewöhnliche, ungesättigte Aminosäure (Z)-2,3-Diamino-2-propensäure auszeichnen [Ibrahim und Teuscher *et al.*]. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die absolute Konfiguration dieser sechs Verbindungen aufzuklären. Dies wurde nach erfolgter Hydrolyse der Peptide mithilfe der Marfey-Methode durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglichte es, mithilfe des diastereomeren Reagenzes FDAA (1-Fluor-Dinitrophenyl-5-L-Alanin) die enantiomeren D- und L-Aminosäuren in diastereomere Reaktionsprodukte zu überführen (Abb.E59), die so über die analytische HPLC bzw. LC-MS voneinander getrennt und detektiert werden konnten (Abb.E60).

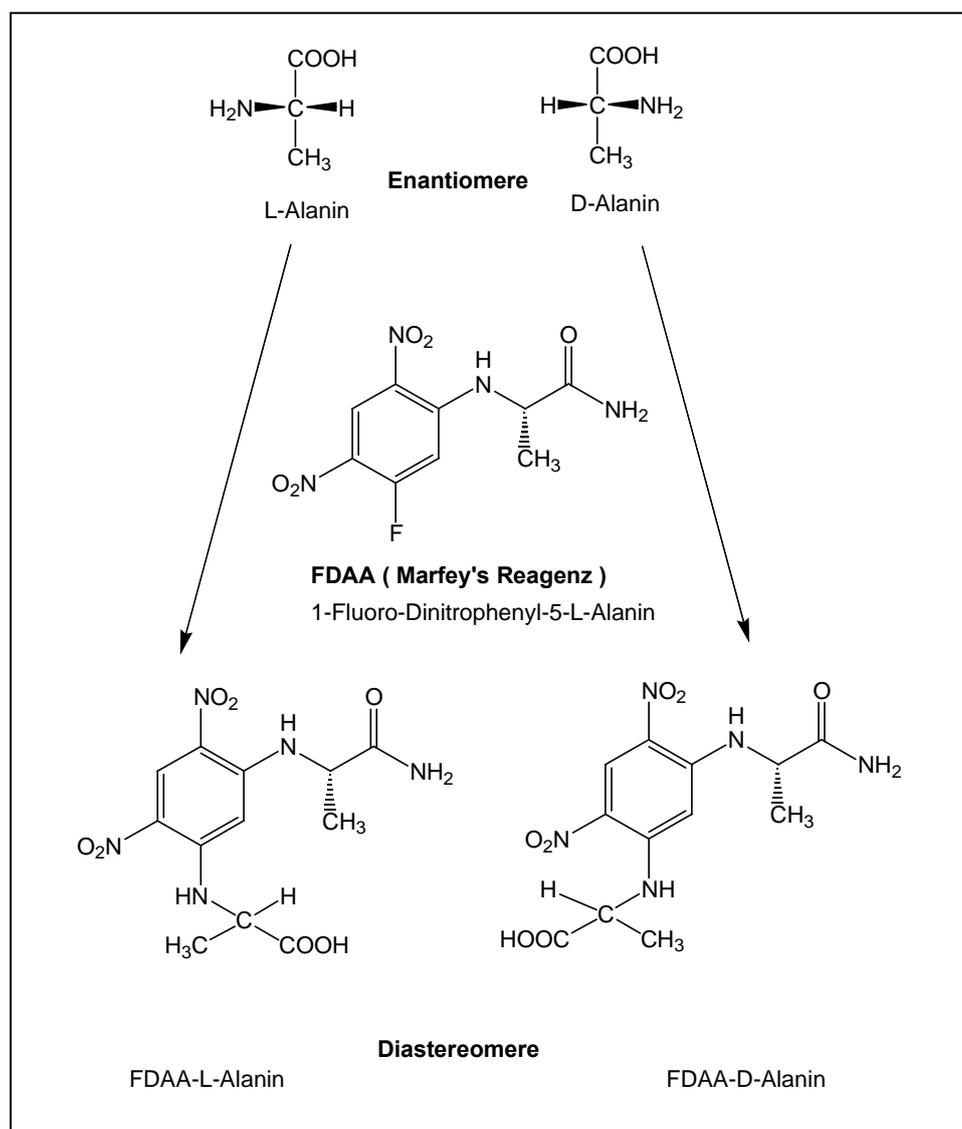


Abb.E59: Prinzip der Umsetzung von Enantiomeren in Diastereomere nach der Marfey-Methode am Beispiel von Alanin

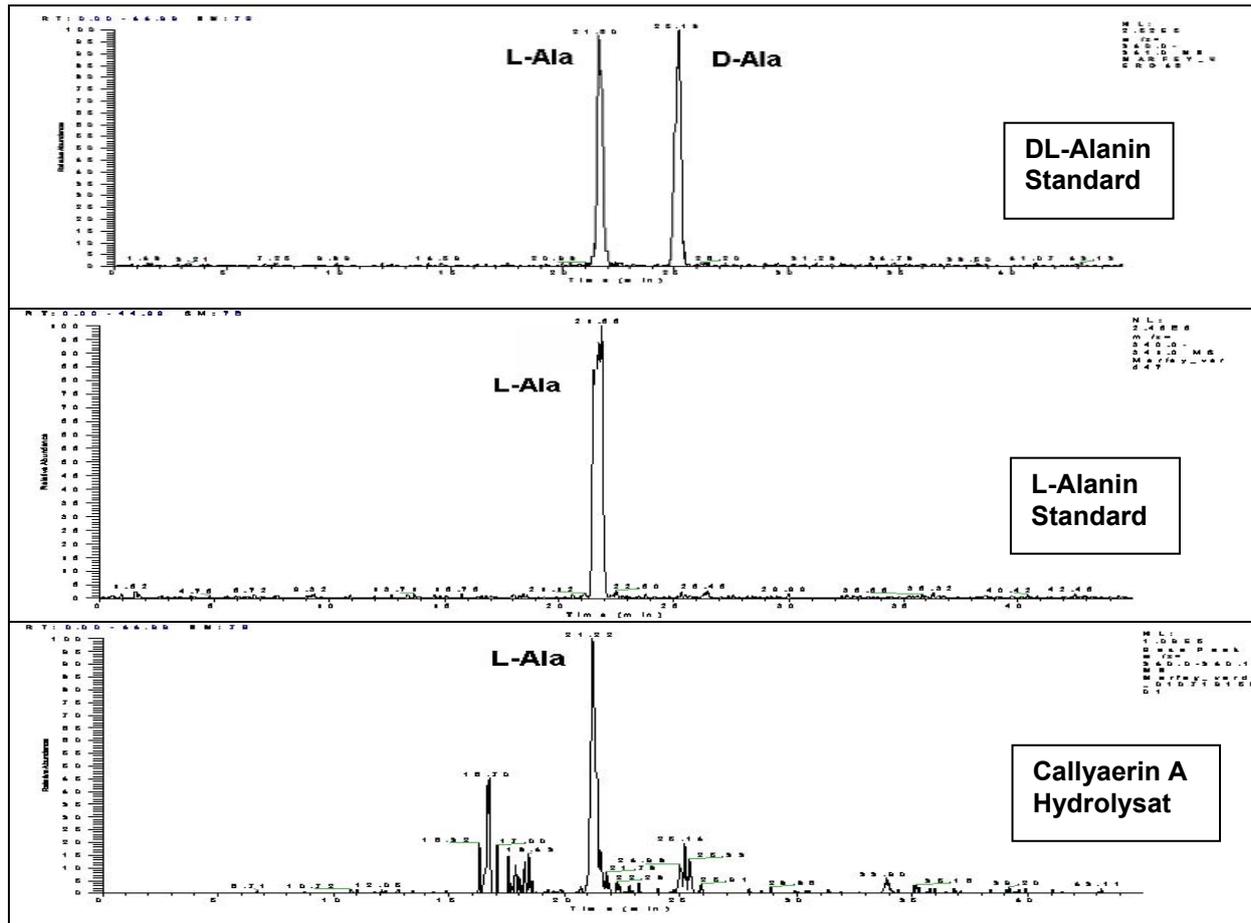


Abb.E60: LC-UV-Spektren der FDAA-Aminosäurestandards (Bsp.DL-Alanin und L-Alanin) und des FDAA-Hydrolysates von Callyaerin A

Sämtliche in Callyaerin A-F enthaltenen Aminosäuren wurden käuflich erworben und sowohl als Racemat wie auch in der L-Form mit dem Marfey-Reagenz FDAA (1-Fluor-dinitrophenyl-5-L-Alanin) umgesetzt und anschließend an der LC-MS vermessen. So konnten die D- und L-Form durch die Umsetzung zu Diastereomeren voneinander unterschieden und ihre Retentionszeiten im LC-Chromatogramm festgelegt werden (Tab.E30). Durch Vergleich der Retentionszeiten der FDAA-Aminosäure-Standards mit den FDAA-Hydrolysaten der Callyaerine konnte dann bestimmt werden, ob es sich jeweils um die D- oder L-Form der in den Callyaerinen enthaltenen Aminosäuren handelte. Die Identität der Aminosäuren konnte über das Molekulargewicht, das jeweils dem Massenspektrum entnommen wurde, sowie mithilfe des UV-Spektrums überprüft werden. Die LC-MS-Chromatogramme der FDAA-Aminosäure-Standards in Messung 1 wurden unter Verwendung identischer Parameter vermessen wie für Callyaerin A, B und F, und die FDAA-Aminosäure-Standards in Messung 2 wie für Callyaerin C, D und E. So konnte festgestellt werden, dass in allen Callyaerinen ausschließlich die L-Konfigurationen der Aminosäuren vertreten waren. Lediglich die

Konfiguration von Leucin in Callyaerin F und Asparagin in Callyaerin D ließ sich nicht eindeutig bestimmen, da diese beiden Aminosäuren HPLC-MS-analytisch nach erfolgter Hydrolyse nicht mehr in ausreichender Konzentration detektiert werden konnten.

Aminosäure- Standards	1 (A,B,F)	CAE (A)	CAE (B)	CAE (F)	2 (C,D,E)	CAE (C)	CAE (D)	CAE (E)
L-Phe	35.27	35.25		35.23	35.13	34.95	34.98	35.14
D-Phe	38.94				38.94			
L-Ala	22.38				21.60		21.58	
D-Ala	25.76				25.18			
L-Ile	34.43	34.03	34.05	34.04	33.75		33.79	34.02
D-Ile	39.59				38.95			
L-allo-Ile	34.12				33.78			
D-allo-Ile	39.28				38.89			
L-Leu	35.31	34.98	35.02	?	34.51	34.77	34.71	34.91
D-Leu	40.00				39.33			
trans-L-Hyp	12.75	12.24	12.34		11.97	11.96	11.98	
trans-D-Hyp	11.00				10.17			
cis-L-Hyp	15.08				14.24			
cis-D-Hyp	14.26				13.41			
L-Pro	22.48	22.40	22.73	22.49	22.20	22.12	22.16	22.15
D-Pro	23.77				23.51			
L-Asn	14.92				14.72		?	
D-Asn	15.10				14.95			
L-Val	29.83	29.43		29.38	29.10	29.07		29.35
D-Val	34.90				34.21			
L-His	13.66				13.68	13.31		
D-His	10.82				10.78			
Gly	19.54	19.43			19.72	19.20		19.40

Tab.E30: Retentionszeiten [min] der LC-MS-Chromatogramme der FDAA-Aminosäure-Standards und der FDAA-Aminosäuren der Callyaerin-Hydrolysate

3.6.1. Bestimmung der biologischen Aktivität von Callyaerin A-F

Alle sechs Substanzen wurden zusätzlich auf eine mögliche antibiotische und zytotoxische Wirkung getestet.

A. Antibiotische Aktivität

Die antibiotische Aktivität der sechs vorliegenden Callyaerine wurde mithilfe der Testorganismen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* untersucht. Dabei wurde eine Konzentration von 5 mg/ml gewählt, getestet wurde in jeweils zwei verschiedenen Volumina von 5 µl und 10 µl (entspricht 25 bzw. 50 µg an Reinsubstanz). Besonders Callyaerin E erwies sich als aktiv gegen sämtliche aufgeführte Testorganismen. Die stärkste Aktivität gegenüber dem Hefepilz *Candida albicans* zeigte Callyaerin A.

Callyaerin	SA 5µl-10µl	BS 5µl-10µl	EC 5µl-10µl	CA 5µl-10µl
(A)	9 -- 9	0 -- 0	10--15	25--30
(B)	11--11	0 -- 0	7 --10	15--15
(C)	0 -- 0	7 --10	0 -- 0	0 -- 0
(D)	0 -- 0	12--12	0 -- 0	0 -- 7
(E)	9 --10	15--17	9 --11	20--20
(F)	0 -- 7	0 -- 9	0 -- 0	0 -- 0

Tab.E31: Ergebnisse der Biotests der Callyaerine A-F (Durchmesser des Hemmhofes[mm])
SA = *Staphylococcus aureus*, BS = *Bacillus subtilis*, EC = *Escherichia coli*, CA = *Candida albicans*

B. Zytotoxische Aktivität

Auf zytotoxische Aktivität wurde Callyaerin A getestet. Durchgeführt wurden die Untersuchungen am DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig von der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Steube. Für die Tests wurden die Zelllinien THP-1, HL-60, NB-4 (Leukämiezellen); HeLa, HeLa-S3, KB (Cervixcarcinome); T4 (Blasenkarzinom); 42-MG-BA (Glioblastom) und RH-30 (Rabdomyosarkom) verwendet. Es konnte mit der MTT-Methode keine signifikante Wachstumshemmung nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Die marine Naturstoffforschung, speziell auf dem Gebiet der marinen Mikrobiologie, wird vor allem mit folgenden Fragestellungen konfrontiert:

- Welche Art von marinen Pilzen lassen sich aus Algen, Schwämmen und Mangroven isolieren?
- Welche Aussagen lassen sich hinsichtlich der chemischen Diversität und der biologischen Aktivität von Naturstoffen aus dieser Organismengruppe treffen?
- Welchen Einfluss haben externe Faktoren, wie Klima und Biodiversität des Habitats, auf den Stoffwechsel mariner Pilze?
- Welche Rolle spielen Faktoren wie Salzgehalt des Mediums und Zeitpunkt der Probenahme für die Wahl geeigneter Kultivierungsbedingungen?
- Welchen Beitrag leisten endophytische Pilze bzw. Pilze mariner Herkunft zur Biosynthese von Sekundärstoffen ihrer Wirtsorganismen?

