



# **Isolierung und Strukturaufklärung bioaktiver Naturstoffe aus schwammassozierten Pilzen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Frank Riebe**  
aus Herne

Düsseldorf, November 2009

Aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch  
Koreferent: Prof. Dr. Günther Schmahl

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2009

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 besonders herzlich für die  
Ermöglichung dieser Dissertation bedanken. Ganz besonderen Dank auch für die sehr  
interessante Themenstellung, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die  
guten Arbeitsbedingungen.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Bedeutung der Naturstoffchemie für die Pharmazie .....	1
1.2. Marine Organismen als Quelle neuer Arzneistoffe .....	6
1.3. Marine schwammassoziierte Pilze als Arzneistoffproduzenten .....	8
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit .....	10
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Biologisches Untersuchungsmaterial .....	12
2.1.1. Herstellung der Pilzkulturextrakte .....	13
2.1.2. Taxonomie des Wirtsorganismus .....	14
2.1.3. Taxonomie der ausgewählten Pilzstämme .....	14
2.2. Verwendetes Material und Chemikalien .....	15
2.2.1. Material und Chemikalien für die Dünnschichtchromatographie .....	15
2.2.2. Material und Chemikalien für die Säulenchromatographie .....	15
2.2.3. Material und Chemikalien für die Vakuumflüssigchromatographie .....	15
2.2.4. Lösungsmittel für HPLC- und LC-MS-Proben .....	15
2.2.5. Lösungsmittel für NMR-Proben .....	16
2.2.6. Material und Chemikalien für die Marfey-Reaktion .....	16
2.3. Verwendete Geräte .....	16
2.4. Chromatographische Isolierungsmethoden .....	17
2.4.1. Vakuumflüssigchromatographie (VLC) .....	17
2.4.2. Säulenchromatographie (SC) .....	18
2.4.3. Semipräparative HPLC .....	19
2.5. Analytische Methoden der Chromatographie .....	20
2.5.1. Dünnschichtchromatographie (DC) .....	20
2.5.2. Analytische HPLC .....	21
2.5.3. LC-MS .....	22
2.6. Methoden der Identifizierung und Strukturbestimmung .....	23
2.6.1. UV-VIS-Spektroskopie .....	23
2.6.2. Massenspektrometrie (MS) .....	24
2.6.3. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	25
2.6.4. Polarimetrie .....	25
2.6.5. Ermittlung der absoluten Konfiguration von Aminosäuren .....	26
2.7. Antitumorassay .....	28

3. Ergebnisse .....	29
3.1. Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium spp.</i> .....	29
3.1.1. Griseofulvin .....	30
3.1.2. Meleagrinen .....	36
3.2. Inhaltsstoffe aus <i>Chaetomium sp.</i> .....	38
3.2.1. Chaetochromin A .....	38
3.3. Inhaltsstoffe aus <i>Petriella spp.</i> .....	46
3.3.1. Antibiotic WF-3161 .....	49
3.3.2. Thymin .....	65
3.3.3. Dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff) .....	68
3.3.4. 3`-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff) .....	76
3.3.5. Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff) .....	81
3.4. Inhaltsstoffe aus <i>Nodulisporium sp.</i> .....	87
3.4.1. 5-Methylmellein .....	88
3.4.2. Antibiotic RF-3192C .....	97
3.4.3. Cyclo(L-Phe-L-Leu <sup>1</sup> -L-Leu <sup>2</sup> -L-Leu <sup>3</sup> -L-Ile) .....	103
4. Diskussion .....	110
4.1. Akkumulierung von Pilzen in Schwämmen .....	111
4.2. Schwämme als ergiebige Quelle zur Gewinnung mariner Pilze .....	113
4.3. Marine Pilze als Arzneistoffproduzenten .....	114
4.3.1. Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium spp.</i> .....	115
4.3.2. Inhaltsstoffe aus <i>Chaetomium sp.</i> .....	120
4.3.3. Inhaltsstoffe aus <i>Petriella sp.</i> .....	122
4.3.4. Inhaltsstoffe aus <i>Nodulisporium sp.</i> .....	126
4.4. Potential mariner Pilzmetaboliten als neue Arzneistoffe .....	134
5. Zusammenfassung .....	135
5. Summary .....	139
6. Literaturverzeichnis .....	142
7. Abkürzungsverzeichnis .....	154
Curriculum vitae .....	157
Erklärung .....	158
Danksagungen .....	159

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung der Naturstoffchemie für die Pharmazie

„Chemische Verbindungen, die über biologische Aktivität verfügen und aus natürlichen Quellen, wie z.B. aus Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen stammen, werden als Naturstoffe bezeichnet“ [Baker *et al.*, 2007].

Zahlreiche uralte Überlieferungen dokumentieren, dass Naturstoffe bereits seit Jahrtausenden als Heilmittel zur Therapie verschiedener Krankheiten eingesetzt wurden. Pharmazeutische Aufzeichnungen existieren aus unterschiedlichen Kulturkreisen und verdeutlichen, dass die jahrtausende lang praktizierten traditionellen medizinischen Heilkünste auf Pflanzen basierten [Anon, *Herbalgram*, 1998]. Das älteste Zeugnis der Pharmaziegeschichte stammt aus der Zeit um 2600 v. Chr. und ist sumerischen Ursprungs: In Mesopotamien wurden hunderte von Tontafeln gefunden, auf denen sich Eintragungen zur arzneilichen Anwendung von etwa 1000 verschiedenen Pflanzenölen befinden, die bis heute für die Pharmazie von großem Nutzen sind. Weitere historische Funde sind der „Ebers-Papyrus“, eine um 1500 v. Chr. datierte altägyptische Schriftrollensammlung, in denen 700 Arzneimittel, deren Formulierungen und sonderbare Trägermaterialien, wie Bier, Milch, Wein und Honig beschrieben sind. Das älteste Zeugnis der chinesischen Pharmaziegeschichte ist die *Materia medica*, die jahrhunderte lang geführt wurde und deren erste Aufzeichnung um ca. 1100 v. Chr. entstand. Indischen Ursprungs ist die bis dato noch sehr bekannte und praktizierte Heilkunst des Ayurveda, die um ca. 1000 v. Chr. entstand. In der antiken westlichen Welt trugen die Griechen wesentlich zur Entwicklung bezüglich der Anwendung von Kräuterdrogen bei. Der griechische Philosoph und Naturwissenschaftler Theophrastus beschrieb in seiner „Geschichte der Pflanzen“ bereits, dass Kultivierungsbedingungen entscheidenden Einfluss auf die Qualität von Kräutern ausüben. Die Araber konservierten letztendlich das gesamte antike pharmazeutische Wissen, entwickelten sogar einen Kodex und begründeten im 8. Jh. die ersten im Privatbesitz befindlichen Apotheken. 1618 entstand in England aus dem gesammelten antiken Fachwissen mit der *London Pharmacopoeia* dann das erste Arzneibuch, worin die Idee zur Anwendung von Reinsubstanzen als Arzneimittel postuliert wurde. Hierauf basierten die ersten gezielten Naturstoffisolierungen aus häufig gebrauchten Pflanzen und Kräutern zu Beginn des 19. Jahrhunderts [Newman *et al.*, 2000].

Der erste Naturstoff, das Morphin, wurde im Jahre 1805 von dem Pharmazeuten Friedrich Wilhelm Sertürner aus dem Schlafmohn *Papaver somniferum* isoliert, einer Pflanze, die auch auf den eingangs erwähnten sumerischen Tontafeln verzeichnet ist. Sertürner benannte das aus dem Opium, dem getrocknetem Milchsaft aus den unreifen Früchten des Schlafmohns, isolierte schlafmachende Prinzip nach Morpheus, dem griechischen Gott des Schlafes. Dies gab den Anstoß zur Isolierung vieler anderer Alkaloide (vgl. Tab. 1.1) und war gleichzeitig die Geburtsstunde der modernen Naturstoffchemie als eine neue wissenschaftliche Disziplin. [Huxtable and Schwarz, 2001]. Die Naturstoffchemie ist jener Teilbereich der Chemie, der sich mit den Inhaltsstoffen lebender Organismen befasst. Zu ihren Aufgaben gehören die Isolierung, Identifizierung, Synthese und Strukturaufklärung von Naturstoffen. Heute sind mehr als 40 Opiumalkaloide bekannt, darunter auch Narcotin, Codein, Thebain und Papaverin (vgl. Tab. 1.1)

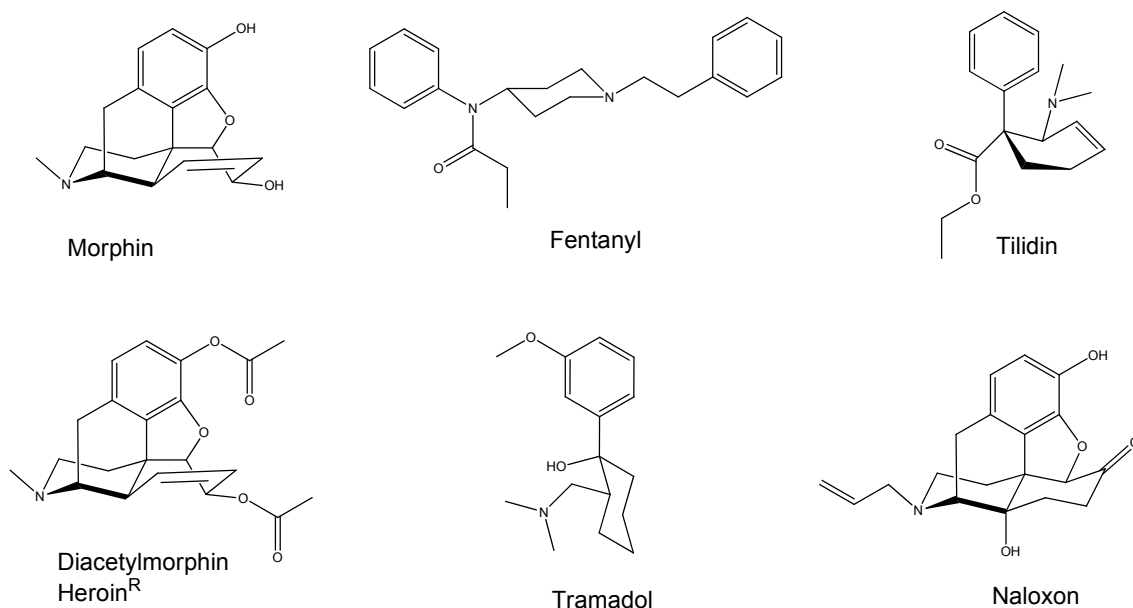
**Tab. 1.1:** Isolierung von Alkaloiden [Huxtable and Schwarz, 2001]

<b>Jahr</b>	<b>Reinsubstanz</b>	<b>Entdecker</b>
1805	Morphin	Sertürner
1817	Narcotin	Robiquet
1818	Strychnin	Caventou und Pelletier
1818	Veratrin	Meissner und Caventou
1819	Colchicin	Meissner und Caventou
1820	Coffein	Runge; Caventou und Pelletier
1820	Chinin	Caventou und Pelletier
1822	Emetin	Pelletier und Magendie
1827	Coniin	Giesecke; Geiger und Hess
1828	Nicotin	Posselt und Reimann
1831	Aconitin	Mein; Geiger und Hess
1832	Codein	Robiquet
1833	Atropin	Geiger und Hess
1833	Thebain	Pelletier und Dumas
1842	Theobromin	Woskresenky
1848	Papaverin	Merck
1851	Cholin	Barbo und Hirschbrunn
1860	Kokain	Niemann
1870	Muscarin	Schmiedelberg und Koppe

Auf das neu entdeckte Prinzip chemische Substanzen aus natürlichem Material rein zu isolieren folgte dann, dass Morphin, als der erste kommerzielle Naturstoff 1826 durch E. Merck industriell vermarktet wurde [Newman *et al.*, 2000]. Später im Jahr 1899 kam dann mit dem Aspirin<sup>®</sup> von der Firma Bayer das erste von einem Naturstoff abgeleitete semisynthetische Arzneimittel auf dem Markt [Grabley and Thiericke, 1999].



Bis heute sind auch ausgehend vom Morphin zahlreiche Derivate entwickelt worden, bei denen pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften verändert wurden: Morphin als Prototyp aus der Natur führte z.B. zur Entwicklung des Fentanyls, einem Analogon, das eine 100fach höhere Wirkintensität besitzt und aufgrund seiner höheren Lipophilie sehr schnell die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Daher wird diese Substanz u.a. in Form von Matrixpflastern (Durogesic<sup>®</sup>) verabreicht, worin sich der Wirkstoff in einer Polymermatrix der Klebeschicht befindet und kontrolliert freigesetzt wird. Das Tramadol, besitzt zwar nur ein Zehntel der analgetischen Wirkstärke des Morphins, verursacht aber weniger Nebenwirkungen wie Atemdepression, Miktionsstörungen und Obstipation und auch das Abhängigkeitspotential ist erheblich reduziert. Pharmakokinetisch ungünstige Eigenschaften wurden partialsynthetisch allerdings mit dem Diacetylmorphin (Heroin<sup>®</sup>) geschaffen, denn eine derart rasante Anflutung im zentralen Nervensystem bedingte das starke Suchtpotential. Um Missbrauch und auch Atemdepression zu vermeiden, wurde ein Präparat, das unter dem Handelsnamen Valoron<sup>®</sup> N bekannt ist, zugelassen, das aus dem partiellen Agonisten Tilidin und dem Opioidantagonisten Naloxon besteht. Naloxon kommt wegen seines sehr hohen First-pass-Effektes bei oraler Applikation und normaler Dosierung nicht zur Wirkung. Nur bei missbräuchlicher Verwendung in überhöhten Dosen oder bei parenteraler Applikation antagonisiert Naloxon die Wirkung von Tilidin und verhindert somit den nicht bestimmungsmäßigen Gebrauch.



**Abb. 1.1:** Vom Morphin abgeleitete Arzneistoffe

Arzneimittel auf Basis von Naturstoffen, können auf drei unterschiedlichen Wegen entstehen: Naturstoffe können direkt unverändert in ihrer ursprünglichen Form zu einem Arzneimittel verarbeitet, partialsynthetisch verändert werden oder als Prototyp für einen rein synthetisch neuen Arzneistoff fungieren [Cragg *et al.*, 1997]. Im Vergleich zu rein synthetischen Substanzen besitzen die meisten Naturstoffe ein höheres Molekulargewicht, enthalten mehr Ringsysteme und sind auch hinsichtlich ihrer Stereochemie komplexer beschaffen [Lawrence, 1999]. Die hohe strukturelle und funktionelle Diversität der Naturstoffe verleiht der Forschung auf den Gebieten der Chemie, Biologie und Medizin neue interessante Anregungen [Nicolaou *et al.*, 2009]. Der Anteil an Naturstoffe unter den 100 meistverkauften Arzneimitteln betrug im September 2002 weltweit 17% mit einem Marktwert von 28,9 Milliarden US-Dollar [Knight *et al.*, 2003]. Insgesamt wurden 13 Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Arzneimittel weltweit zwischen 2005 und 2007 auf dem Markt zugelassen [Butler, 2008].

**Tab. 1.2**

Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Arzneimittel, die weltweit zwischen 2005 und 2007 auf dem Markt zugelassen wurden [Butler, 2008].

Handelsname(n)	Wirkstoff	Leitstruktur	Arzneimittelklasse
Sativex <sup>®</sup>	Dronabinol/Canabidol	Dronabinol/Canabidol	Analgetikum
Flisint <sup>®</sup>	Fumagillin	Fumagillin	Antiparasitikum
Flinibax <sup>®</sup> /Doribax <sup>™</sup>	Doripenem	Thienamycin	Antibiotikum
Tygacil <sup>®</sup>	Tigecyclin	Tetracyclin	Antibiotikum
Prialt <sup>®</sup>	Ziconotid	Ziconotid	Analgetikum
Endeavor <sup>™</sup> stent	Zotarolimus	Sirolimus	Immunsuppressivum
Eraxis <sup>®</sup> /Ecalta <sup>™</sup>	Anidulafungin	Echinocandin B	Antimykotikum
Byretta <sup>™</sup>	Exenatid	Exenatid-4	Antidiabetikum
Vyvanse <sup>™</sup>	Lisdexamphetamin	Amphetamin	Psychotonikum
Altabax <sup>™</sup> /Altargo <sup>™</sup>	Retapamulin	Pleuromutilin	Lokalantibiotikum
Torisel <sup>™</sup>	Temsirolimus	Sirolimus	Zytostatikum
Yondelis <sup>™</sup>	Trabectedin	Trabectedin	Zytostatikum
Ixempra <sup>™</sup>	Ixabepilon	Epothilon B	Zytostatikum

Hierbei stammen die zugrunde liegenden Naturstoffe aus allen erdenklichen natürlichen Quellen. Pflanzlichen Ursprungs ist z.B. das Analgetikum Sativex<sup>®</sup>, das aus einer Mischung der beiden nativen Cannabinoide Dronabinol ( $\Delta^4$ -THC) und Cannabidiol besteht, die beide aus der Hanfpflanze *Cannabis sativa* stammen. Tierischen Ursprungs ist z.B. das Exenatid, ein Peptid bestehend aus 39 Aminosäuren, das aus dem Mundsekret von *Heloderma suspectum*, dem sogenannten Gilamonster, einer giftigen Eidechse isoliert wurde. Mikrobiologischen Ursprungs ist das neu als Arzneistoff zugelassene Fumagillin, das bereits im Jahr 1949 aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus* erstmals isoliert wurde. Ferner handelt es sich bei fünf der neu zugelassenen Präparate um die ersten Vertreter neuer Arzneimittelklassen, was bedeutet, dass diese Naturstoffe einen bisher noch nie da gewesenen pharmakologischen Wirkungsmechanismus beschreiten und somit nach einem völlig neuen Wirkprinzip agieren. Das unter dem Handelsnamen Byretta<sup>™</sup> zugelassene Exenatid z.B. ist ein Inkretinmimetikum, das bei Patienten mit Diabetes zur Verbesserung der Blutzuckerkontrolle herangezogen wird. Es besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit einem menschlichen Hormon, dem Inkretin bzw. Glucagon-like peptid-1 (GLP-1), das im Intestinaltrakt gebildet wird. Exenatid als Analogon des Inkretins (GLP-1), greift am selben Target, dem GLP-1-Rezeptor der Langerhansschen  $\beta$ -Zellen an und fördert über eine Depolarisation der  $\beta$ -Zelle die Insulinfreisetzung. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten GLP-1-Rezeptors ist glucoseabhängig und erfolgt nur in Anwesenheit von Glucose. Via Adenylatzyklase wird der second messenger cAMP freigesetzt, welcher wiederum die Proteinkinase A stimuliert, die dann durch Phosphorylierung bestimmter Proteine des Kaliumkanals diesen verschließt. Mit dem Ziconotid und dem Trabectedin sind erstmals auch zwei marine Naturstoffe in klinischer Anwendung, die beide zudem auch noch als Vertreter einer neuen Arzneistoffklasse gelten. Das Ziconotid z.B. ist ein aus der Seeschnecke *Conus magus* abgeleiteter Wirkstoff, der als Analgetikum zugelassen, über eine selektive Blockade neuronaler N-Typ-Calciumkanäle das Schmerzempfinden unterbindet [Olivera, 2000]. Das unter dem Handelsnamen Yondelis<sup>™</sup> innerhalb der EU zugelassene Trabectedin, das auch unter dem vom Quellorganismus abgeleiteten Trivialnamen Ecteinascidin 743 bekannt ist, bindet kovalent an die DNA und verursacht eine Störung des Zellzyklus.