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte sollen auch die Ergebnisse dieser Dissertation diskutiert und so in den Gesamtkontext der bereits auf dem Gebiet der marinen Naturstoffforschung vorliegenden Erkenntnisse eingeordnet werden.

4.1. Algen, Schwämme und Mangroven als Quelle mariner Pilze

Um neuartige Mikroorganismen bzw. Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Produktion neuartiger Sekundärstoffe isolieren zu können, war es wichtig, bei der Wahl der Wirtsorganismen gezielt vorzugehen. Für die Isolierung von Endophyten aus Pflanzen gibt Strobel [Strobel *et al.* 2004] als viel versprechende Quellen an:

- (1) Pflanzen aus Lebensräumen mit besonderen und ungewöhnlichen Umgebungsbedingungen
- (2) Pflanzen, die in Gebieten mit großer Biodiversität leben
- (3) Endemische Pflanzen
- (4) Pflanzen mit ethnobotanischer Historie

Speziell die ersten beiden Punkte treffen auf das marine Habitat, besonders die tropischen Ozeane, zu, aus dem auch die in dieser Arbeit untersuchten Wirtsorganismen ausgewählt wurden - Algen, Schwämme und Mangroven. Gemeinsam ist ihnen allen, dass sie zumindest temporär dem Meerwasser ausgesetzt sind, und demzufolge, wie bereits in der Einleitung dargelegt, spezielle Anpassungsstrategien entwickelt haben, die in großem Maße zur Produktion biologisch aktiver Sekundärstoffe beitragen. So konnte eine große Anzahl von Pilzstämmen verschiedener Spezies aus den genannten Organismen isoliert werden, die darüber hinaus durch ihre große chemische Diversität imponieren.

Dass der Begriff „mariner Pilz“ nicht eindeutig definiert ist, wurde bereits in der Einleitung dargestellt. So handelt es sich ebenfalls bei den in dieser Arbeit isolierten Pilzstämmen größtenteils um Pilze, die auch aus dem terrestrischen Habitat beschrieben worden sind. Trotzdem sind derartige fakultativ marine Pilze von besonderem Interesse, da sie sich im Laufe der Zeit den besonderen Bedingungen des marinen Habitats und seiner großen Biodiversität unter Ausbildung verschiedener Adaptations- und Verteidigungsmechanismen angepasst haben. Ein Vergleich von terrestrischen und marinen *Aspergillus sydowii*-Stämmen ergab beispielsweise, dass die marinen Spezies pathogen auf die Fächerkoralle *Gorgonia* ssp. wirkten, die terrestrischen Spezies dagegen nicht [Alker *et al.* 2001].

Das ständig präsente Risiko des Auftretens von Kontaminationen, beispielsweise der Isolierung epiphytischer Mikroorganismen, konnte durch sorgsame Oberflächensterilisierung weitestgehend ausgeschlossen werden. Der Isolierung der in dieser Arbeit beschriebenen Mikroorganismen vorangegangen war die Optimierung der Sterilisierungs- und Kultivierungsbedingungen mithilfe zahlreicher terrestrischer wie auch mariner Mikroorganismen. Zusätzlich wurden parallel zu jeder durchgeführten Oberflächensterilisierung mehrere Kontrollplatten angefertigt, die in allen Fällen negativ ausfielen. Außerdem konnte sehr häufig beobachtet werden, wie das Myzelium direkt aus den auf den Agarplatten platzierten Gewebestücken herauswuchs.

4.2. Marine Pilze als Produzenten chemisch diverser, bioaktiver Naturstoffe

Die Diversität sowohl der Mikroorganismen wie auch der von ihnen gebildeten Naturstoffe konnte nicht zuletzt durch die Tatsache belegt werden, dass selbst Pilze identischer Spezies, aber unterschiedlicher geographischer Herkunft oder verschiedener Wirtsorganismen für gewöhnlich ein unterschiedliches Inhaltsstoffmuster aufwiesen. Die gebildeten Sekundärstoffe wiederum ließen sich den verschiedensten Stoffgruppen zuordnen, wie im Folgenden gezeigt wird (4.2.1.-4.2.6.). Es konnten sowohl Amine als auch Indolderivate, Steroide, Sesquiterpene, Isocumarine, Chinolinone und chlorierte Verbindungen in diesen Pilzen mariner Herkunft nachgewiesen werden, darunter auch zwei bislang noch unbekannte Cyclopentanoide. Weiterhin weisen viele der isolierten Sekundärstoffe eine große Bandbreite an Bioaktivitäten auf. In eigenen Tests, sowie in zusätzlich aus der Literatur entnommenen Biotests konnte für verschiedene Substanzen vor allem antibakterielle, antimykotische und zytotoxische, aber auch phytotoxische, insektizide, antioxidative, immunsuppressive, antivirale, tremorgene und Antimalaria-Aktivität festgestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen somit das große Potential von Mikroorganismen mariner Herkunft als Produzenten chemisch diverser, biologisch aktiver Sekundärstoffe bei der Suche nach Leitstrukturen für neuartige Wirkstoffe.

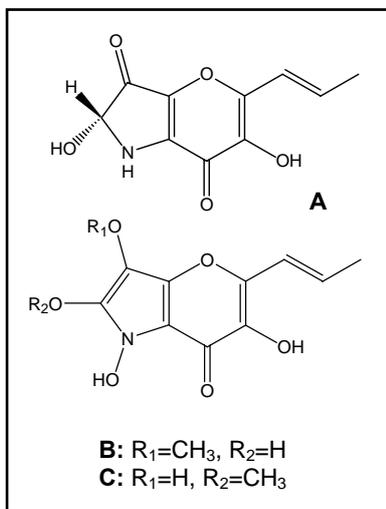
Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten algen- sowie schwammassoziierten Pilzstämmen gehört den Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Cladosporium* und *Alternaria* an, deren Vertreter ubiquitär verbreitet sind und sowohl für Bodenproben und Raumluft sowie auch als Mykoflora von Pflanzen, hier besonders als Pathogene von Nutzpflanzen, beschrieben wurden. Verschiedene *Aspergillus*- und *Fusarium*- Stämme finden auch in der industriellen Herstellung von Enzymen, Mykotoxinen und rekombinanten Proteinen Anwendung [Gibbs *et al.* 2000]. Einige Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* und *Alternaria* sind weiterhin als Verursacher von allergischen Reaktionen und Infektionen beim Menschen, bevorzugt bei immunsupprimierten Patienten beschrieben worden [Pievková und Jesenská 1999]. Aufgrund der weiten Verbreitung dieser terrestrischen Spezies der aufgeführten Gattungen ist eine Untersuchung von aus dem marinen Habitat isolierten Stämmen besonders interessant. Im Rahmen dieser Arbeit konnten beispielsweise aus der bereits gut untersuchten Gattung *Aspergillus* zwei neue Naturstoffe (S15 und S16) isoliert, sowie die bisher nur aus einem anderen Pilz mariner Herkunft bekannten Naturstoffe Pyranonigrin A,B und C hier zum zweiten Mal nachgewiesen werden.

4.2.1. Naturstoffe der Gattung *Aspergillus*

A. Inhaltsstoffe von *Aspergillus niger* (ENI-P2)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus einem mit der marinen Braunalge der Gattung *Padina* assoziierten *Aspergillus niger* die Naturstoffe Pyranonigrin A, B und C sowie Fonsecin isoliert werden.

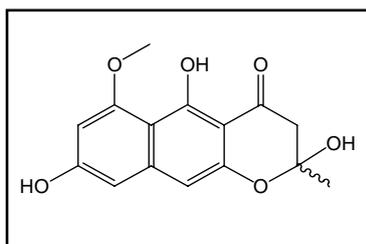
Pyranonigrin A,B,C



Pyranonigrin A-D wurde erstmalig aus einem mit dem Mittelmeerschwamm *Axinella damicornis* assoziierten *Aspergillus niger*-Stamm isoliert [Hiort *et al.* 2004]. Obwohl *Aspergillus* sp. zu einer sehr gut untersuchten Gruppe von Mikroorganismen gehört, sind derartige Naturstoffe für Stämme dieser Gattung vorher noch nicht beschrieben worden. Umso erstaunlicher ist es, dass diese Pyranopyrrole mit einer neuartigen, von Indol abgeleiteten Gerüststruktur, im Rahmen dieser Arbeit bereits zum zweiten Mal in einem Pilz mariner Herkunft nachgewiesen werden konnten. Der

hier untersuchte *Aspergillus-niger* stammte aus einer Braunalge des tropischen Indischen Ozeans der Gattung *Padina* und war somit zusätzlich von geographisch unterschiedlicher Herkunft. Trotzdem ließen sich auch in diesem Pilz die Pyranonigrine A, B und C nachweisen. Alle anderen für den Schwammpilz beschriebenen Verbindungen (Cycloleucomelon, ein Biscoumarin-Derivat, und Aspernigrin A und B) fanden sich dagegen nicht in der algenassoziierten Spezies.

Fonsecin

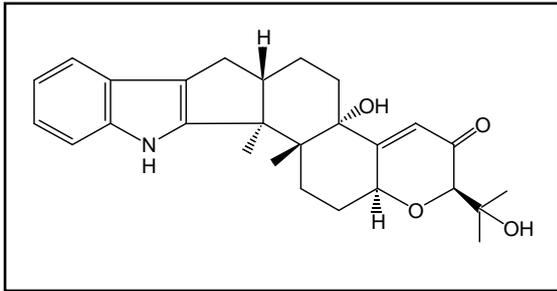


Dieses Naphthochinon wurde bisher aus *Aspergillus* var. *niger* beschrieben. Es handelt sich bei dieser Substanz um ein bekanntes Mykotoxin. Die Verbindung wurde auf antibiotische und antifungale Aktivität getestet und zeigte dabei eine dem Penicillin vergleichbare Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis*.

B. Inhaltsstoffe von *Aspergillus hollandicus* (syn. *Eurotium amstellodami*) (ENI-C1)

In der vorliegenden Arbeit wurde *Aspergillus hollandicus* aus der marinen Grünalge *Caulerpa peltata* isoliert. Das Inhaltstoffspektrum wurde von dem Mykotoxin Paxillin dominiert.

Paxillin



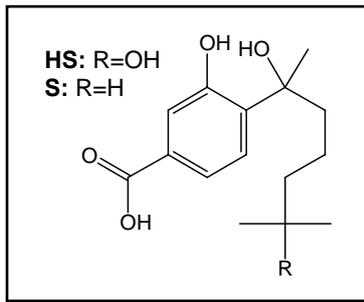
Die Substanz wurde bereits als Metabolit von *Penicillium paxilli* [Springer *et al.* 1980], einem mit verschiedenen Gräsern assoziierten Endophyten, sowie *Acremonium lorii*, *Emericella foveolata*, *Emericella desertorum* und *Emericella striata* beschrieben, im Rahmen

dieser Arbeit erstmalig für einen Pilz der Gattung *Aspergillus*. Paxillin besitzt eine Indolditerpen-Struktur. Derartige Sekundärmetabolite entstehen biosynthetisch für gewöhnlich durch Epoxidierung von 3-Geranylgeranylindol mit anschließender Cyclisierung, für Paxillin konnte dieser Biosyntheseweg ebenfalls nachgewiesen werden [Fueki *et al.* 2004]. Paxillin stellt ein bekanntes Mykotoxin ($ED_{50} > 25$ mg/kg) mit tremorgener Wirkung dar [Springer *et al.* 1980].

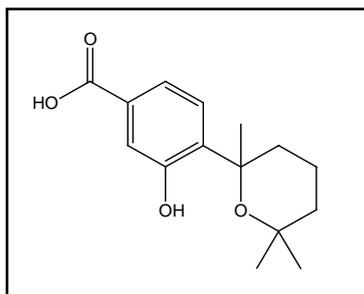
C. Inhaltsstoffe von *Aspergillus sydowii* (ENI-A1)

Aspergillus sydowii wird als einer der Verursacher der durch die globale Erwärmung induzierten Korallenbleiche in den tropischen Meeren, speziell als Hauptverursacher der Aspergillose bei der Fächerkoralle (*Gorgonia* spp.), beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass terrestrische Stämme dieses fakultativ marinen Pilzes im Gegensatz zu marinen Stämmen keine pathogene Wirkung auf die Korallen ausübten [Geiser *et al.* 1998]. Dies könnte durch die Resistenzentwicklung mariner Stämme gegenüber antifungalen Inhaltsstoffen der Fächerkoralle erklärt werden.

Bei dem hier isolierten Stamm handelt es sich um einen marinen Vertreter assoziiert mit der tropischen Rotalge *Acantophora spicifera*. Es konnten zwei neue Naturstoffe sowie die bekannten, biogenetisch miteinander verwandten Sekundärstoffe Sydonsäure, Hydroxysydonsäure und Sydowsäure isoliert werden.

Hydroxysydonsäure, Sydonsäure

Hydroxysydonsäure wurde ebenso wie Sydonsäure erstmals 1978 von Hamasaki *et al.* aus *Aspergillus sydowii* isoliert. Die Struktur der Substanz stellt ein aromatisches Sesquiterpen dar. Sie wurde auf antibiotische und antifungale Wirkung getestet, wies jedoch keine nennenswerte Aktivität auf.