## 1.2. Marine Organismen als Quelle neuer Arzneistoffe

Die Weltmeere bedecken mehr als 70% der Erdoberfläche, so dass der marine Lebensraum das größte Ökosystem unseres Planeten darstellt. Zahlreiche technische Hindernisse waren in der Vergangenheit der Grund dafür, dass sich auf der Grundlage mariner Naturstoffe keine traditionelle Volksmedizin entwickeln konnte. Erst der Einsatz an Tauchgerät und letztendlich die modernen chemischen Methoden zur Isolierung und Strukturaufklärung chemischer Verbindungen führten zur Entdeckung mariner Arzneistoffe [Jimeno *et al.*, 2004]. Trotz einer großen Anzahl bis heute isolierter Verbindungen ist festzuhalten, dass der marine Lebensraum als Quelle zur Gewinnung neuer pharmazeutisch interessanter Naturstoffe noch einen wertvollen Vorrat beherbergt [Baker *et al.*, 2007]. Zwei Hauptaspekte zeichnen das marine Habitat als ganz besonderen Forschungsraum aus: Zum einen ist es die hohe Biodiversität, die Vielfalt an noch unerforschten und unentdeckten Arten von Lebewesen und andererseits die in diesen Organismen zu erwartende Vielfalt an neuartigen Sekundärstoffen. Diese hohe chemische Diversität resultiert aus den extremen Lebensbedingungen des marinen Habitats, denen die darin lebenden Organismen ausgesetzt sind. Bestimmte Parameter wie hoher Druck, schwankender Salzgehalt, unterschiedliche extreme Temperaturverhältnisse und variabler pH-Wert, stellen hohe Anforderungen an die Anpassungsfähigkeiten der marinen Organismen. Adaptationsprozesse und auch die Ausbildung chemischer Verteidigungsstrategien, machen marine Lebewesen zu Produzenten einer Vielzahl an Sekundärstoffen mit hohem Potential für die Arzneistoffforschung [Bull, 2000; Jimeno *et al.*, 2004]. Insbesondere gilt dies für die Gruppe der sessilen Organismen wie Invertebraten, denen aufgrund mangelnder Mobilität die Möglichkeit zur Flucht vor ihren natürlichen Fraßfeinden ebenso fehlt wie ein mechanischer Schutz. Hinsichtlich Biodiversität und pharmazeutischem Potential der Naturstoffe scheint das Meer dem terrestrischem Ökosystem überlegen zu sein [Jimeno *et al.*, 2004]. Die Forschung nach pharmakologisch aktiven Naturstoffen aus dem Meer bekam einen Anstoß mit der Entdeckung der beiden Stoffe Spongouridin und Spongothymidin aus dem karibischen Schwamm *Cryptotethia crypta* im Jahre 1951 [Bergmann *et al.*, 1955]. Diese beiden Substanzen dienten später dann als Prototyp bei der Entstehung des Virustatikums Vidarabin (Ara-A), das in den 70er Jahren auf dem Markt kam. Bis im Jahre 2002 sind bereits mehr als 17000 Substanzen aus marinen Organismen beschrieben worden [Marinlit, 2003].

Marine Naturstoffe, insbesondere aus Schwämme, erwiesen sich als hochpotente Leitstrukturen bei der Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen besonders auf dem Gebiet der Krebstherapie [Sashidhara *et al.*, 2009].

**Tab. 1.3:**

Klinischer Status einiger ausgewählter mariner Naturstoffe in der Entwicklung zu Zytostatika [Sashidhara *et al.*, 2009]

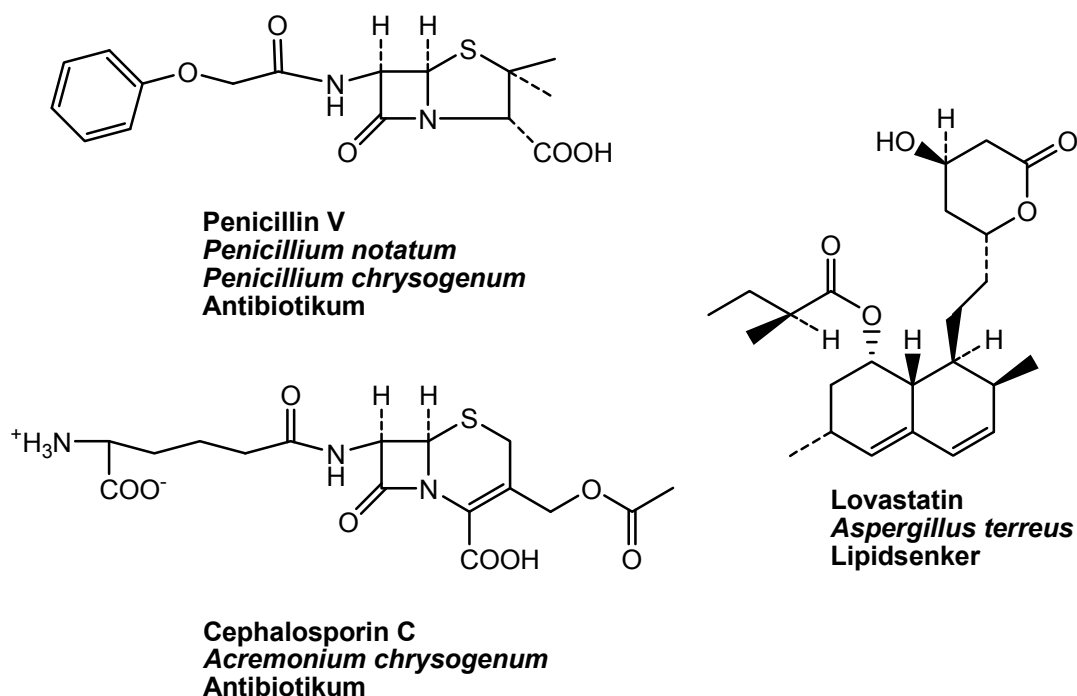
Naturstoff	Quellorganismus	Target	Status
Ecteinascidin 743 (Yondelis <sup>TM</sup> )	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (Tunikat)	DNA	Zugelassen
E7389	synthetisch nach Halichondrin B (Schwamm)	Tubulin	Phase III
Aplidin (Dehydrodidemnin B)	<i>Aplidium albicans</i> (Tunikat)	Ornithin-Decarboxylase	Phase II
Bryostatin 1	<i>Bugala neritina</i> (Bryozoe)	PKC	Phase I
Squalamin	<i>Squalus acanthias</i> (Hai)	Angiogenese	
Kahalalid F	<i>Elysia rufescens</i> (Mollusk)	Multiple	
Zalypsis	synthetisch Jorumycin (Schwamm)	DNA	
Salinosporamid A	Bakterie	Proteosomen	abgebrochen
Spisulosin	Muschel	Rho	
LBH 589	Synthetisch nach Psammaplin (Schwamm)	HDAC	
Didemnin B	<i>Trididemnum solidum</i> (Tunikat)	Antineoplastisch	
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia</i> (Seehase)	Tubulin	
Discodermolid	<i>Discodermia dissoluta</i> (Schwamm)	Tubulin	
Girolin	(Schwamm)	Proteinsynthese	

Die bereits erwähnten Kriterien einer hohen chemischen, biologischen und auch funktionellen Diversität erfüllen auch die hier als Naturstoffe ausgewählten Beispiele. Chemisch betrachtet sind hierbei Stoffklassen wie Polyketide, Alkaloide, Lipide und auch ein Aminosteroid vertreten. Die biologische Organismenvielfalt reicht vom Haifisch, über Muscheln bis zu Bakterien. Dominierend jedoch sind Invertebraten und unter ihnen wiederum Schwämme, die am häufigsten nützliche Naturstoffe produzieren. Funktionell unterscheiden sich alle diese Zytostatika in ihrer breiten Vielfalt an unterschiedlichen pharmakologischen Angriffspunkten zu agieren. Einziger bereits zugelassener Vertreter und damit das erste marine Zytostatikum ist die unter dem Handelsname Yondelis<sup>TM</sup> laufende Substanz Ecteinascidin-743. Chemisch handelt es sich hierbei um ein Tetrahydroisochinolin-Alkaloid, das aus *Ecteinascidia turbinata*, einem karibischen Tunikat isoliert wurde [Rinehart *et al.*, 1990]. Ecteinascidin-743 ist zugelassen zur Therapie des fortgeschrittenen Weichteil-Sarkoms [Blay *et al.*, 2008].

### 1.3. Marine schwammassoziierte Pilze als Arzneistoffproduzenten

Der erste bedeutende Meilenstein bei der Entwicklung von Arzneistoffen aus mikrobiologischen Quellen ist die Entdeckung des Penicillins durch Fleming 1928. Die pharmazeutische Relevanz wurde aber erst in den 1940er Jahren erkannt als eine Gruppe von Forschern die antibiotische Wirksamkeit in klinischen Studien herausfand. Dies gab dann den Anstoss für eine ausgiebige mikrobiologische Forschung, aus der zahlreiche bis heute noch als Arzneimittel angewendete Antibiotika wie z.B. Chloramphenicol, Chlortetracyclin und Erythromycin hervorgingen [Butler, 2004; Bugni and Ireland, 2004]. Später wurden die Screening-Verfahren nach wirkungsmechanistischen Targets ausgerichtet und Stoffe in einem bioassay-begleitendem Monitoring isoliert. Dies führte in den 1970er Jahren zur Entdeckung des Mevastatins aus *Penicillium citrinum* [Endo *et al.*, 1976] und später auch anderen HMG-CoA-Reductase-Inhibitoren [Butler, 2004]. Das Lovastatin, das ursprünglich aus Kulturen von *Aspergillus terreus* isoliert wurde [Alberts *et al.*, 1980], war die erste auf dem Markt erschienene Verbindung aus der Klasse der Statine. Analog zum terrestrischen Habitat gab es eine Entdeckung in den 1940er Jahren, die als Beginn einer marin-orientierten mikrobiologischen Arzneistoffforschung gewertet werden kann. In einer Meerwasserprobe aus dem Mittelmeer wurde der Pilz *Acremonium chrysogenum* (Gams, 1971) von Giuseppe Brotzu isoliert und kultiviert [Kelecom, 2002; Bugni and Ireland, 2004]. Die wirksamkeitsbestimmende Komponente wurde aber erst fast 10 Jahre später aufgespürt und erwies sich als Cephalosporin C [Newton and Abraham, 1955]. Als Leitstruktur fungierend, konnten von diesem Naturstoff als Prototyp ausgehend die modernen Cephalosporin-Antibiotika abgeleitet werden, die bis heute unverzichtbar bei der Therapie zahlreicher bakterieller Infektionskrankheiten sind [Abraham and Loder, 1972]. *Acremonium chrysogenum* war der erste marine Pilz, der als Wirkstoffproduzent therapeutische Relevanz erlangte. Die weiteren Forschungen führten bis zum Jahr 2002 zu 272 neuen Naturstoffen, die aus marinen Pilzen isoliert werden konnten, darunter zahlreiche Substanzen mit einem völlig neuem Kohlenstoffgerüst [Bugni and Ireland, 2004]. Dies ist ein Beweis dafür, dass marine Pilze ein enormes Potential besitzen und als ergiebige Quelle bei der Suche nach pharmazeutischen Leitstrukturen nützlich sind. Zwischen 2002 und 2004 wurden weitere 240 Substanzen beschrieben und die Entwicklung mariner Pilze als „bedeutende Quelle von strukturell beispiellosen Metaboliten“ gewertet [Ebel, 2006].

Zur Gewinnung mariner Pilze haben sich Schwämme als eine der bedeutendsten Quellen zur Isolierung chemisch produktiver mariner Pilze erwiesen [Höller *et al.*, 2000; Jensen and Fenical 2002; Bugni and Ireland 2004; Ebel 2006]. Generell bieten Mikroorganismen als Naturstoffproduzenten den Vorteil zur biotechnologischen Fermentation im großen Maßstab und mit geringem Kostenaufwand, so dass die Sekundärstoffgewinnung keine Ausbeutung natürlicher Ressourcen zur Folge hätte. Beispiel für eine biotechnologische Massenproduktion ist das Sorbicillacton A. Dieses ist ein Alkaloid und stammt aus dem schwammassoziierten marinen Pilz *Penicillium chrysogenum* und soll als potentieller Arzneistoff gegen Leukämie in die präklinische Phase gehen. Um ausreichend große Mengen dieses Naturstoffes zur Verfügung zu stellen, wurden biotechnologische Verfahren zur Massenkultur dieses Pilzstammes entwickelt [Bringmann *et al.*, 2007]. Mikroorganismen haben im Vergleich zu Makroorganismen zudem den Vorteil, dass sie leichter genetisch manipulierbar sind, so dass eine gezielte Beeinflussung der Wirkstoffproduktion oder der pharmakologischen Eigenschaften möglich wäre. Zahlreiche Arzneistoffe, wie z.B. Insuline, Interferone und Fibrinolytika, werden heutzutage gentechnisch mit Hilfe von Bakterien produziert.



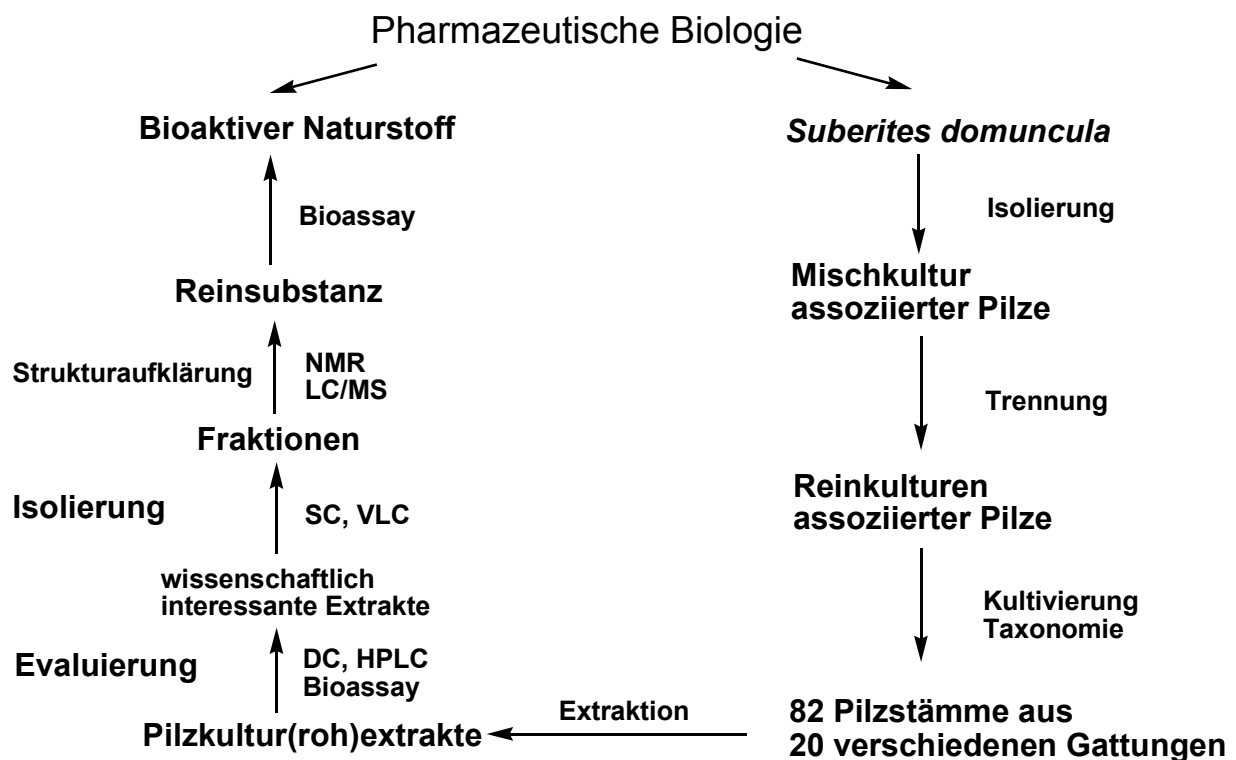
**Abb. 1.2:** Arzneistoffe aus Pilzen

## 1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Unter dem Aspekt der marinen Naturstoffforschung sind Invertebraten Hauptgegenstand der Untersuchung in unserem Arbeitskreis. Unter anderem haben sich Schwämme als ergiebige Quelle zahlreicher interessanter Naturstoffe erwiesen. In pharmazeutischer Hinsicht ergaben Untersuchungen, dass die meisten dieser Inhaltsstoffe inhibitorische Wirkungen auf proliferierenden Zellen ausüben. Als potentielle Arzneistoffe zur Therapie von Krebserkrankungen befinden sich zahlreiche marine Naturstoffe bereits in klinischer Prüfung und mit dem Ecteinascidin-743 ist erstmals sogar ein mariner Naturstoff als Zytostatikum im klinischen Gebrauch (vgl. 1.2.). Im Verlauf der Forschungen wurde erkannt, dass Schwämme eine Fülle von Mikroorganismen wie Pilze beherbergen, die häufig als eigentliche Produzenten dieser Naturstoffe anzusehen sind. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung assoziierter Pilze, die aus dem mediterranen Schwamm der Art *Suberites domuncula* isoliert wurden. Entscheidendes Kriterium bei der Auswahl des Forschungsobjektes war die Tatsache, dass diese Schwammspecies über mehrere Monate bis hin zu einem Jahr sehr leicht unter künstlichen Bedingungen gehalten werden konnte. Insgesamt wurden 82 verschiedene Pilzstämmen daraus isoliert, kultiviert und anschließend das Material extrahiert. Die Kulturextrakte aller Stämme wurden in einem ersten Screening hinsichtlich Chemie und zytotoxischer Eigenschaften untersucht. Einen ersten Überblick über die chemische Zusammensetzung verschafften chromatographische Methoden wie DC und HPLC sowie die Massenspektrometrie. Die zytotoxischen Eigenschaften der Extrakte wurden in einem Bioassay an unterschiedlichen Arten von Tumorzellen getestet. Hauptaspekt dieser Arbeit war es, die für die Zytotoxizität verantwortlichen wirksamkeitsbestimmenden Substanzen eines Extrakts gezielt aufzuspüren und zu isolieren mit dem Ziel, neue Leitstrukturen zu finden, die bei der Entwicklung neuer Krebsmedikamente hilfreich sein können. Die Evaluierung und daraufhin die Auswahl der zu Untersuchungen herangezogenen Extrakte erfolgte primär auf der Grundlage der biologischen Testergebnisse. Die ausgewählten aktivsten Arten wurden dann in einem Grossansatz kultiviert, um ausreichend Extrakt für eine gezielte bioassay-begleitende Isolierung zur Verfügung zu stellen. Um einzelne Verbindungen als Reinsubstanzen zu isolieren, wurden präparative säulenchromatographische Techniken angewendet. Die Strukturaufklärung gewonnener Reinsubstanzen erfolgte unter Anwendung ein- und zweidimensionaler Kernspinresonanz-Experimente.