Sydowsäure

Bei Sydowsäure handelt es sich um ein zyklisiertes Derivat der Hydroxysydonsäure (siehe oben). Die Verbindung wurde bisher ausschließlich für *Aspergillus sydowii* beschrieben [Hamasaki *et al.* 1978].

S15, S16

Mit den 2,5-Diarylcyclopentenonen S15 und S16 konnten zwei neue Naturstoffe isoliert werden. Strukturell verwandte Verbindungen sind unter den Naturstoffen nur selten zu finden. Cyclopentanoide sind lediglich als Pigmente einiger höherer Pilze der Ordnung Boletales, wie *Paxillus involutus* (Basidiomyceten), bekannt. Strukturelle Ähnlichkeit besitzen darunter besonders Chamonixin, Gyropurin und Gyrocyanin (Abb.D1) [Gill und Steglich 1987]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Naturstoffe erstmalig aus Ascomyceten isoliert werden. Besonders ungewöhnlich sind dabei die Chlorsubstituenten der beiden Strukturen. Für die Biosynthese von Pentanoiden wird die Kondensation von zwei 4-(Hydroxyphenyl)pyruvat-Einheiten angenommen, über die Bildung eines α -Hydroxycarboxylates als Zwischenstufe und anschließender Decarboxylierung. Im Falle von Gyrocyanin erfolgt die Decarboxylierung dabei oxidativ [Gill und Steglich 1987]. Eine Keto-Enol-Tautomerie ist für alle Substanzen wahrscheinlich.

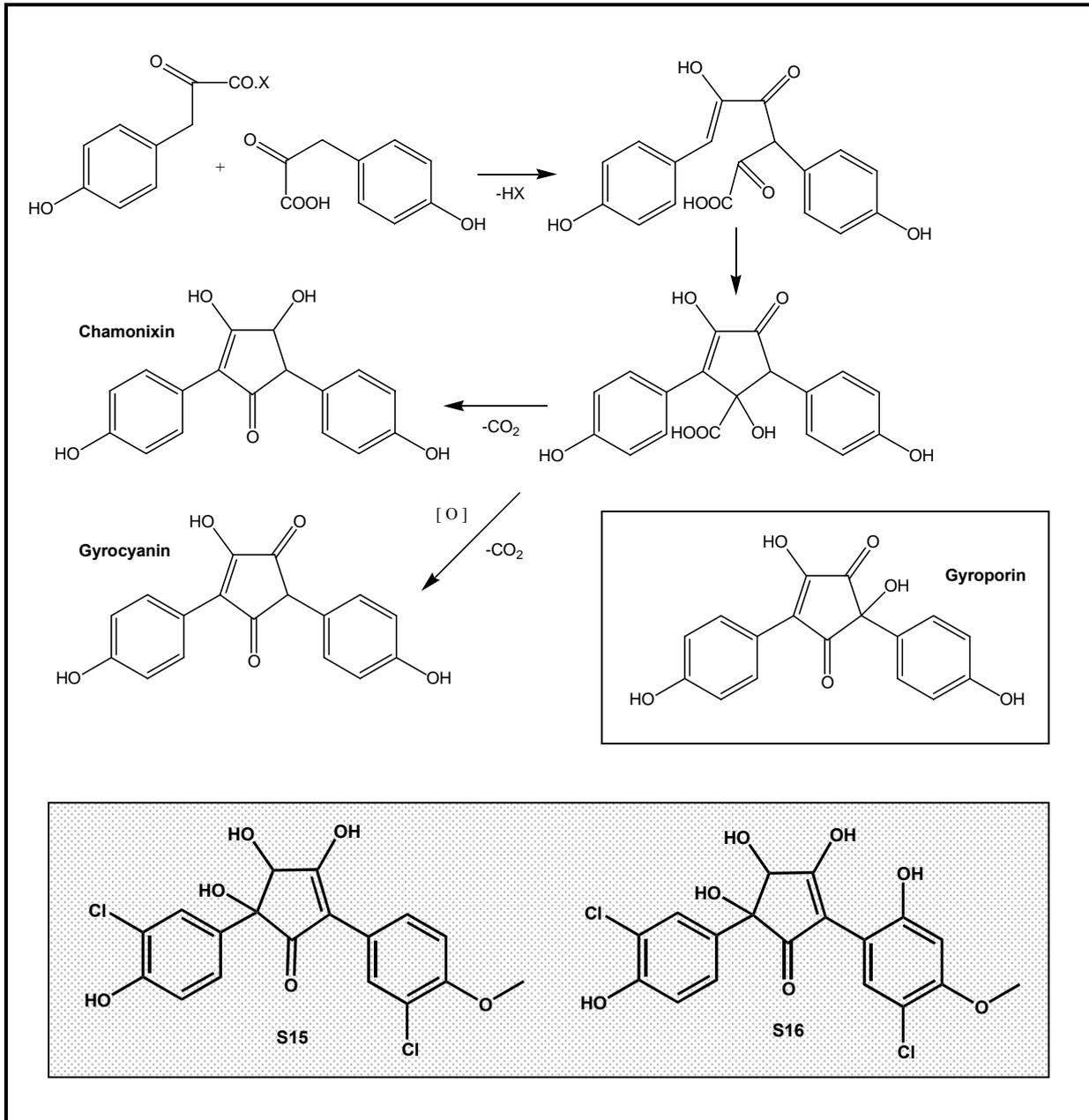


Abb.D1: Strukturell verwandte Verbindungen von S15 und S16 und mögliche Biosynthese [Gill und Steglich 1987]

D. Inhaltsstoffe von *Aspergillus terreus* (ENI-P5)

Der hier vorliegende Vertreter der Gattung *Aspergillus* war mit der tropischen Braunalge *Padina gymnospora* assoziiert. Sein Inhaltsstoffspektrum wurde eindeutig von dem Naturstoff Dihydrogeodin dominiert.

Dihydrogeodin

Die Substanz wurde erstmals als Metabolit von *Aspergillus terreus* var. *aureus* beschrieben [Kiryama *et al.* 1977]. Strukturell verwandte Verbindungen sind Sulochrin (Abb.D2) und Monochlorosulochrin aus *Penicillium frequentans* bzw. *Aspergillus terreus*. Keine dieser Verbindungen wurde jedoch von der untersuchten *Aspergillus terreus*-Kultur produziert. Für Dihydrogeodin wird postuliert, dass die Biosynthese dieses Chlorbenzophenons, die von der Synthese der zwei substituierten Benzolringe aus Acetat- und Malonat-Einheiten ausgeht, über Emodinanthron, Emodin, Questin und Sulochrin als Zwischenstufen verläuft (Abb.D2) [Curtis *et al.* 1972]. Die Substanz zeigte sich antibiotisch aktiv gegen den Testkeim *Bacillus subtilis*. Auch in der Literatur wird für die Substanz eine starke antibakterielle sowie antifungale Aktivität gegen diverse Keime beschrieben [Inamori *et al.* 1983].

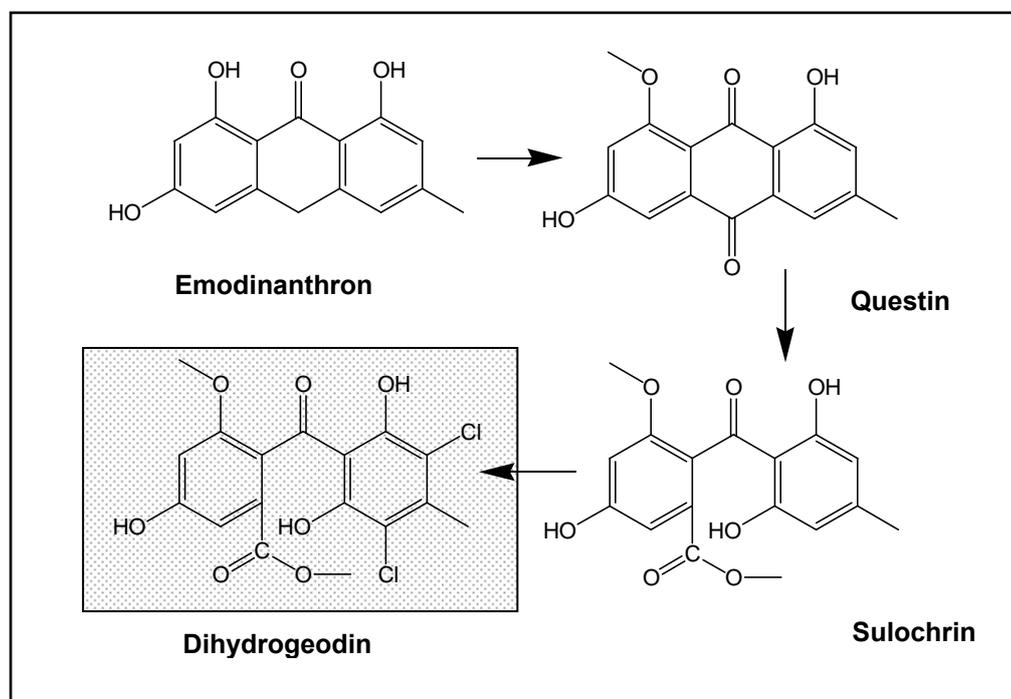


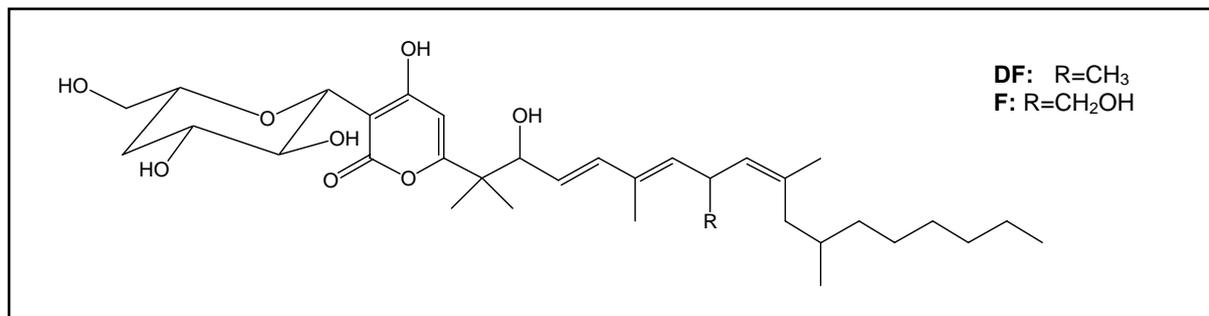
Abb.D2: Biosynthese von Dihydrogeodin ausgehend von Emodinanthron [Curtis *et al.* 1972]

4.2.2. Naturstoffe der Gattung *Fusarium*

A. Inhaltsstoffe von *Fusarium semitectum* (ENI-P9)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Sekundärstoffe Fusapyron und Deoxyfusapyron aus dem mit einer tropischen Spezies der Braunalge *Padina* assoziierten *Fusarium semitectum*-Stamm isoliert werden. Der Extrakt dieses Pilzes zeigte potente antibiotische sowie antifungale Aktivität.

Fusapyron, Desoxyfusapyron

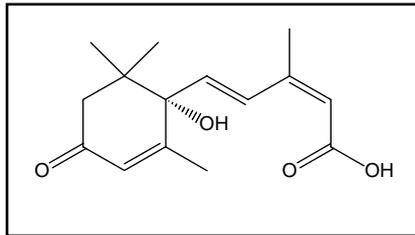


Diese beiden α -Pyrone-Derivate wurden erstmalig aus einem *Fusarium semitectum*-Stamm als Verursacher der Sprossfäule beim Mais isoliert [Evidente *et al.* 1994] und sind weiterhin bekannt aus einem Stamm mariner Herkunft der Gattung *Acremonium*. Für die Substanzen wird eine starke antifungale Aktivität sowie moderate Zootoxizität im „Brine Shrimp Assay“ beschrieben. Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen [Altomare *et al.* 2004] belegen, dass die Toxizität in enger Beziehung zur Hydrophobie der Strukturen steht. In umfangreichen Studien zur Bioaktivität von Fusapyron und Desoxyfusapyron wurde festgestellt, dass die Substanzen gute inhibitorische Aktivität gegen Mykosen beim Menschen zeigen und somit potentielle Kandidaten für die biotechnologische Anwendung darstellen [Altomare *et al.* 2000]. Die antifungale Aktivität der Pyrone könnte auch die in dieser Arbeit festgestellte starke Bioaktivität des Rohextraktes von *Fusarium semitectum* erklären. Mit den Reinsubstanzen ließ sich das allerdings für die Testorganismen *Cladosporium cucumerinum*, *Cladosporium herbarum* und *Saccharomyces cerevisiae* nicht bestätigen, möglicherweise war die gewählte Konzentration von 5 mg/ml für eine potente Inhibition noch nicht ausreichend bzw. Methanol als Lösungsmittel zu polar, so dass die tatsächlich vorliegende Wirkkonzentration geringer war.

4.2.3. Inhaltsstoffe von ENI-P4

Der aus einer tropischen Spezies der Braunalge *Padina* isolierte marine Pilz war anhand morphologischer Merkmale nicht identifizierbar, da er in Kultur nicht sporulierte. Aus dieser Pilzkultur wurde Abscisinsäure isoliert.