Unabhängig von den zytotoxischen Eigenschaften der Pilze war die chemische Diversität ein weiterer wissenschaftlicher Aspekt dieser Arbeit. Hierbei wurde das Potential mariner Pilze als Produzenten pharmazeutisch relevanter Leitstrukturen dargestellt. Chemisch interessante und analytisch aussichtsreiche Extrakte wurden untersucht, um Aussagen zur chemischen Produktivität und Diversität des entsprechenden Pilzes machen zu können.



**Abb. 1.3:** Vom marinen Organismus zu bioaktiven Naturstoffen

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Biologisches Untersuchungsmaterial

Ausgangsmaterial der analytisch-chemischen Untersuchungen waren marine Pilzkulturextrakte, die aus schwammassoziierten Pilzstämmen am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig hergestellt wurden. Alle Pilzstämme waren Isolate aus dem mediterranen Schwamm *Suberites domuncula*.

**Tab. 2.1:** Auflistung aller 82 isolierten Pilzstämmen aus *Suberites domuncula*

Stamm Nr.	Organismus	Stamm Nr.	Organismus	Stamm Nr.	Organismus
7968	Acremonium	8006	Exophiala	7997	Phialophora
7996	Acremonium	8007	Exophiala	7998	Phialophora
8026	Acremonium	8008	Exophiala	7999	Phialophora
8009	Aspergillus	9140	Exophiala	8000	Phialophora
8025	Basidiomycete	9147	Exophiala	8011	Phialophora
7972	Beauveria alba	7965	Fusarium	8016	Phialophora
<b>9142</b>	<b>Chaetomium</b>	9136	Fusarium	8018	Phialophora
7984	Cladosporium	7995	Gliomastix	8022	Phialophora
7985	Cladosporium	<b>9149</b>	<b>Nodulisporium</b>	9146	Phialophora
7986	Cladosporium	7994	Paecilomyces	9150	Phialophora
7988	Cladosporium	9138	Paecilomyces	9152	Phoma
7989	Cladosporium	7976	Penicillium	8017	Scopulariopsis
7990	Cladosporium	7977	Penicillium	8010	Sporobolomyces
7991	Cladosporium	7978	Penicillium	8002	Stemphylium
7992	Cladosporium	7979	Penicillium	8028	Stilbella
7993	Cladosporium	<b>7980</b>	<b>Penicillium</b>	8024	Tolyposcladium
8019	Cladosporium	7981	Penicillium	8015	Trichoderma
8020	Cladosporium	7982	Penicillium	9139	Trichoderma
9135	Cladosporium	7983	Penicillium	8023	unbekannt
9143	Cladosporium	9151	Penicillium	8027	unbekannt
7969	Engyodontium album	9153	Penicillium	9141	unbekannt
7970	Engyodontium album	7958	Petriella	9144	unbekannt
7971	Engyodontium album	7959	Petriella	9145	unbekannt
7973	Engyodontium album	7960	Petriella	9148	unbekannt
7974	Engyodontium album	<b>7961</b>	<b>Petriella</b>		
7975	Engyodontium album	<b>7962</b>	<b>Petriella</b>		
7987	Engyodontium album	7963	Petriella		
8014	Engyodontium album	7964	Petriella		
8021	Engyodontium album				
9137	Engyodontium album				

Die hervorgehobenen Stämme wurden aufgrund von Testergebnissen oder durch chemische Evaluation genauer analysiert.

### 2.1.1. Herstellung der Pilzkulturextrakte

Der marine Schwamm mit der taxonomischen Bezeichnung *Suberites domuncula* diente als Quelle zur Gewinnung der 82 Pilzstämmen. Die Sammlung der Proben erfolgte in der nördlichen Adria bei Rovinj in Kroatien. Die gesammelten Exemplare wurden dann am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig in Aquarien mit einem Fassungsvermögen von 200 Liter gehalten. Die Haltung betrug vier Wochen bei 17°C [Le Pennec *et al.* 2003] im künstlichen Seewasser bei pH 8. Die Fütterung der Schwämme erfolgte jeden zweiten Tag mit 5 ml Coraliquid, einer flüssigen Nahrung auf Planktonbasis (Sera; Heinsberg und Bohse Aquaristik, Bonn) sowie mit 20 ml „Marinvit-Plus“, einem Präparat aus den Spurenelementen Strontium, Molybdat, Lithium, Rubidium und Iod (Sera, Heinsberg). Nach Ablauf der vier Wochen wurden die Schwämme 30 Sekunden lang in 70 %igem Ethanol sterilisiert und anschließend in drei aufeinanderfolgenden Waschgängen in sterilem, künstlichem Meerwasser bearbeitet. Zur Isolierung der assoziierten Pilze wurde das Schwammgewebe in kleine Segmente von ca. 1,5 x 1,5 mm zerschnitten und auf einem Nähragar aus Karotten und Kartoffel als Wachstumsmedium gelegt [Höllner *et al.* 2000]. Bei dem auftauchenden Pilzmyzel handelte es sich zunächst um eine Mischkultur für die es galt, die unterschiedlichen Arten voneinander zu separieren. Die Identitäten der sporulierenden Isolate wurden bis zur Stufe der Gattung morphologisch und molekularbiologisch bestimmt. Die Reinkulturen wurden 21 Tage lang bei 22°C auf zwei verschiedenen Medien herangezogen. Bei den Medien handelte es sich Biomalagar [Höllner *et al.* 2000] und Dinkelgerste Festsubstrat-Medium bestehend aus 200g Gerste, 200g Dinkel, 2g Sojaprotein, 2 mg MnCl<sub>2</sub> und 250 ml destilliertem Wasser. Die Kulturen wurden lyophilisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die getrockneten Rückstände wurden anschließend noch mit Petrolether entfettet.

### 2.1.2. Taxonomie des Wirtsorganismus

**Reich:** Invertebraten  
**Abteilung:** Porifera  
**Klasse:** Demospongiae  
**Ordnung:** Hadromerida  
**Familie:** Suberitidae  
**Gattung:** Suberites  
**Art:** *Suberites domuncula*

### 2.1.3. Taxonomie der ausgewählten Pilzstämme

**Reich:** Pilze  
**Abteilung:** Ascomycota  
**Klasse:** Euascomycetes  
**Ordnung:** Eurotiales  
**Familie:** Trichomaceae  
**Gattung:** *Penicillium*  
**Art:** *Penicillium sp.*

**Reich:** Pilze  
**Abteilung:** Ascomycota  
**Klasse:** Sordariomycetes  
**Ordnung:** Sordariales  
**Familie:** Chaetomiaceae  
**Gattung:** *Chaetomium*  
**Art:** *Chaetomium sp.*

**Reich:** Pilze  
**Abteilung:** Ascomycota  
**Klasse:** Ascomycetes  
**Ordnung:** Ascotiales  
**Familie:** Microascaceae  
**Gattung:** *Petriella*  
**Art:** *Petriella sp.*

**Reich:** Pilze  
**Abteilung:** Ascomycota  
**Klasse:** Sordariomycetes  
**Ordnung:** Xylariales  
**Familie:** Xylariaceae  
**Gattung:** *Nodulisporium*  
**Art:** *Nodulisporium sp.*

## 2.2. Verwendetes Material und Chemikalien

### 2.2.1. Material und Chemikalien für die Dünnschichtchromatographie

#### DC-Fertigplatten als stationäre Phase

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F <sub>254</sub> 0,2 mm Schichtdicke	Merck
DC-Fertigplatten RP-18 F <sub>254</sub> 0,25 mm Schichtdicke	Merck
DC-Fertigplatten Diol	Merck

#### Lösungsmittel zur Herstellung der Fließmittel

Aceton	ZCL
Dichlormethan	ZCL
Ethylacetat	ZCL
Hexan	ZCL
Methanol	ZCL

### 2.2.2. Material und Chemikalien für die Säulenchromatographie

#### Stationäre Phasen

Kieselgel 60	Korngröße 0,2-0,5 mm	Merck
Sephadex LH-20	Korngröße 0,025-0,10 mm	Sigma

#### Lösungsmittel zur Herstellung der Fließmittel

Dichlormethan	ZCL
Methanol	ZCL

### 2.2.3. Material und Chemikalien für die Vakuumflüssigchromatographie

#### Als Fließmittel verwendete Lösungsmittel

vgl. Kapitel 2.2.1.

#### Stationäre Phase

Kieselgel 60, vgl. Kapitel 2.2.2.

#### Besondere Materialien als Hilfsmittel

Seesand

Glaswolle

### 2.2.4. Lösungsmittel für HPLC- und LC-MS-Proben

Acetonitril	LiChroSolv HPLC grade	Merck
Methanol	LiChroSolv HPLC grade	Merck

### 2.2.5. Lösungsmittel für NMR-Proben

Chloroform, deuteriert	euriso-top
Dimethylsulfoxid, deuteriert	euriso-top
Methanol, deuteriert	euriso-top

### 2.2.6. Material und Chemikalien für die Marfey-Reaktion

Zuschmelzkapillare

Aminosäure-Standards	ICN
FDLA	TCI
HCl	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck

### 2.3. Verwendete Geräte

Fraktionssammler	Retriever II	ISCO
Gefriertrockner	Lyovac GT2	Steris
Gefriertruhe	86-Freezer	Forma Scientific
Heizplatte		Camag
Polarimeter	341 LC	Perkin-Elmer
Rotationsverdampfer	Rotavapor R200	Büchi
Trockenschrank	Kelvitron	Heraeus
Ultraschallbad	Sonorex RK 510S	Bandelin
UV-Lampe	UV-Betrachter	Camag
Vakuumzentrifuge	SpeedVac SPD 111V	Savant
Waagen	Sartorius 2354	Sartorius
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus

## **2.4. Chromatographische Isolierungsmethoden**

Die als wissenschaftlich für interessant befundenen marinen Pilzkulturextrakte wurden schrittweise aufgetrennt, mit dem Ziel Reinsubstanzen zu erhalten.

### **2.4.1. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)**

Die VLC ist eine Sonderform der säulenchromatographischen Auftrennung von Stoffgemischen. Bei dieser Technik wird der gesamte Trennvorgang durch ein angelegtes Vakuum beschleunigt und folglich die einzelnen Fraktionen schneller eluiert. Zur Anwendung kam dieses Verfahren als erster Trennschritt bei Rohextrakten, um eine erste grobe Vorabtrennung zu erzielen. Die Apparatur besteht aus einer nach oben geöffneten Glassäule, deren Boden aus einer Fritte besteht. Unterhalb dieser Fritte befindet sich über dem Abflussrohr ein seitlicher Auslass als Zugang zum Anlegen eines Vakuums. Die Säule wurde von der Fritte ab aufsteigend mit einigen Hilfsmitteln und der stationären Phase befüllt. Der Säulenboden wurde zuerst mit etwas Glaswolle und dann mit einer Schicht aus Seesand bedeckt, um zu verhindern, dass die Fritte mit feinkörniger stationärer Phase verstopft. Anschließend erfolgte die Befüllung mit einer dicken Schicht Kieselgel als der stationären Phase. Der Rohextrakt wurde dann mit einem geringen Volumen eines geeigneten Lösungsmittels angelöst und in wenig Kieselgel eingearbeitet, bis diese Mischung eine trockene und fließfähige Konsistenz annahm. In dieser Form wurde der Rohextrakt dann auf die stationäre Phase aufgebracht und mit Glaswolle, gefolgt von etwas Seesand abgedeckt. Diese Hilfsmittel dienten zur Stabilisierung des Systems, um Verwirbelungen beim Aufgießen der Fließmittel zu vermeiden. Nach dem Anschluss einer Vakuumpumpe wurden definierte Volumina an Fließmitteln nach aufsteigender Polarität auf die Säule gegeben. Zunächst als Vorlauf reines Hexan, gefolgt von Gemischen aus Hexan mit Ethylacetat und später Kombinationen von Dichlormethan mit Methanol. Als Nachlauf wurde zum Schluss nochmals mit reinem Methanol gespült.

### 2.4.2. Säulenchromatographie (SC)

Einfache Glassäulen unterschiedlicher Länge und variablem Durchmesser konnten der jeweiligen Menge an Untersuchungsmaterial angepasst werden. Zur Feinauftrennung kleinerer Mengen kam dieses Verfahren als erster Trennschritt bei Rohextrakte sowie auch als Folgetrennung einzelner Fraktionen aus einer VLC zur Anwendung. Die Anzahl der resultierenden Fraktionen ist hierbei um ca. Faktor 10 größer als bei der VLC. Ferner ist diese Methode auch erheblich zeitaufwendiger, da der Fluss lediglich durch die Schwerkraft aufrechterhalten wird. Ein auf variable Zeiteinheiten programmierbarer Fraktionssammler diente hierbei zum Auffangen der einzelnen Fraktionen. Je nach den physikochemischen Eigenschaften der zu trennenden Substanzen, erfolgte die Wahl der Kombination aus Fließmittel und stationärer Phase wie folgt:

<b>Stoffeigenschaft</b>	<b>Stationäre Phase</b>	<b>Fließmittelsysteme</b>
polar	Kieselgel 60	DCM/MeOH
semipolar	Diol	EtOAc/n-Hexan
lipophil	RP 18	MeOH / H <sub>2</sub> O
Molekülgröße	Sephadex LH-20	MeOH / DCM oder Aceton

Trennverfahren unter Anwendung von Kieselgel, Diol und RP 18 basieren auf der unterschiedlichen Polarität der zu trennenden Stoffe in einem Gemisch. Trennungen mit Sephadex-Material unterliegen neben Adsorptionsvorgängen vor allem der Größenausschlusschromatographie. Dieses Material eignete sich daher besonders für Stoffgemische, in denen die Moleküle stark in Molekülgröße bzw. Molekulargewicht variierten. Dabei wurden größere Moleküle früher eluiert als kleinere. Die physikochemischen Eigenschaften der zu trennenden Stoffe wurden zuvor mit Hilfe der unter 2.5. beschriebenen analytischen Methoden bestimmt.



### 2.4.3. Semipräparative HPLC

Die Anwendung der semipräparativen HPLC ist als letzter Schritt zur endgültigen Isolierung von Reinsubstanzen anzusehen. Mittels dieser Methode wurden Reinsubstanzen aufgereinigt oder aus Fraktionen mit einfacher Zusammensetzung gewonnen. Das Fließmittelsystem war ein Gradient aus NANOpur-Wasser und Methanol. Die Flussrate war auf 5 ml/min eingestellt. Ein UV-Detektor signalisierte den Zeitpunkt des Verlassens der Säule jeder einzelnen Substanz, welche genau dann in einem Reagenzglas aufgefangen und angereichert wurde.

#### Komponenten der semipräparativen HPLC-Anlage

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

## **2.5. Analytische Methoden der Chromatographie**

### **2.5.1. Dünnschichtchromatographie (DC)**

Als analytische Untersuchungsmethode der Wahl wurde die Dünnschichtchromatographie universell eingesetzt. Zur Evaluierung der Rohextrakte wurden qualitative und quantitative Erkenntnisse bezüglich deren Zusammensetzung und Komplexität gewonnen. Als Validierungsverfahren für eine Säulenchromatographie wurde die DC zur Untersuchung resultierender Fraktionen eingesetzt. Ferner konnten isolierte Reinsubstanzen auf Reinheit überprüft werden. Unter Anwendung der DC konnten Fließmittelsysteme für eine Säulentrennung optimiert werden. Die zu analysierenden Proben wurden mit einer Glaskapillare bandenförmig auf die entsprechende DC-Fertigplatte aufgetragen und unter Kammersättigung bei einer Laufstrecke von 8 cm chromatographiert. Die verwendeten DC-Fertigplatten und die verschiedenen Fließmittelsysteme wurden bereits unter Punkt 2.2.1. vorgestellt. Unter einem UV-Betrachter wurden die getrennten Verbindungen bei 254 nm durch Fluoreszenzlöschung oder bei 366 nm durch Eigenfluoreszenz visualisiert. Nach Markierung der sichtbaren Banden wurden die Platten mit dem Standard-Derivatisierungsreagenz Anisaldehyd (DAB 10) besprüht und anschließend auf einer Heizplatte bei 110°C entwickelt.

### 2.5.2. Analytische HPLC

Wie bereits für die DC unter B.5.1. beschrieben, fungierte auch die HPLC als Evaluierungsverfahren für Rohextrakte, zur Validierung säulenchromatographischer Isolierungsvorgänge und zur Prüfung der Reinheit isolierter Naturstoffe. Durch die Aufnahme der UV-Spektren einzelner Substanzen konnten hierbei bereits durch Abgleich mit einer hinterlegten UV-Spektrendatenbank bekannte Verbindungen identifiziert werden. Im folgendem werden die technischen Daten der HPLC-Anlage und die Chromatographiebedingungen dargelegt.

Steuerungssoftware	Chromeleon V6.3	
Probengeber	ASI-100	Dionex
Pumpe	P 580	Dionex
Säule	Eurospher 100-RP18	Knauer
Säulenofen	STH 585	Dionex
Detektor	UVD 340 S	Dionex
Injektionsvolumen	20 µl	
Flussrate	1 ml/min	
Detektionswellenlänge	200-595 nm	
Elutionsmittel A	NANOpur-Wasser, eingestellt auf pH 2 mit ortho-Phosphorsäure 85 % p.a.	
Elutionsmittel B	100 % Methanol HPLC grade	

Zeit [min]	Elutionsmittel A [%]	Elutionsmittel B [%]
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
46	90	10
60	90	10

Zur Optimierung einer Trennung konnte der Gradient ggf. auch verändert werden.

### 2.5.3. LC-MS

Die Kopplung einer HPLC-Anlage mit einem Massenspektrometer ermöglichte neben der Bestimmung der Molekulargewichte von Reinsubstanzen auch jene einzelner Substanzen als Komponenten eines Gemisches. Außerdem konnten auf dieser Anlage Substanzen detektiert werden, die im UV-VIS-Bereich nicht absorbierten und demnach auch nicht in einem Chromatogramm der analytischen HPLC signalisiert werden konnten.