Abscisinsäure



Bei der Struktur dieser Substanz handelt es sich um ein monocyclisches Sesquiterpen, genauer ein Cyclofarnesol, das als Antagonist von Pflanzenwachstumshormonen bekannt ist. Es reguliert hier beispielsweise den jahreszeitlich bedingten Blattfall und das Reifen von

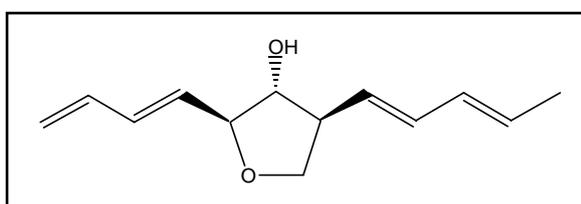
Früchten. Abscisinsäure wurde weiterhin für marine Algen beschrieben [Crouch *et al.* 1993]. Die Substanz konnte aber auch in pflanzenpathogenen Pilzen wie *Cercospora cruenta* [Oritani *et al.* 1985], *Cercospora rosicola* [Assante *et al.* 1977] und *Botrytis cinerea* [Marumo *et al.* 1982] gefunden werden. Die Biosynthese von Abscisinsäure findet auch in Pilzen von Mevalonsäure ausgehend über Isopentenylpyrophosphat als Zwischenstufe über den Isoprenoid-Weg statt [Bennett *et al.* 1981]. Im Biotest zeigte Abscisinsäure keine antibiotische bzw. antifungale Aktivität. Das Vorkommen dieser Substanz in endophytischen Pilzen könnte auch als Hinweis auf die enge Verknüpfung des Stoffwechsels zwischen Endophyt und Wirtspflanze gedeutet werden.

4.2.4. Naturstoffe der Gattung *Chaetomium*

A. Inhaltsstoffe von *Chaetomium globosum* (QEN-2)

Aus einem mit der Rotalge *Gracilaria asiatica* assoziierten *Chaetomium globosum*-Stamm konnte der Sekundärstoff Aureonitol isoliert werden.

Aureonitol



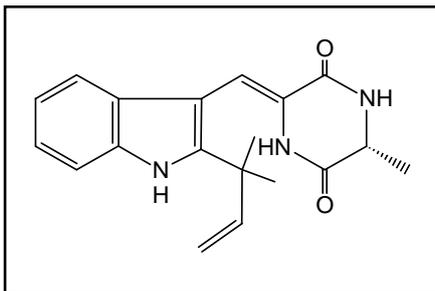
Aureonitol wurde erstmals als Metabolit von *Helichrysum aureo-nitens*, einem Vertreter der Asteraceae isoliert [Bohlmann *et al.* 1979]. Aus einem Pilz (*Chaetomium coarctatum*)

wurde die Substanz zum ersten Mal 1967 von Burrows beschrieben, die Struktur konnte jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Dies gelang 1992 Abraham *et al.*, der eine identische Substanz aus *Chaetomium cochlioides* isolierte und ebenfalls durch Reisolierung der Substanz aus dem von Burrows beschriebenen Pilz die Struktur als Aureonitol bestimmen konnte. Leider wurden keine Angaben zur Herkunft der jeweiligen Pilze gemacht, interessant ist das Vorkommen der Substanz sowohl in Pflanzen als auch in Pilzen. Die Biosynthese verläuft ausgehend von einem 6*R*,7*R*-Epoxid, über einen Aldehyd als weitere Zwischenstufe mit anschließender Reduktion zum Alkohol und nachfolgendem Ringschluss zum Tetrahydrofuran. Die Bioaktivität der Substanz ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden, in durchgeführten antibiotischen Tests zeigte sich die Substanz als nicht aktiv.

B. Inhaltsstoffe von *Chaetomium globosum* (QEN-11)

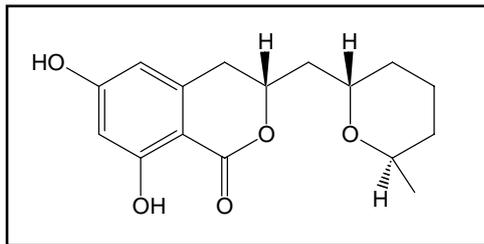
In einem weiteren mit der Rotalge *Polysiphonia arceslate* assoziierten *Chaetomium globosum*-Stamm konnten die Sekundärstoffe Neoechinulin A und Cladosporin sowie vier weitere Derivate des Cladosporins nachgewiesen werden.

Neoechinulin A



Der Erstbeschreibung von Neoechinulin [Barbetta *et al.* 1969] folgte die Isolierung der fünf Neoechinulin-Derivate Neoechinulin A-E [Marchelli *et al.* 1977] ebenfalls aus *Aspergillus amstelodami*. Somit wurde die Substanz hiermit erstmalig für einen Pilz mariner Herkunft der Gattung *Chaetomium* beschrieben. Bei der Substanz handelt es sich um ein Alkaloid mit Didehydropeptid-Struktur aus einem prenylierten Tryptophan-Derivat und Alanin. Damit besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Ergopeptiden des Mutterkornpilzes *Secale cornutum*, die in der medizinischen Praxis aufgrund ihrer vasokonstriktiven Wirkung u.a. Anwendung als Migränetherapeutika finden. Für Neoechinulin A wird eine antioxidative Wirkung beschrieben [Antibase 2004].

Cladosporin (Asperentin) und Derivate



Cladosporin wird für *Cladosporium cladosporioides* [Scott *et al.* 1971], *Aspergillus flavus* und *Aspergillus repens* beschrieben. Die ebenfalls vorliegenden Cladosporin-Derivate 5'-Hydroxyasperentin-8-methylether, 4'-Hydroxyasperentin, 5'-

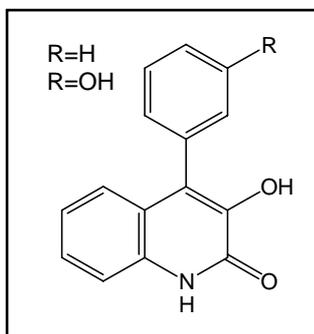
Hydroxyasperentin und Asperentin-8-methylether sind bisher nur als Metaboliten von *Aspergillus flavus* bekannt [DNP 2004]. Die Biosynthese dieser Isocumarin-Abkömmlinge erfolgt über den Acetat-Polymalonat-Weg über eine Polyketid-Zwischenstufe [Cattel *et al.* 1973]. Für Cladosporin wird eine Vielzahl von Bioaktivitäten beschrieben, wie starke antibiotische, insektizide, phytotoxische und moderat immunsuppressive Aktivität sowie eine Wirkung gegen Protozoen [DNP 2004].

4.2.5. Naturstoffe der Gattung *Cladosporium*

A. Inhaltsstoffe von *Cladosporium* sp. (QEN-6)

Aus dem mit der Braunalge *Sargassum thunbergii* assoziierten Pilz der Gattung *Cladosporium* konnten die Naturstoffe Viridicatin, Viridicatol und Cyclophenol isoliert werden.

Viridicatin, Viridicatol



Die beiden Chinolinon-Derivate sind bisher aus *Penicillium viridicatum* und *Penicillium cyclopium* beschrieben worden. Viridicatin zeigt eine starke Bioaktivität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* bis zu einer Verdünnung von 1: 15 000 und ist außerdem aktiv gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Saccharomyces cerevisiae* [DNP 2004]. Die Biosynthese der beiden Substanzen verläuft ausgehend von den Aminosäuren

Anthranilsäure, L-Phenylalanin und Methionin über Cyclophenin als Vorstufe von Viridicatin und über Cyclophenol als Vorstufe von Viridicatol (Abb.D3) [Luckner *et al.* 1980]. Cyclophenol konnte ebenfalls aus dem Extrakt dieser Kultur isoliert werden, Cyclophenin wurde nicht detektiert, möglicherweise war es quantitativ zu Viridicatin umgesetzt worden.

Cyclophenol

Die Substanz wurde bisher beschrieben für *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* und *Penicillium verrucosum* [Hodge *et al.* 1988]. Bei der Struktur handelt es sich um ein Benzodiazepin-Derivat, das über ein Spiroatom mit einem Oxiraning verbunden ist. Die Biosynthese verläuft ebenfalls wie bereits für Viridicatin und Viridicatol beschrieben, ausgehend von Anthranilsäure, L-Phenylalanin und Methionin [Luckner *et al.* 1980]. Der Biosyntheseweg verdeutlicht die enge Verwandtschaft zwischen Cyclophenol mit Viridicatin und Viridicatol. Interessant ist auch die strukturelle Ähnlichkeit von Cyclophenol mit der Arzneistoff-Gruppe der Benzodiazepine, die aufgrund ihrer anxiolytischen, schlafinduzierenden, muskelrelaxierenden und antikonvulsiven Wirkung breite Anwendung in der medizinischen Praxis finden.

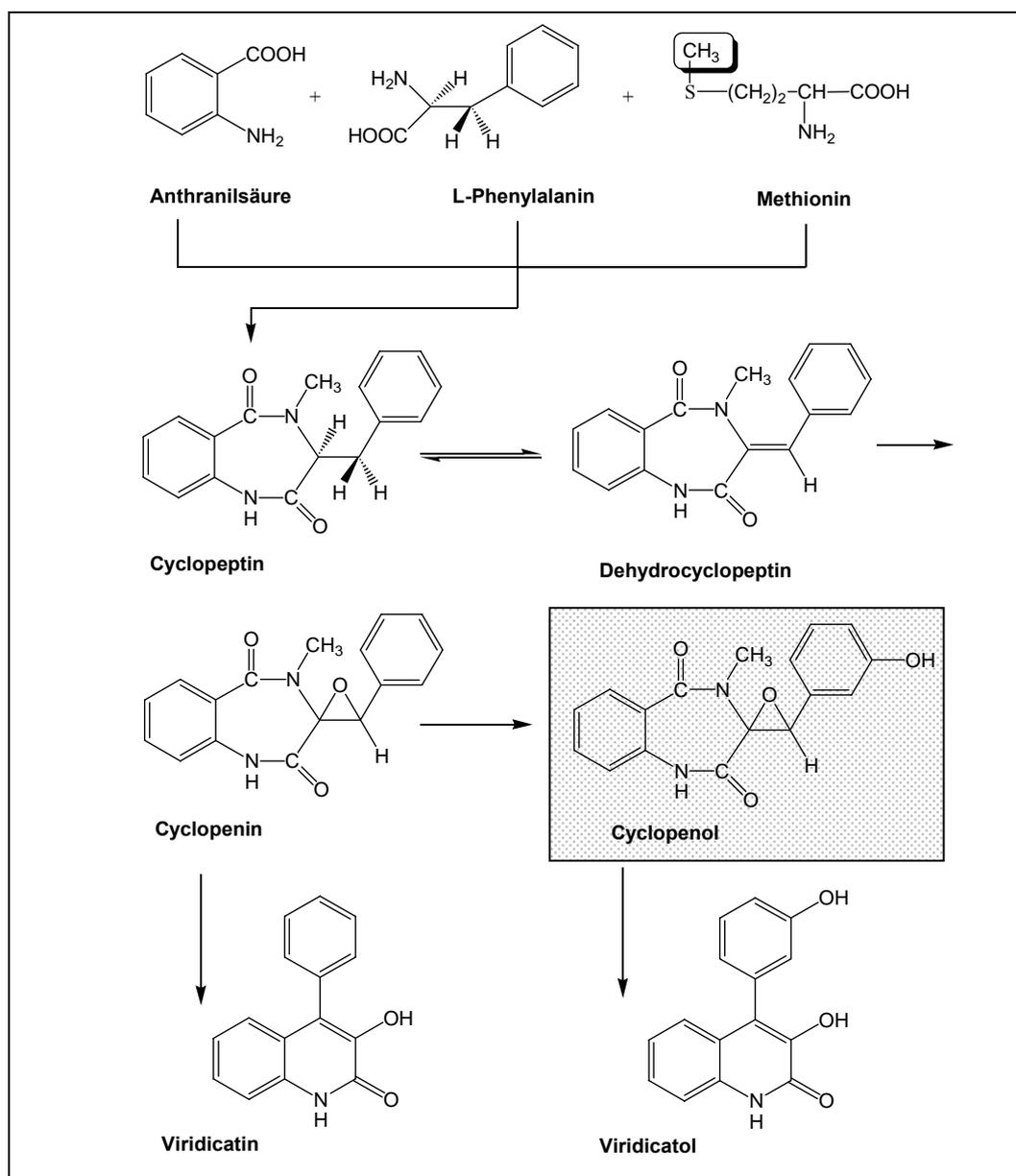


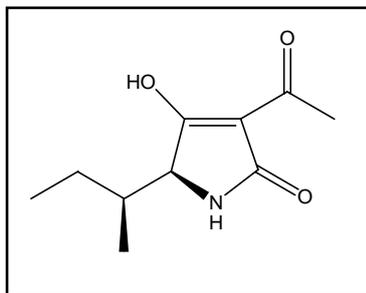
Abb.D3: Biosynthese von Cyclophenol, Viridicatin und Viridicatol [Luckner *et al.* 1980]

4.2.6. Naturstoffe der Gattung *Alternaria*

A. Inhaltsstoffe von *Alternaria tenuissima* (QEN-4)

Für *Alternaria tenuissima* ist das Vorkommen in Pflanzenmaterial bekannt [de Hoog *et al.* 2000]. Aus dem *Alternaria tenuissima*-Stamm, assoziiert mit der Rotalge *Gracilaria asiatica*, wurde das bekannte Mykotoxin Tenuazonsäure isoliert. Die Substanz stellte die Hauptkomponente des Extraktes dar.

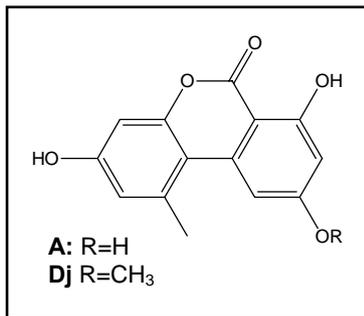
Tenuazonsäure



Tenuazonsäure wurde bereits als Metabolit verschiedener Spezies der Gattungen *Alternaria*, *Aspergillus* und *Sphaeropsidales* beschrieben [DNP 2004]. Die Substanz ist bekannt als Verursacher verschiedener Krankheiten bei Nutzpflanzen wie Blattfäule bei Reis und Tabak. Für Tenuazonsäure ist eine stark insektizide, antineoplastische, antivirale und tremorgene Wirkung beschrieben worden [Cole *et al.* 1981]. In eigenen Tests erwies sich die Substanz ebenfalls als sehr aktiv. So konnte eine stark zytotoxische Wirkung gegenüber Lymphomzellen der Maus und menschlichen Cervixadenomzellen festgestellt werden. Seine therapeutische Nutzbarkeit ist allerdings durch die extrem hohe Toxizität der Substanz eingeschränkt. Die Biosynthese dieses Pyrrolidins geht von L-Isoleucin aus und verläuft über die Zwischenstufe des N-Acetoacetyl-L-Isoleucins. Die Substanz unterliegt der Keto-Enol-Tautomerie, so dass zwei weitere Tautomere vorliegen können [Royles 1995].