Analysen mittels LC-MS wurden mit folgenden Komponenten durchgeführt:

Steuerungssoftware	Xcalibur, Version 1.3	
HPLC	HP 1100	Agilent
Injektor	G 1313 A ALS 1100	Agilent
Pumpe	Edwards 30	BOC
Säule	Eurospher 100 RP 18A	Knauer
MS	Finnigan LCQ <sup>Deca</sup>	Thermoquest
Ionenquelle	ESI und APCI	Thermoquest
Detektor	G 1315 B DAD 1100	Agilent

Standardmessungen verliefen unter folgenden Bedingungen:

Messmodus	ESI <sup>+</sup> und ESI <sup>-</sup>
Flussrate	0,4 ml/min
Elutionsmittel A	NANOpur-Wasser, angesäuert mit 0,1 % Ameisensäure
Elutionsmittel B	Acetonitril

Standardgradient

Zeit [min]	Elutionsmittel A [%]	Elutionsmittel B [%]
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
46	90	10
60	90	10

## **2.6. Methoden der Identifizierung und Strukturbestimmung**

### **2.6.1. UV-VIS-Spektroskopie**

Substanzen, die im UV-Vis-Bereich Licht bestimmter Wellenlängen absorbieren, vermögen dies nach einem für sie charakteristischem Muster. Das UV-Absorptionsspektrum ist wie ein Fingerabdruck für die Identität einer bestimmten chemischen Grundstruktur und deren Analoga anzusehen. UV-Spektren wurden im Bereich von 210-595 nm mit Hilfe des DAD-Detektors der analytischen HPLC aufgenommen. Zur Identifizierung wurden die Spektren mit denen bereits bekannter Substanzen verglichen. Dies geschah durch eine integrierte Datenbank der analytischen HPLC, die über eine Bibliothek von Spektren vieler bekannter Verbindungen verfügte. Ferner konnten zum Vergleich auch Literaturwerte herangezogen werden.

## **2.6.2. Massenspektrometrie (MS)**

Massenspektrometrischen Verfahren ermöglichen nicht allein eine Bestimmung der Molekülmasse, sondern zeigen auch charakteristische Fragmentierungsmuster von Substanzen, die für die Entschlüsselung der Struktur von großer Bedeutung sein konnten. Die hochauflösende HRESIMS gibt Aufschluss über die Summenformel einer chemischen Verbindung.

### **ESI-MS (Electro-Spray-Ionisation)**

Die zu vermessende methanolische Probenlösung wird bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von 2-5 kV durch eine Kapillare gesprüht. Dabei wird die Untersuchungslösung in elektrisch geladenen Tröpfchen zerstäubt und dann entsprechend ihrer Größe und Ladung detektiert.

### **EI-MS (Electron-Impact)**

Bei diesem Experiment wird die trockene Untersuchungssubstanz verdampft und dann in einem Hochvakuum überführt. Nach Ionisierung mit einem Elektronenstrahl (10-100 eV) werden dann die Ionen in einem angelegten Magnetfeld beschleunigt. Durch kontinuierliches Verändern der Feldstärke werden die Ionen dann aufgrund unterschiedlicher Massen getrennt und detektiert. Dieses Verfahren verursacht eine starke Fragmentierung der Moleküle. Durch Interpretation der Fragmentierungsmuster lassen sich wichtige strukturelle Erkenntnisse ableiten. Die Aufnahme von EI-Spektren erfolgte am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf mit einem Gerät des Typs Finnegan MAT 8200.

### **HR-MS (High-Resolution)**

Hierbei handelt es sich um ein hochauflösendes Verfahren, bei dem die exakte Masse eines Moleküls bestimmt wird. Daraus ist die elementare Zusammensetzung und folglich auch die Summenformel einer Verbindung ableitbar.

### 2.6.3. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Elementare Bedeutung bei der Strukturbestimmung der Naturstoffe hatten die verschiedenen Experimente der Kernspinresonanz. Gemessene Parameter waren hierbei die chemischen Verschiebungen ( $\delta$  in ppm), Kopplungskonstanten (J in Hz) und Integrale der Peakflächen von Protonen. Gemessen wurden die 1D-Experimente  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR sowie die 2D-Experimente H-H-COSY und HMBC. Die zu vermessenden Proben wurden je nach Löslichkeit in unterschiedlichen deuterierten Lösungsmitteln gelöst und vermessen. Als Lösungsmittel dienten deuteriertes Methanol  $\text{CD}_3\text{OD}$ , deuteriertes Chloroform  $\text{CDCl}_3$  und deuteriertes Dimethylsulfoxid  $\text{DMSO-d}_6$ . Die meisten der Experimente wurden durchgeführt am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf durch Dr. Peters mit einem Gerät des Typs DRX-500, Bruker. Ein Teil der Messungen erfolgten am Helmholtz-Institut für Infektionsforschung in Braunschweig durch Dr. Wray mit einem Spektrometer vom Typ DMX-600, Bruker. Das Spektrenmaterial wurde bearbeitet mit Hilfe der Software WinNMR.

### 2.6.4. Polarimetrie

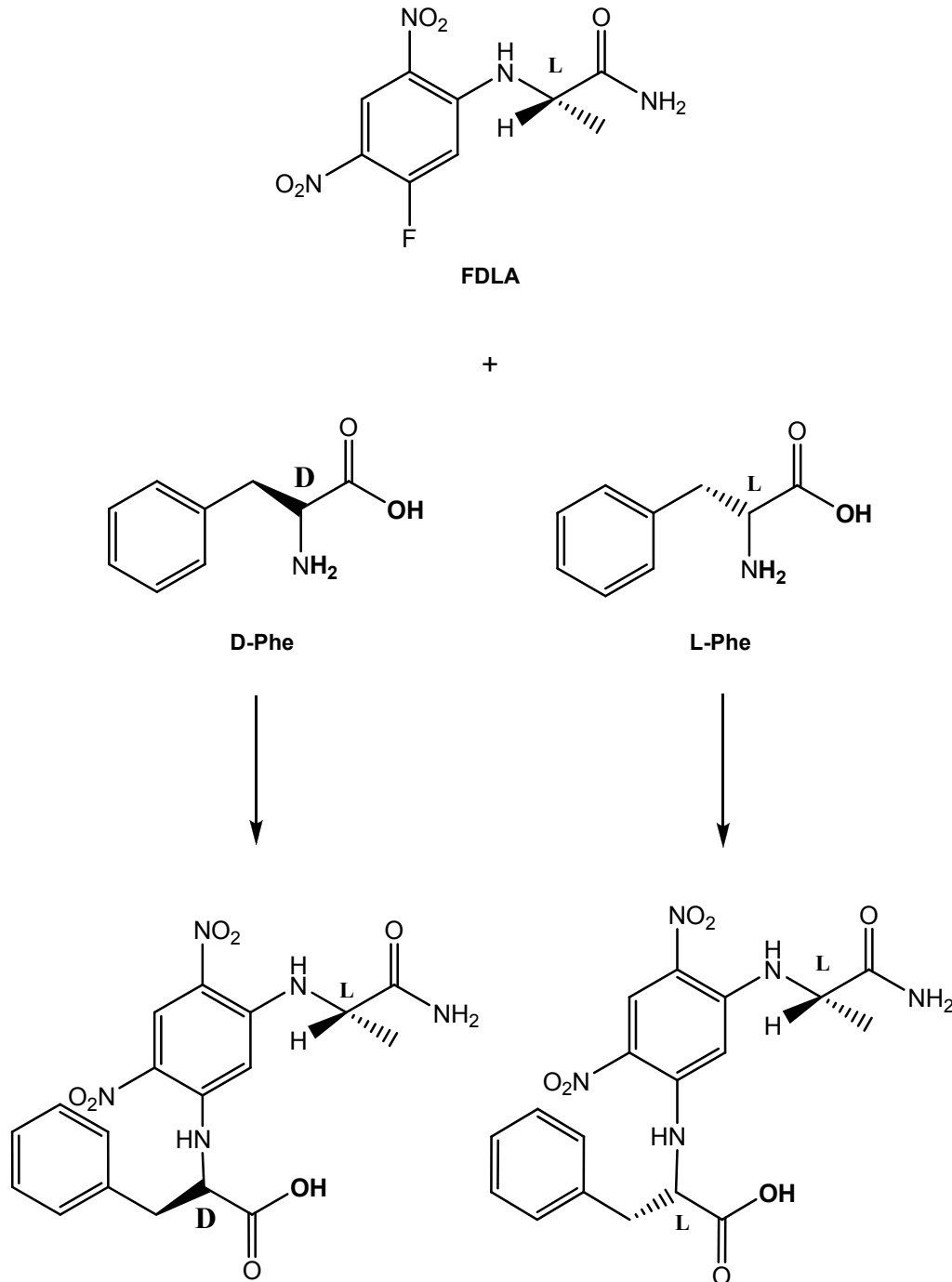
Die Messung der optischen Drehung leistete einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Stereochemie einer chiralen Verbindung. Die analytische Bedeutung dieser Messung beschränkte sich jedoch nur auf bereits bekannte chirale Naturstoffe, von denen auch der Drehwert bekannt und publiziert war. In diesen Fällen gab der Drehsinn Aufschluss darüber, um welches Enantiomer es sich bei der zu untersuchenden chiralen Reinsubstanz handelte. Besitzt der Drehwert ein positives Vorzeichen liegt das rechtsdrehende D- bzw. (+)-Isomer vor oder dominiert zumindest, dagegen steht ein negatives Vorzeichen für das linksdrehende L- bzw. (-)-Isomer. Das zur Messung verwendete Gerät war ein Polarimeter vom Typ 341 LC der Firma Perkin Elmer (vgl. 2.3.). Die chirale Reinsubstanz wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit linear polarisiertem Licht der Natrium-D-Linie von 589 nm vermessen. Die Messungen erfolgten bei 20°C in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 cm. Zu Vergleichszwecken wurde bei bekannten Naturstoffen das in der Literatur angegebene Lösungsmittel gewählt.