B. Inhaltsstoffe von *Alternaria alternata* (SPI-A2)

Die in dieser Arbeit isolierte *Alternaria*-Spezies war mit dem tropischen Schwamm *Axinella tenudigatata* assoziiert. Aus diesem Pilz konnte trotz der unterschiedlichen Herkunft ebenso wie aus dem mit einer Rotalge der gemäßigten Klimate assoziierten Vertreter (4.2.6.A) das Mykotoxin Tenuazonsäure als Hauptinhaltsstoff isoliert werden.

Alternariol, Djalonenson

Diese beiden Dibenzopyron-Derivate wurden bisher in Pilzen nur für *Alternaria tenuis* beschrieben, woraus das Alternariol 1953 von Raistrick *et al.* erstmals isoliert und als Verursacher von Pflanzenkrankheiten bei Papaya und Passionsfrüchten diskutiert wurde, sowie für einem schwammassoziierten *Penicillium citreonigrum*-Stamm [Brauers 2003]. Die Substanz weist phytotoxische Aktivität auf und ist als DNA-interkalierendes Mykotoxin beschrieben worden. Djalonenson wurde auch als Metabolit in *Anthocleista djalonensis* gefunden, einer westafrikanischen Pflanze, die in der traditionellen Medizin aufgrund ihrer antipyretischen, analgetischen, stomachalen und laxierenden Wirkung zur Behandlung verschiedener Krankheiten verwendet wird [Onocha *et al.* 1995]. Hier wirft sich die Frage auf, ob möglicherweise ein Endophyt der eigentliche Produzent der Substanz sein könnte. Aufgrund der Struktur ließe sich dies vermuten, da derartige Substrukturen bevorzugt von Mikroorganismen gebildet werden [DNP 2004]. Die Biosynthese von Alternariol erfolgt ausgehend von einer Polyketidkette über Norlichexanthon als Zwischenstufe (Abb.D4) [Stinson *et al.* 1985]. Der Naturstoff Norlichexanthon konnte bisher nur in der Flechte *Lecanora reuteri* und dem Pilz *Penicillium patulum* nachgewiesen werden, nicht jedoch in *Alternaria tenuis* oder einer anderen *Alternaria*-Spezies, möglicherweise wird es hier quantitativ zu Alternariol umgesetzt.

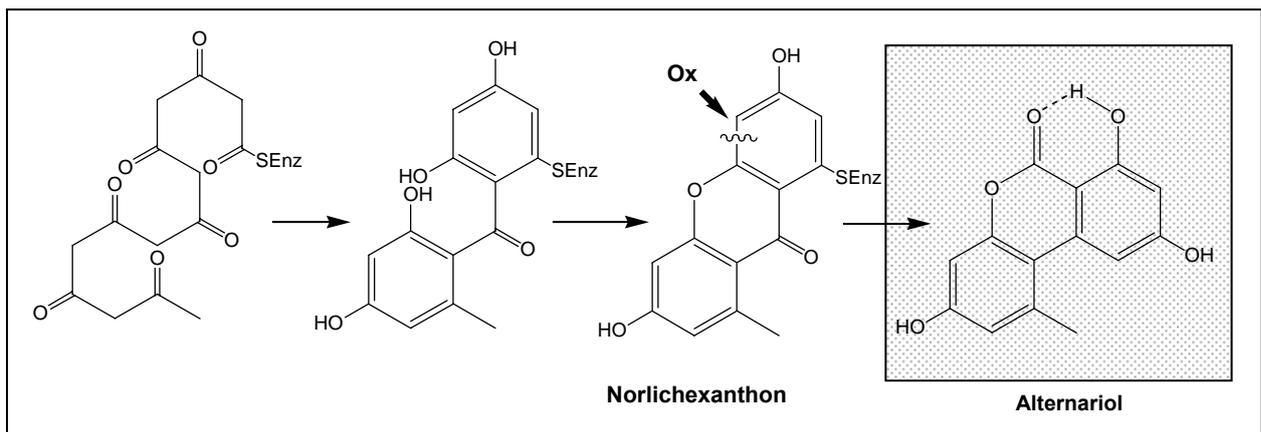


Abb.D4: Biosynthese von Alternariol mit Norlichexanthon als Zwischenstufe [Stinson *et al.* 1985]

Tenuazonsäure

(siehe 4.2.6.A)

4.3. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Stoffwechsel mariner Pilze

Um das gesamte Potential des Sekundärstoffmetabolismus der Mikroorganismen ausschöpfen zu können, ist es von großer Bedeutung, die physiologischen Kulturbedingungen zu variieren. Dieser Tatsache wurde bisher nur unzureichend Beachtung geschenkt, und nur wenige Erkenntnisse über die regulierenden Faktoren dieses Sekundärstoffmetabolismus liegen vor, nicht zuletzt aufgrund der Komplexität der einzelnen Mikroorganismen und der Vielzahl der vorliegenden Biosynthesewege [Knight 2003].

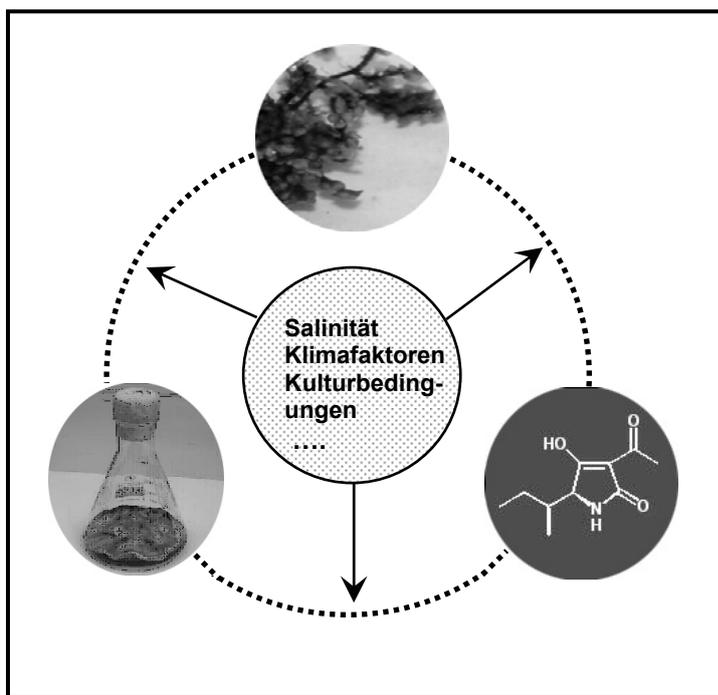


Abb.D5:

Interaktionen zwischen Endophyt, Wirt und Wirkstoffproduktion und der Einfluss verschiedener externer Faktoren

Eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren übt Einfluss auf diese Stoffwechselwege aus, speziell bei mit Wirtsorganismen assoziierten Mikroorganismen. Solche Faktoren sind die Temperatur (hier ist auch die globale Erderwärmung von Bedeutung) und andere Klimafaktoren, die Biodiversität des Habitats, der pH-Wert und Salzgehalt des Umgebungsmediums und das Zusammenspiel der Stoffwechsel von Wirt und assoziiertem Mikroorganismus. Für die Kultivierung von Mikroorganismen bedeutet dies, dass die Art der Kultivierungsmethode, die Zusammensetzung und Salinität des Mediums, die Inkubationstemperatur, der pH-Wert und der Zeitpunkt der Probenahme sehr sorgsam gewählt und eventuell auch speziell auf die Bedürfnisse eines einzelnen Mikroorganismus abgestimmt werden müssen, um die Bildung bestimmter biologisch aktiver Sekundärstoffe zu erreichen oder zu fördern.

Um die Wachstumsbedingungen der marinen Pilze auch während der Fermentation weitestgehend den Verhältnissen in der Wirtspflanze anzupassen, wurde in dieser Arbeit dem zur Isolierung der Endophyten aus ihren Wirten verwendeten Nährmedium die getrocknete und pulverisierte Wirtspflanze zugesetzt. In einigen vergleichenden Kultivierungen auf einem zweiten Malzextraktmedium ohne den Zusatz der Wirtspflanze konnte bisweilen ein schlechteres Wachstum beobachtet werden. Diese Tatsache sprach eindeutig dafür, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums von großer Bedeutung für die Entwicklung und Sekundärstoffproduktion von endophytischen Pilzen ist und eventuell die Isolierung spezieller Pilze, die sich in hohem Maße dem Stoffwechsel der Wirtspflanzen angepasst haben, erst ermöglicht. Solche Pilze könnten von besonderem Interesse für die Produktion ungewöhnlicher, biologisch aktiver Naturstoffe sein.

Weiterhin wurde routinemäßig derjenige annähernde Salzgehalt für das Kulturmedium gewählt, der in dem natürlichen Habitat des jeweiligen marinen Pilzes vorgeherrscht hatte. Für den algenassoziierten Pilz *Aspergillus sydowii* wurde beispielhaft der Einfluss des Salzgehaltes des Mediums auf Menge und Art der gebildeten Naturstoffe untersucht. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte festgestellt werden. So war die absolute Menge an gebildetem Myzelium bei „salzfreiem“ Medium am größten, die relativ pro Masseneinheit Myzelium gebildete Menge an Naturstoffen jedoch am geringsten. Weiterhin zeigte sich an der vom Salzgehalt abhängigen Zusammensetzung des Sekundärstoffmusters ein unterschiedliches Abhängigkeitsverhältnis für jede einzelne Substanz, einige Substanzen wurden sogar erst ab einem gewissen Salzgehalt des Mediums gebildet. Die erzielten Ergebnisse zeigen klar die Korrelation zwischen Salinität und Sekundärstoffproduktion auf, aber auch deren Komplexität.

An dem schwammassoziierten Pilz *Phialophora olivacea* wurde der Einfluss der gewählten Kultivierungsmethode, speziell im Vergleich zwischen Standkultur und Schüttelkultur, untersucht. Dabei zeigte sich, dass die in der Schüttelkultur produzierte Biomasse weitaus geringer war im Vergleich zur Standkultur, ebenso die absolute Menge der gebildeten Sekundärstoffe. Zwar war die relativ pro Masseneinheit Myzelium gebildete Menge an Naturstoffen bei der Schüttelkultur nach einem Zeitraum von sechs Wochen geringfügig größer, in Anbetracht der größeren absoluten Menge an gebildeten Sekundärstoffen und des nahezu identischen Inhaltstoffmusters in beiden Kulturmethoden, ist die Standkultur in dieser

Untersuchung aber eindeutig besser zu bewerten. Interessant wäre weiterhin ein Vergleich zur Kultivierung auf Festmedium.

Am Beispiel von *Phialophora olivacea* wurde auch die Wachstumskurve sowie der zeitliche Verlauf der Bildung von Sekundärstoffen über einen Zeitraum von sechs Wochen bestimmt. Dabei konnte zunächst ein starker Anstieg der Biomasse innerhalb der ersten zwei Wochen beobachtet werden, dann eine stationäre Phase und nach vier Wochen eine Abnahme der Biomasse, vermutlich der Beginn der Absterbephase. Da sich das Inhaltsstoffmuster über den Zeitraum von sechs Wochen kaum veränderte, wäre hier also nach vier Wochen der günstigste Zeitpunkt der Ernte der Kulturen. Danach würde sich lediglich das Risiko einer Kontamination erhöhen.

Die Probenanzahl konnte bei den durchgeführten Untersuchungen für eine statistisch abgesicherte Erhebung zwar nicht in ausreichender Größe gewählt werden, klare Tendenzen zeichnen sich aber ab, deren Übertragung auf größere Probenmengen angenommen werden kann. Die Anzahl der untersuchten Proben blieb limitiert, da die Isolierung neuer, bioaktiver Naturstoffe im Vordergrund dieser Arbeit stand und die Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den mikrobiellen Stoffwechsel hauptsächlich der Optimierung der Kultivierungsbedingungen der bearbeiteten Pilze dienen sollte.

Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass sämtliche ermittelte Optima zwischen einzelnen Pilzspezies variieren können. Die beispielhaft erzielten Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses gewisser Bestandteile des Kulturmediums, wie dem Salzgehalt und dem Zusatz von getrocknetem Material der jeweiligen Wirtspflanzen, der Wahl der Kultivierungsmethode und dem Zeitpunkt der Ernte der Kulturen stellen nichtsdestotrotz eine interessante Grundlage für weitere Tests dar und zeigen die Wichtigkeit der Optimierung von Kulturbedingungen der Mikroorganismen bei der Suche nach biologisch aktiven Wirkstoffen auf.

4.4. Einfluss des Klimafaktors auf die Bioaktivität mariner Pilze

Die Bioaktivität mariner Organismen kann in direktem Zusammenhang zur Anpassung an äußere Einflüsse, wie der Notwendigkeit der Verteidigung gegen Fraßfeinde und mikrobiellen Befall gesehen werden. In vielen Fällen ist damit die Bildung biologisch aktiver Sekundärstoffe verbunden. Dies ist unter anderem abhängig von der Biodiversität des

jeweiligen Habitats und diese wiederum ist in Regionen tropischen Klimas besonders groß. In Untersuchungen an algenassoziierten Pilzen des tropischen Indischen Ozeans und des Pazifischen Ozeans der gemäßigten Klimazone im Vergleich konnte im Rahmen dieser Arbeit diese aufgestellte Vermutung eindeutig bestätigt werden. Auch hier müsste zur endgültigen Bekräftigung dieser Hypothese ein größeres Probenvolumen gewählt werden, es lässt sich aber klar eine Tendenz abzeichnen. So zeigen Pilze mariner Herkunft aus der tropischen Region eine weitaus stärkere Bioaktivität in Hinblick auf antibakterielle, antimykotische und allgemein toxische Wirkung als die der gemäßigten Klimazone. Besonders die antibakterielle Aktivität der tropischen Endophyten imponiert, sie ist in vielen Fällen vergleichbar mit als Positivkontrolle verwendeten Antibiotika wie Penicillin, Gentamycin und Streptomycin. Auch unter den aus tropischen Mangroven isolierten endophytischen Pilzen ist eine hohe antibakterielle und allgemein toxische, weniger antifungale, Bioaktivität zu finden. Somit mögen marine Pilze dieser tropischen Regionen auch ein größeres Potential für die Isolierung ungewöhnlicher, bioaktiver Naturstoffe, speziell mit antibiotischer und zytotoxischer Wirkung aufweisen.

4.5. Endophyten und Pilze mariner Herkunft als Produzenten oder Mitproduzenten von Naturstoffen aus marinen Algen und Schwämmen?

Ein großer Anteil der Biomasse mariner Schwämme besteht, wie in der Einleitung bereits dargelegt, aus Mikroorganismen, und es konnte mittlerweile bereits für bestimmte Sekundärstoffe (z.B. Manzamin A) gezeigt werden, dass diese Mikroorganismen Produzenten oder Mitproduzenten von aus marinen Schwämmen isolierten biologisch aktiven Naturstoffen sind. Auch für nahezu alle Pflanzen wird das Vorhandensein von endophytischen Mikroorganismen klar belegt (siehe Einleitung). Für einige in Arzneipflanzen lebende Endophyten konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Lage sind, die gleichen Sekundärstoffe zu produzieren wie ihre jeweiligen Wirtspflanzen. Das bekannteste Beispiel stellt der aus der pazifischen Eibe stammende zytostatisch wirksame Arzneistoff Taxol dar. Hier stellt sich somit die interessante Frage nach dem ursprünglichen Produzenten der Substanz und der Möglichkeit des Gentransfers. Diskutiert wird, ob diese Mikroorganismen alleinige Produzenten der Wirkstoffe sind oder ob deren Bildung Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Endophyt ist. Diese Tatsache zu klären, wäre natürlich auch interessant für andere pharmakologisch aktive Naturstoffe, da, wie bereits in der

Einleitung dargelegt, Mikroorganismen eine hervorragende Quelle für die Produktion von Wirkstoffen in industriellen Maßstäben darstellen.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Pilze konnten HPLC- und LC-MS-analytisch keine Übereinstimmungen des Inhaltsstoffmusters zwischen jeweiligem Wirt und Endophyt festgestellt werden. Dafür kommen verschiedene Gründe als Erklärung in Frage. Natürlich kann zunächst angenommen werden, dass es in diesem Falle keine gemeinsam gebildeten Naturstoffe gibt. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese nicht in vom Wirt isoliert kultivierten Mikroorganismen gebildet werden, auch da die physiologischen Bedingungen in Kultur eventuell nicht optimal imitiert werden konnten, dass die Konzentrationen dieser Sekundärstoffe die Nachweisgrenze unterschritten haben. Um die natürlichen Bedingungen zu imitieren, wurde im Falle der Algen und Mangroven getrocknetes Pflanzenmaterial der jeweiligen Wirtspflanzen dem Medium zugesetzt, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass trotzdem für die Bildung bestimmter Sekundärmetabolite essentielle Nährstoffe beim Prozess des Autoklavierens des Kulturmediums zerstört worden sind. Als Hinweis auf mögliche Wechselwirkungen zwischen Wirt und Endophyt bei der Naturstoffproduktion kann jedoch der Nachweis verschiedener auch aus Pflanzen bekannter Strukturen wie Abscisinsäure, Djalonenson und Aureonitol in den untersuchten marinen Pilzen gedeutet werden.

5. Zusammenfassung

Marine Organismen haben sich im Laufe der Evolution hervorragend an die besonderen Bedingungen unter Wasser angepasst. Diese Tatsache führte aufgrund von Adaptationsprozessen unter anderem zur Bildung neuer biologisch aktiver Naturstoffe, die sich in ihrer Struktur und Wirkung häufig von bekannten terrestrischen Naturstoffen unterscheiden. Hierbei stellen besonders Mikroorganismen des marinen Habitats wichtige potentielle Quellen auf der Suche nach neuen pharmakologisch aktiven Wirkstoffen dar, da ihre biotechnologische Fermentation in nahezu unbegrenzter Menge möglich ist, ohne dass eine Ausbeutung begrenzter natürlicher Ressourcen erfolgen muss. Zudem kann die Wirkstoffproduktion in Mikroorganismen gezielt genetisch manipuliert werden. Speziell Endophyten haben sich aufgrund ihrer komplizierten Wechselwirkungen mit ihren Wirtsorganismen als sehr viel versprechende Produzenten pharmakologisch aktiver Sekundärstoffe erwiesen.

I. Im Vordergrund dieser Arbeit stand daher die gezielte Isolierung bioaktiver Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen. Nach Isolierung der Endophyten aus ihren Wirtsorganismen auf einem Spezialmedium wurden die Pilze kultiviert, mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert und die Extrakte chemisch analytisch sowie auf ihre biologische Aktivität hin (speziell antibiotische Aktivität, Zytotoxizität und allgemeine Toxizität) untersucht. Biologisch aktive sowie analytisch aussichtsreich erscheinende Extrakte wurden zur Isolierung der in ihnen enthaltenen Sekundärstoffe ausgewählt. Die Naturstoffisolierung sowie die nachfolgende Strukturaufklärung erfolgten mithilfe verschiedener chromatographischer sowie spektroskopischer Methoden (HPLC, LC-MS, NMR, DC, verschiedene säulenchromatographische Techniken). Isolierte Reinsubstanzen wurden nochmals in verschiedenen Konzentrationen auf ihre biologische Aktivität gescreent. Die taxonomische Einordnung sowie Identifizierung der Pilze erfolgte mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, Gelelektrophorese) bzw. anhand morphologischer Merkmale.

I.A. Aus im Indischen Ozean (Kerala/Indien) ertauchten tropischen Makroalgen konnten 13 assoziierte Endophyten isoliert und identifiziert werden. Aus ausgewählten Spezies erfolgte dann die gezielte Isolierung von 14 Sekundärstoffen, wobei es sich bei zwei Substanzen um neue Naturstoffe handelt. Aus *Aspergillus niger* wurden die Pyranonigrine A,

B und C (1-3) sowie der mykotoxische Sekundärstoff Fonsecain (4) isoliert. Für Fonsecain konnte zudem eine antibiotische Aktivität gegenüber dem Testorganismus *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden. Aus *Fusarium semitectum* wurden die als antifungal bekannten Naturstoffe Fusapyron (10) und Deoxyfusapyron (9) und aus *Aspergillus terreus* das Chlorbenzophenon Dihydrogeodin (5) aufgeklärt. Dihydrogeodin erwies sich im Test als antibiotisch sehr aktiv. Das Alkaloid Paxillin (11) mit antibiotischer und tremorgener Wirkung stammte aus dem Pilz *Eurotium amstellodami*. Aus einem mithilfe morphologischer Methoden nicht identifizierbaren Pilz konnte der als pflanzenpathogen und zu Wachstumshormonen antagonistisch bekannte Naturstoff Abscisinsäure (6) isoliert werden. Der mit der Rotalge *Acanthophora spicifera* assoziierte Pilz *Aspergillus sydowii* fiel in der chemisch analytischen Untersuchung auf und zeigte außerdem antibiotische Aktivität gegenüber den Testorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* und wurde deshalb zur Kultivierung in 10 l Flüssigmedium ausgewählt. Aus diesem Pilz konnten die zwei neuen Naturstoffe S15 und S16 (13, 14), die aromatischen Sesquiterpene Hydroxysydonsäure (7) und Sydonsäure (8), sowie Sydowsäure (27) isoliert werden.

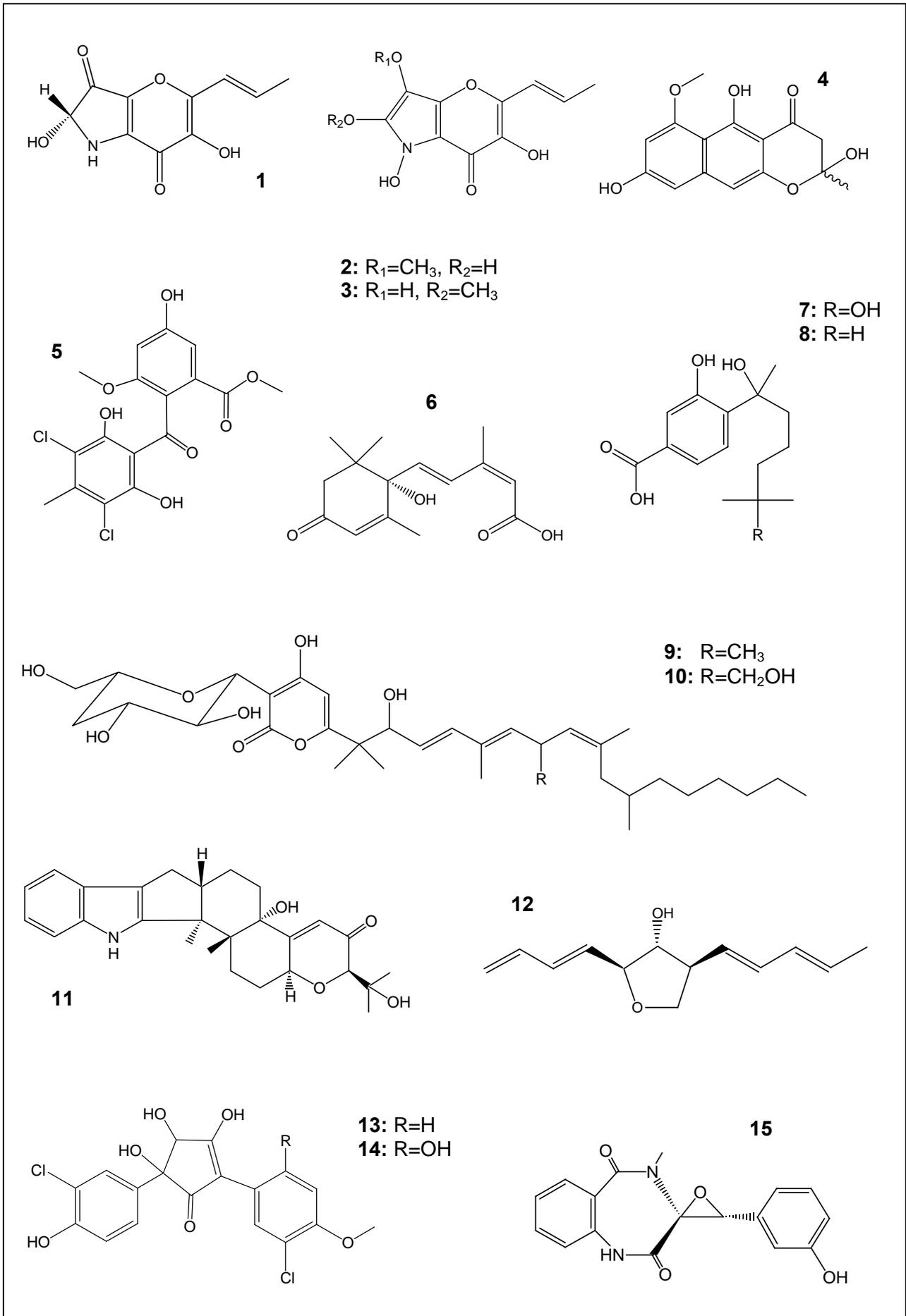
I.B. Aus im Pazifischen Ozean (Qingdao/VR China) gesammelten Makroalgen der gemäßigten Klimate wurden 12 assoziierte Endophyten isoliert und identifiziert. Aus ausgewählten Spezies erfolgte dann die gezielte Isolierung von 11 Sekundärstoffen. Aus *Alternaria tenuissima* konnte der Naturstoff Tenuazonsäure (16) aufgeklärt werden, der sich als sehr aktiv im Test auf Zytotoxizität erwies. Gegen Lymphomzellen der Maus (L5178Y) konnte eine $ED_{50} > 8.2 \mu\text{g/ml}$ und gegen menschliche Gebärmutteradenomzellen (HeLa) eine $ED_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Aus *Chaetomium globosum* stammt das Furanderivat Aureonitol (12). Das als antioxidativ beschriebene Diketopiperazin Neoechinulin A (17) sowie der Naturstoff Cladosporin (22) und 4 verwandte Verbindungen (23-26) konnten ebenfalls aus einem Stamm von *Chaetomium globosum* nachgewiesen werden, der aus einer anderen Wirtsalge stammte. Für Cladosporin ist ein breites Spektrum an Bioaktivitäten bekannt: antibiotische Wirkung, Aktivität gegen Protozoen sowie phytotoxische und insektizide Wirkung. Aus *Cladosporium* sp. konnten die Chinolinone Viridicatin (18) und Viridicatol (19) mit antibiotischer Aktivität sowie das Benzodiazepinderivat Cyclophenol (15) isoliert werden.

I.C. Im Indischen Ozean (Kerala/Indien) wurde der Schwamm *Axinella tenudigatata* ertauht und aus ihm der schwammassoziierte Pilz *Alternaria alternata* isoliert. Aus diesem Pilz stammt der als phytotoxisch und antibiotisch bekannte Sekundärstoff Alternariol (**20**) sowie das strukturell verwandte Djalonenson (**21**) ebenso wie Tenuazonsäure (**16**), für die im Rahmen dieser Arbeit zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte.

II. Da es sich bei marinen Pilzen nicht um eine taxonomisch, sondern ökologisch-physiologisch definierte Gruppe von Mikroorganismen handelt, die starker Anpassung an ihren Lebensraum unterliegt, ist die Untersuchung ökologischer Zusammenhänge von großer Bedeutung, nicht zuletzt auch der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Bildung von Sekundärstoffen. Am Beispiel des algenassoziierten marinen Pilzes *Aspergillus sydowii* wurde der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf Menge und Zusammensetzung der produzierten Naturstoffe untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Erhöhung der Meersalzkonzentration im Medium eine vermehrte Bildung an Sekundärstoffen sowie eine Veränderung des Inhaltsstoffmusters zur Folge hat. An dem schwammassoziierten Pilz *Phialophora olivacea* konnte außerdem beispielhaft gezeigt werden, dass die Wahl der Kultivierungsmethode sowie der Zeitpunkt der Probenahme ebenfalls von Bedeutung für die Sekundärstoffisolierung aus Pilzkulturen sind.

Weiterhin verdeutlichte ein Vergleich der Bioaktivitäten algenassoziiierter Pilze der gemäßigten und tropischen Klimate, dass an tropische Umgebungsbedingungen adaptierte Mikroorganismen - offensichtlich aufgrund der größeren Artenvielfalt der Tropen und dem daraus resultierenden verstärkten Konkurrenzdruck - über ein größeres Ausmaß und eine größere Diversität an Bioaktivität verfügen.

III. Für die aus dem indonesischen Schwamm *Callyspongia aerizusa* stammenden neuen Peptide Callyaerin A-F konnte im Rahmen dieser Arbeit die absolute Konfiguration aufgeklärt werden. Hierzu wurden die Peptide nach erfolgter Hydrolyse mit dem diastereomeren Marfey-Reagenz (1-Fluor-dinitrophenyl-5-L-alanin) umgesetzt. Die so aus den enantiomeren D- und L-Aminosäuren entstandenen diastereomeren Marfey-Derivate konnten dann über die analytische HPLC und LC-MS voneinander getrennt und detektiert werden.



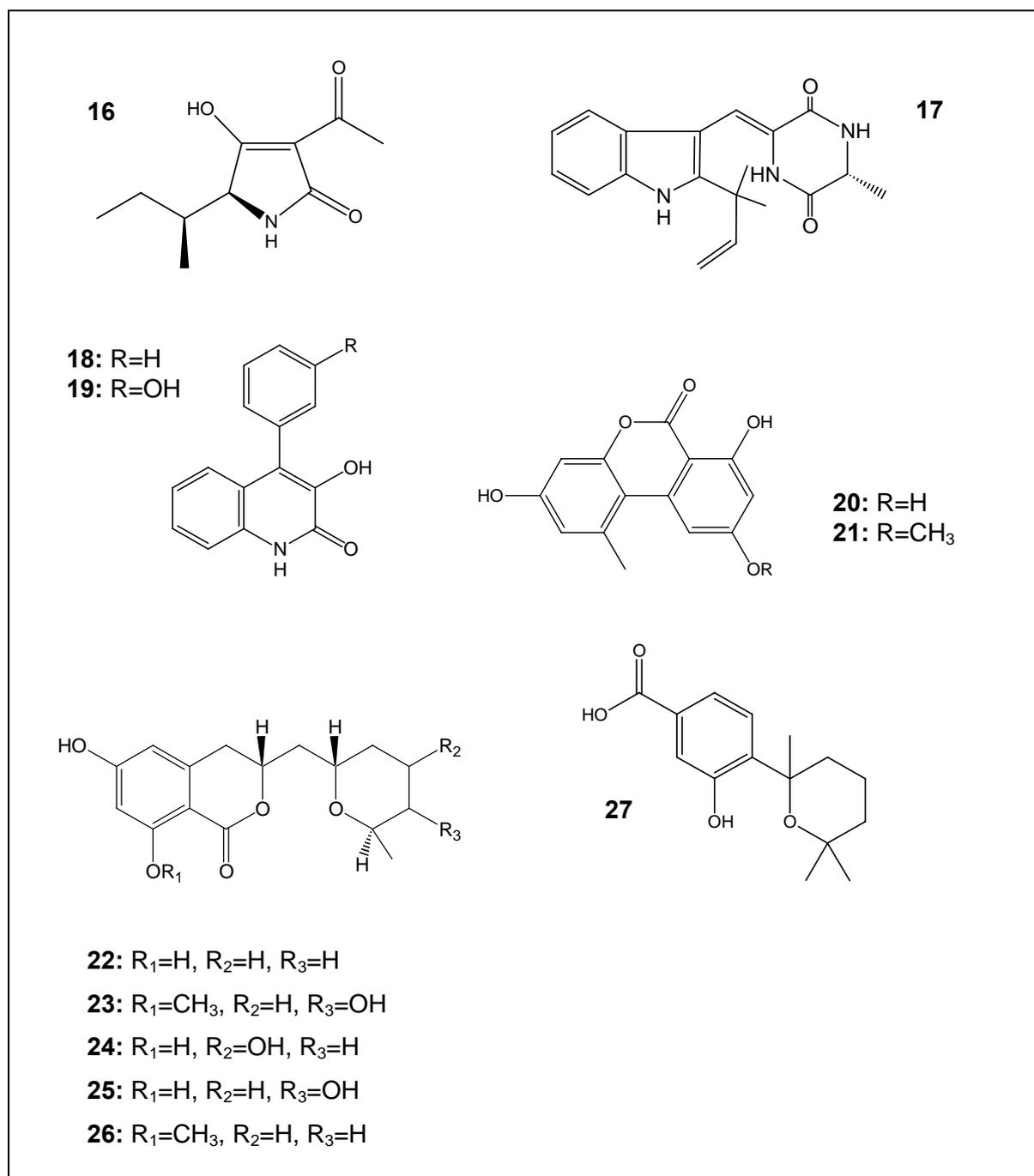


Abb.Z1: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus marinen Pilzen isolierte Naturstoffe

6. Literaturverzeichnis

- Abraham W, Arfmann H; Rearranged tetrahydrofurans from *Chaetomium cochlioides*. *Phytochemistry* 1992; **31**: 2405-2408
- Alker A, Smith G, Kim K; Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia* 2001; **460**: 105-111
- Altomare C, Pengue R, Favilla M, Evidente A, Visconti A; Structure-activity relationships of derivatives of fusapyrone, an antifungal metabolite of *Fusarium semitectum*. *J Agric Food Chem* 2004; **52**: 2997-3001
- Altomare C, Perrone G, Zonno M, Evidente A, Pengue R, Fanti F, Polonelli L; Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *J Nat Prod* 2000; **68**: 1131-1135
- Antibase. Database of natural products from microorganisms and higher fungi, CD-ROM, Wiley-VCH, Berlin
- Assante G, Merlini L, Nasini G; (+)-abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Experientia* 1977; **33**: 1556-1557
- Barbetta M, Casnati G, Pochini A, Selva A; Novechinuline: a new indole metabolite from *Aspergillus amstelodami*. *Tet Lett* 1969; **51**: 4457-4460
- Bennett R, Norman S, Maier V; Biosynthesis of abscisic acid from [1,2-¹³C₂]acetate in *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry* 1981; **20**: 2343-2344
- Biabani MF, Laatsch H; Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. *J Prakt Chem* 1998; **340**: 589-607
- Bohlmann F, Ziesche J; *Phytochemistry* 1979; **18**: 664-669
- Brauers G; Isolierung und Strukturaufklärung von neuen Naturstoffen aus schwamm-assoziierten Pilzen-Mittelmeer und Indopazifik. *Dissertation* an der HHU Düsseldorf 2003
- Bugni T, Ireland C; Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* 2004; **21**: 143-163
- Bull A; Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Rev* 2000; **66**: 447-459
- Butler M; The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* 2004; **67**: 2141-2153
- Butler M; Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 2005; **33**: 162-195

- Cattel L, Grove J, Shaw D; New metabolic products of *Aspergillus flavus*. Part III. biosynthesis of asperentin. *J C S Perkin I* 1973; 2626-2629
- Cole R; *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press 1981; 488
- Constantino M, Donate P, Petraghani N; An efficient synthesis of (\pm)-abscisic acid. *J Org Chem* 1986; **51**: 253-254
- Crouch I, Vanstaden J; Evidence for the presence of plant-growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Reg* 1993; **13**: 21-29
- Cueto M, Jensen P, Kauffman C, Fenical W, Lobkovsky E, Clardy J; Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J Nat Prod* 2001; **64**: 1444-1446
- Cunningham K; The isolation and some chemical properties of viridicatin, a metabolic product of *Penicillium viridicatum* Westling. *Biochem J* 1953; **53**: 328-332
- Curtis R, Hassall C, Parry D; The biosynthesis of phenols. Part XXIV. The conversion of the anthraquinone questin into the benzophenone, sulochrine, in cultures of *Aspergillus terreus*. *J C S Perkin I* 1972; 240-244
- Database www.doctorfungus.org
- DNP-*Dictionary of Natural Products* on CD-ROM, Chapman and Hall/CRC 2004; Hampden Data Services, Boca Raton, USA
- Evidente A, Conti L, Altomare C, Bottalico A, Sindona G, Segre A, Logrieco A; Fusapyrone and deoxyfusapyrone, two antifungal α -pyrones from *Fusarium semitectum*. *Nat Toxins* 1994; **2**: 4-13
- Feling R, Polborn K, Steglich W, Mühlbacher J, Bringmann G; The absolute configuration of the mushroom metabolites involution and chamonixin. *Tetrahedron* 2001; **57**: 7857-7863
- Fueki S, Tokiwano T, Toshima H, Oikawa H; Biosynthesis of indole diterpenes, emindole, and paxilline: involvement of a common intermediate. *Org Lett* 2004; **6**: 2697-2700
- Fujimoto H, Fujimaki T, Okuyama E, Yamazaki M; Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chem Pharm Bull* 1999; **47**: 1426-1432
- Galmarini O, Stodola F; Fonsecin, a pigment from an *Aspergillus fonsecaeus* mutant. *J Org Chem* 1965; **30**: 112-115
- Geiser D, Taylor K, Ritchie K, Smith G; Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 1998; **394**: 137-138
- Gibbs P, Seviour R, Schmid F; Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* 2000; **1**: 17-48

- Gill M, Steglich W; Pigments of fungi (macromycetes)-cyclopentanoids. *Prog Chem Org Nat Prod* 1987; **51**: 63-70
- Goodman R, Kiraly Z, Wood R; The biochemistry and physiology of plant disease. Univ of Missouri Press, Columbia 1986
- Haefner B; Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* 2003; **8**: 536-544
- Hamasaki T, Nagayama K, Hatsuda Y; Two new metabolites, sydonic acid and hydroxysydonic acid, from *Aspergillus sydowi*. *Agric Biol Chem* 1978; **42**: 37-40
- Hiort J, Maksimenka K, Reichert M, Perovic-Ottstadt S, Lin W, Wray V, Steube K, Schaumann K, Weber H, Proksch P, Ebel R, Müller WEG, Bringmann G; New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. *J Nat Prod* 2004; **67**: 1532-1543
- Hiort J; Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres-Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung der biologischen Aktivität. Dissertation an der HHU Düsseldorf 2002
- Holler U, König G, Wright A; Three new metabolites from marine derived fungi of the genera *coniothyrium* and *microsphaeropsis*. *J Nat Prod* 1999; **62**: 114-118
- Hodge R, Harris C, Harris T; Verrucofortine, a major metabolite of *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, the fungus that produces the mycotoxin verrucosidin. *J Nat Prod* 1988; **51**: 66-73
- de Hoog G, Guarro J, Géne J, Figueras M, Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands/ Universitat Rovira i Virgili 2000, 2nd Edition
- Hu Y, Chaomin L, Kulkarni B, Strobel G, Lobkovsky E, Torczynski R, Porco J; Exploring chemical diversity of epoxyquinoid natural products: synthesis and biological activity of jesterone and related molecules. *Org Lett* 2001; **3**: 1649-1652
- Hyde K, Jones E; Marine mangrove fungi. *Marine Ecol* 1988; **9**:15-33
- Ibrahim S., Teuscher F., Edrada R., Ebel R., Wray V., Proksch P.: Callyaerine A-F-novel peptides from the Indonesian sponge *Callyspongia aerizusa*. *J Nat Prod* (in prep.)
- Inamori Y, Kato Y, Kubo M, Kamiki T, Takemoto T, Nomoto K; Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. *aureus*. I. Chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture growth. *Chem Pharm Bull* 1983; **31**: 4543-4548
- Jacyno J, Harwood J, Cutler H, Lee M; Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporioides*. *J Nat Prod* 1993; **56**: 1397-1401

- Jadulco R; Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine sponges and sponge-derived fungi. Dissertation an der JMU Würzburg 2002
- Jones E (Editor); Recent advances in aquatic mycology. Elek Science, London 1976
- Kasanah N, Rao K, Wedge D, Hill R, Hamann M; *Abs Pap 6th Int Mar Biotech Conf* 2003; S14-13B-14 (abstr)
- Kiriyaama N, Nitta K, Sakaguchi Y, Taguchi Y, Yamamoto Y; Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. III. Metabolites of the strain IFO 8835. *Chem Pharm Bull* 1977; **25**: 2593-2601
- Kirk P, Cannon P, David J, Staplers J; *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*, 2001 9.Aufl., CABI Bioscience
- Knight V, Sanglier J, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, Hughes D, Zhang L; Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **62**: 446-458
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E; Marine mycology - The higher fungi. Academic press, New York 1979
- König G, Wright A; Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Medica* 1996; **62**: 193-211
- Li J, Strobel G, Harper J, Lobkovsky E, Clardy J, Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org Lett* 2000; **2**: 767-770
- Li J, Strobel G; Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus-*Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 2001; **57**: 261-265
- Liberra K, Lindequist U; Marine fungi-a prolific resource of biologically active natural products?. *Pharmazie* 1995; **50**: 583-588
- Luckner M; Alkaloid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*-does it reflect general features of secondary metabolism?. *J Nat Prod* 1980; **43**: 21-40
- Malinowski D, Belesky D; *J Plant Nutr* 1999; **22**: 835
- Malmström J, Christophersen C, Barrero A, Oltra J, Justicia J, Rosales A; Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella varicolor*. *J Nat Prod* 2002; **65**: 364-367
- Mantle P, Weedon C; Biosynthesis and transformation of tremorgenic indole-diterpenoids by *Penicillium Paxilli* and *Acremonium lolii*. *Phytochemistry* 1994; **36**: 1209-1217
- Marchelli R, Dossena A, Pochini A, Dradi E; The structures of five new didehydropeptides related to neoechinulin, isolated from *Aspergillus amstelodami*. *J C S Perkin 1*; 1977; 713-717

- Marfey P; Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res Commun* 1984; **49**: 585-590
- Marumo S, Katayama M, Komori E, Ozaki Y, Natsume M, Kondo S; *Agric Biol Chem* 1982; **46**: 1967
- McCamish M, White J; Mass spectra of cyclopinin and viridicatin. *Org Mass Spectr* 1970; **4**: 241-248
- Montemurro N, Visconti A; Alternaria metabolites-chemical and biological data. Chelkowski J, Visconti A (Eds.): *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites*; Elsevier, Amsterdam 1993; 449-557
- Namikoshi M, Kobayashi H, Yoshimoto T, Meguro S, Akano K; Isolation and characterization of bioactive metabolites from marine-derived filamentous fungi collected from tropical and sub-tropical coral reefs. *Chem Pharm Bull* 2000; **48**: 1452-1457
- Newman D, Cragg G; Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod* 2004; **67**: 1216-1238
- Nolte M, Steyn P, Wessels P; Structural investigations of 3-acylpyrrolidine-2,4-diones by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-Ray crystallography. *J C S Perkin 1* 1980; 1057-1065
- Numata A, Amagata T, Minoura K, Ito T; Gymnastasins, novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge. *Tet Lett* 1997; **38**: 5675-5678
- Onocha P, Okorie D, Connolly J, Roycroft D; Monoterpene diol iridoid glycoside and dibenzo- α -pyrone from *Anthocleista djalonensis*; *Phytochemistry* 1995; **40**: 1183-1189
- Oritani R, Yamashita K; Synthesis of (+)-abscisic acid in *Cercospora cruenta*. *Agric Biol Chem* 1985; **49**: 245-249
- Osterhage C, König G, Holler U, Wright A; Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. *J Nat Prod* 2002; **65**: 306-313
- Osterhage C, Kaminsky R, König G, Wright A; Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *J Org Chem* 2000; **65**: 6412-6417
- Piecková E, Jesenská Z; Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann Agric Environ Med* 1999; **6**: 1-11
- Preszler R, Gaylord E, Boecklen W; Reduced parasitism of a leaf mining moth on trees with high infection frequencies of an endophytic fungus. *Oecologia* 1996; **108**: 159-166
- Priestap H; New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*. *Tetrahedron* 1984; **40**: 3617-3624

- Proksch P, Ebel R; Ecological significance of alkaloids from marine invertebrates. In: Alkaloids-biochemistry, ecology, and medicinal applications; Roberts M, Wink M (Editors); Plenum press, New York and London 1998; 379-397
- Raistrick H, Stickings C, Thomas R; Alternariol, a new pyran from the fungus *Alternaria* sp.; *Biochem J* 1953; **55**: 421-423
- Royles B; Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation, and synthesis. *Chem Rev* 1995; **95**: 1981-2001
- Schlingmann G, Milne L, Williams D, Carter G; Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. II. Isolation and structure determination. *J Antibiot* 1998; **51**: 303-316
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, van Dijck P; On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; **59**: 426-435
- Scott P, van Waalbeek W, Mac Lean W; Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*. *J Antibiot* 1971; **24**: 747-755
- Springer J, Clardy J; Paspaline and paspalicine, two indole-mevalonate metabolites from *Claviceps paspali*. *Tet Lett* 1980; **21**: 231-234
- Steyn P, Rabie C; Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. *Phytochemistry* 1976; **15**: 1977-1979
- Stinson E, Wise W, Moreau R, Jurewicz, Pfeffer P; Alternariol: evidence for biosynthesis via norlichexanthone. *Can J Chem* 1986; **64**: 1590-1594
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J; Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 2004; **67**: 257-268
- Strobel G; Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol* 2002; **22**(4): 315-333
- Strobel G; Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Pathol* 2002; **24**: 14-20
- Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu R, Hess W; Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 1996; **142**: 435-440
- Takahashi C, Numata A, Matsumura E, Minoura K, Eto H, Shingu T, Ito T, Hasegawa T; Leptosin I and J, cytotoxic substances produced by a *Leptosphaeria* sp. Physico-chemical properties and structures. *J Antibiot* 1994; **47**: 1242-1249
- Tan R, Zou W; Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 2001; **18**: 448-459

- Taylor T, Taylor E; The rhy niechert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. Microbial endophytes. Bacon C, White J; Eds., Marcel Decker, New York 2000
- Varoglu M, Crews P; Biosynthetically diverse compounds from a saltwater-culture of sponge-derived *Aspergillus niger*. *J Nat Prod* 2000; **63**: 41-43
- Wilkinson R; Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar Biol* 1978; **49**:161-167
- Yoshimoto T, Namikoshi M, Kobayashi H, Hosoya T; *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* 1997; **39**: 637
- Yousaf M, Rao K, Gul W, Kelly M, Franzblau S; Hill R, Hamann M; *Abs Pap 6th Int Mar Biotech Conf* 2003; S14-13B-13 (abstr)
- Zou W, Tan R; *Adv Plant Sciences* 1999; **2**: 183

7. Abkürzungen

Abb	Abbildung
amu	Atomic Mass Unit
b	breites NMR- Signal
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CHCl ₃	Chloroform
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy (meist H-H-COSY)
d	Dublett
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EI	Electron Impact Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
FPLC	Flüssig/Flüssigverteilungschromatographie
h	Stunde
g	Gramm
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
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 ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hz	Hertz
IC	Inhibitory Concentration
l	Liter
LC	Lethal Concentration
LC-MS	HPLC mit Massendetektor
m	Multipllett
M	Molar
MeOH	Methanol
MHz	Mega Hertz
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ml	milliliter

NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Wasserstoffionen-Exponent
ppm	parts per million
q	Quartett
s	Singulett
t	Triplett
Tab	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
Vgl	Vergleich
VLC	Vakuum-Flüssigchromatographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Bei allen Kollegen und Mitstreitern in Düsseldorf bedanke ich mich besonders für das gute Arbeitsklima und die Kollegialität, sowie alle Aktivitäten die meist weit über die Instituts- und sogar Landesgrenzen hinaus reichten, immer viel Spaß gemacht haben und neue Energie gaben.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei:

Dr. Rainer Ebel für die jederzeit kompetente Hilfe bei allen aufkommenden Fachfragen, die nötige Motivation und zahlreiche Diskussionen, bisweilen auch weit darüber hinausführend bis hin zu innenpolitischen und religiösen Fragestellungen und Dr. RuAngelie Edrada-Ebel dafür, dass sie mir mit immer guter Laune und unzähligen hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Prof. Wenhan Lin für die unvorstellbare Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Peking und auf Hainan, unvergessliche Eindrücke und kulinarische Erlebnisse sowie die professionelle Hilfe bei der Strukturaufklärung und für das Lösen sämtlicher Probleme „in the Chinese way“.

Prof. Bingui Wang in Qingdao und Dr. K. Padmakumar in Trivandrum sowie all meinen chinesischen und indischen Kollegen für die großartige Gastfreundschaft, fachkundige Unterstützung sowie zahlreiche kulinarische und kulturelle Erfahrungen und Sprachübungen.

Mareike Thiel dafür, dass sie für alle administrativen Probleme immer eine schnelle und professionelle Lösung finden konnte und wollte.

Nadine Weber für ein immer offenes Ohr, die Sicherstellung der Lebensmittelversorgung während des Promotionsendspurtes sowie zahlreiche Spritztouren in und um Düsseldorf und in und um Deutschland.

Clécia Maria de Jesus Freitas dafür, dass sie mit südländischem Charme und guter Laune immer dafür gesorgt hat, alles mit dem nötigen Humor zu sehen sowie die gute Zusammenarbeit im Labor.

den Mitgliedern der „Pilzgruppe“ Arnulf Diesel, Clécia Freitas, Amal Hassan, Ine Dewi Indriani und Yudi Rusman für die sterilen Arbeitsbedingungen und die unsterile und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, Arnulf außerdem für die professionelle Hilfe bei diversen Computerproblemen über Wasser sowie Navigationsproblemen und Rettungsaktionen unter Wasser und Ine und Arnulf für die molekularbiologische Identifizierung der QEN- und MGC-Pilzstämmen.

meinen derzeitigen Kollegen: Sofia Lindgren für die schwedische Unterstützung, Yosi Bayu Murti für unverwüthlichen Humor und Hilfsbereitschaft, Bärbel Steffan für den gemeinsamen Endspurt, Suwigarn Pedpradab für exzellente thailändische Kochkünste, Tu Ngoc Duong für den oft sehr interessanten Gedankenaustausch, Mohammed Ashour für die Kameradschaft im Labor, Yasman „Phylidae“, Triana Hertiani, Edi Sri Mulonyo und Sabrin Ibrahim sowie allen anderen Kollegen für eine fröhliche multikulturelle Atmosphäre, die sowohl die Arbeit wie auch die Freizeit nie langweilig werden ließen.

meinen ehemaligen Kollegen: Dr. Birgit Dietz für unermüdliche Aufmunterung und Freundschaft, auch über die große Entfernung nach Chicago hinweg, Dr. Gernot Brauers für die Motivation zu gemeinsamen „Prügeleien“ auf der Matte und diversen anderen sportlichen Aktivitäten und dafür, dass man immer auf ihn zählen konnte, Dr. Carsten Thoms für gutes Teamwork in Praktikum, Labor und Freizeit, Dr. Kerstin Paulus für zahlreiche Schwedenabende mit und ohne Schwedisch, Dr. Gero Eck für viele lustige Aktivitäten indoor, outdoor und off road, Dr. Hefni Effendi für sein fröhliches Lachen und zahlreiche Unternehmungen, Dr. Chaidir für indonesische Sprachübungen, Dr. Jan Hiort für hilfreiche Tipps im Labor und auf der Skipiste, Dr. Raquel Jadulco, Dr. Wafaa Hassan, Dr. Ziyad Baker,

Dr. Anne Schwarte, Dr. Ehab Elkayat, Dr. Mostafa Abdelgawwad, Dr. Haofu Dai und Prof. Changyun Wang sowie auch allen anderen ehemaligen Kollegen dafür, mir den Anfang in Düsseldorf so leicht und angenehm zu gestalten.

Maike Lohrmann für institutsübergreifende Freundschaft und Hilfsbereitschaft unter „Nordlichtern“, sowie den gemeinsamen Endspurt.

den technischen Angestellten Waltraud Schlag, Sabine Borstel, Katrin Kohnert, Katja Friedrich und Katja Rätke für die Hilfe bei der Lösung zahlreicher materieller und organisatorischer Problemstellungen.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei:

Dr. Victor Wray vom GBF in Braunschweig und Prof. Deng von der Beijing Normal University für NMR-Messungen inklusive der Erfüllung von Sonderwünschen und effektive Diskussionen und Hilfestellungen bei der Strukturaufklärung.

Prof. W.E.G. Müller von der Universität Mainz für die Durchführung der Zytotoxizitätstests.

Dr. Schröder von der Bayer AG in Wuppertal für die bereitwillige und fachkundige Beratung zur Problematik der Marfey-Methode.

den Mitarbeitern des NMR- und MS-Service des Institutes für Anorganische und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf für die Durchführung zahlreicher Messungen.

dem DAAD / DST und BMBF / CNCBD für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsaufenthalte in Indien und China.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützt und es mir immer ermöglicht haben, meinen eigenen Weg zu gehen. Indem sie mich immer darin bestärkten, nie zu schnell die Flinte ins Korn oder „das Fahrrad ins Gebüsch“ zu werfen, haben sie diese Arbeit erst ermöglicht. Danke für jegliche moralische und finanzielle Unterstützung, unzählige hilfreiche Ratschläge und großartige Reisen, die mir stets neue Energie gegeben haben.

•••••

Lebenslauf

Name	Franka Teuscher
Geburtsdatum	20.10.1975
Geburtsort	Rostock
Adresse	Kruppstrasse 91, 40227 Düsseldorf
Ausbildung	
1981-1994	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium in Greifswald, Abitur
1994-1999	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
08.1999-01.2000	Praktisches Jahr in der öffentlichen Apotheke: „Holsten-Apotheke“ in Kiel
01.2000-07.2000	Praktisches Jahr in der Krankenhausapotheke: „Sjukhusapoteket“ in Östersund/Schweden
08.2000	Erlangung der Approbation als Apothekerin
11.2000-07.2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am „Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie“ der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
Forschungsaufenthalte	
01.-03.2003	„University of Kerala“, Institute of Aquatic Biology and Fisheries in Trivandrum/ Indien
04.-05.2004	„Institute of Oceanology“ in Qingdao/VR China
05.-06.2004	„Beijing Medical University“, National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs in Peking/VR China

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassozierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans“ selbst angefertigt habe. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in abgewandelter Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben habe, noch dies versucht habe.

Düsseldorf, den 22.05.2005

Franka Teuscher

Franka Teuscher