### 2.6.5. Ermittlung der absoluten Konfiguration von Aminosäuren

Speziell zur Aufklärung der Stereochemie von Aminosäuren, gibt es eine Namensreaktion, die zur Bestimmung der absoluten Konfiguration genutzt werden kann. Es handelt sich hierbei um die Marfey-Reaktion, die im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des aus *Petriella spp.* isolierten cyclischen Tetrapeptids WF 3161 herangezogen wurde. Grundgedanke der Marfey-Methode ist, dass die diastereomeren Marfey-Reagenzien FDAA (1-Fluor-Dinitrophenyl-5-L-Alanin) oder FDLA (1-Fluor-Dinitrophenyl-5-L-Leucin), enantiomere D- und L-Aminosäuren in diastereomere Reaktionsprodukte überführen. [Marfey 1984]. Da Diastereomere, im Gegensatz zu Enantiomeren sich in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden, konnten die entstehenden Produkte auf der analytischen HPLC voneinander getrennt werden. Um einen Vergleichsstandard zu produzieren, wurden parallel zu dieser Reaktion kommerziell erworbene Aminosäuren bekannter Konfiguration ebenfalls der Marfey-Reaktion unterzogen. Verwendet wurden aus Kostengründen jeweils die natürlich vorkommenden L-Isomere und die jeweiligen Racemate. Das isolierte Tetrapeptid musste zunächst durch saure Hydrolyse in die zu bestimmenden einzelnen Aminosäuren zerlegt werden. Zu diesem Zweck wurden 0,5-1 mg dieser Reinsubstanz in 1-2 ml 6N HCl gelöst und in einer sogenannten Zuschmelzkapillare überführt. Diese war ein speziell für diese Reaktion angefertigtes Glasröhrchen, das nach Einfüllung des Reaktionsgemisches unter Stickstoffatmosphäre zugeschmolzen wurde. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 24 h in einem Trockenschrank bei 110°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das resultierende Gemisch aus den einzelnen zu bestimmenden Aminosäuren zunächst in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in Wasser gelöst und parallel zu den Standard-Aminosäuren der Marfey-Reaktion unterzogen. Hierzu wurden jeweils 50 µl einer 50 mM wässrigen Lösung der Aminosäuren (entspricht 2.5 µmol) hergestellt und jeweils mit 100 µl einer 1 %igen Lösung von FDLA in Aceton (entspricht 3.6 µmol) und 20 µl einer 1M-Lösung von Natriumhydrogencarbonat (entspricht 20 µmol) versetzt. In Eppendorf-Caps wurden diese Gemische 1 h lang bei 40°C im Trockenschrank inkubiert. Die Gemische wurden nach Abkühlung auf Raumtemperatur jeweils mit 10 µl einer 2M Lösung konzentrierter HCl (entspricht 20 µmol) versetzt, um die Reaktion zu beenden. Nach der Trocknung in einer Vakuumzentrifuge wurden beide Gemische jeweils in 1 ml Methanol gelöst und jeweils mittels der analytischen HPLC untersucht. Im Falle von



Löslichkeitsproblemen, konnten die Gemische mit wenige  $\mu\text{l}$  einer 0,1 %igen Lösung von Ameisensäure versetzt werden.



**Abb. 2.1:** Prinzip der Marfey-Methode am Beispiel des Phenylalanins

## 2.7. Antitumorassay

Für die bioassay-geleitete Suche nach zytotoxisch aktiven Naturstoffen wurden alle Rohextrakte, Fraktionen und isolierte Reinsubstanzen hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Wirkung auf bestimmte proliferierende Zellen getestet. Drei unterschiedliche Zellkulturen wurden im Rahmen einer Testreihe eingesetzt. Als Testsystem der Wahl dienten die murinen Lymphomazellen vom Typ L5178Y. Im Falle hinreichend hoher Aktivität folgten dann auch Screenings an unempfindlicheren Systemen wie den humanen HeLa-Zellen aus einem Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) und die PC12-Zellen, die aus einem Nebennierenmarktumor (Pheochromozytom) einer Ratte stammen (Greene and Tischler 1976). Die Durchführung dieser Antitumorassays erfolgte im Rahmen des MTT-Tests [Carmichael *et al.*, 1987] am Institut für Physiologische Chemie an der Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. W.E.G. Müller. Das Testverfahren basiert auf einer kolorimetrischen Farbreaktion, die enzymatisch katalysiert nur in lebenden Zellen abläuft. Beim MTT handelt es sich um das gelb gefärbte Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid. In lebenden Zellen angereichert wird dieses Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen reduziert zum violetten Formazan. Die Absorption dieses Produktes wird dann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550-600 nm bestimmt. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, ist die Umwandlung von MTT ein Maß für die Viabilität der Zellen [Mosmann *et al.*, 1983]. Die zur Untersuchung verwendeten Zellkulturen der unterschiedlichen Zelllinien wurden unmittelbar vor Ansatz der Tests geerntet, gewaschen und in frischem Medium suspendiert. 90 µl dieser Zellsuspensionen wurden jeweils in jede Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl der Testlösung in jede dieser Vertiefungen. Diese Testlösung entstand zuvor aus der zu untersuchenden gefriergetrockneten Probe, die zunächst in DMSO gelöst wurde und dann auf einer Konzentration von 1% DMSO mit Kulturmedium verdünnt wurde. Nach Zugabe von 20 µl des MTT-Reagenz wurde die Testplatte bei 37°C für 72 Stunden unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die als Blindprobe analog präparierte Kontrollplatte enthielt statt der Probelösung lediglich eine Lösung aus Kulturmedium mit 1% DMSO. Zur Auswertung wurden beide Platten in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (Filtertek Multiscan, Flow Laboratories) photometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm vermessen.

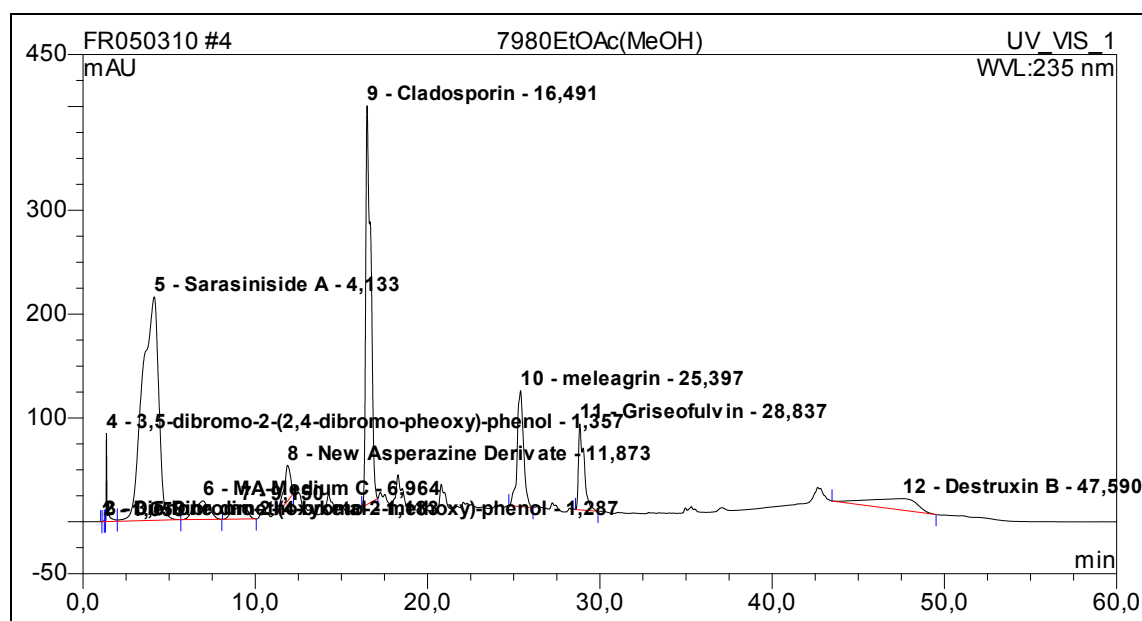
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Inhaltsstoffe aus *Penicillium* spp.

Hauptleitmotiv für die Auswahl einzelner Pilzkulturextrakte zur genaueren Untersuchung, waren in erster Linie die Ergebnisse aus den zytotoxischen Aktivitätstests. Die Testergebnisse aus drei unterschiedlichen *Penicillium*-Stämmen, die jeweils noch auf zwei verschiedenen Kulturmedien herangezüchtet wurden, gaben Anlass zur Großkultivierung des Stammes 7980Bio auf Biomalzagar. Anschließend wurde dieser Extrakt säulenchromatographisch bearbeitet, um die Einzelsubstanzen zu ermitteln, die für diese zytotoxischen Eigenschaften des Extraktes verantwortlich waren.

**Tab. 3.1:** Biotestergebnisse von drei unterschiedlichen *Penicillium*-Stämmen auf zwei verschiedenen Kulturmedien

No.	Code	Name	Medium	Prozentuale Wachstumshemmung		
				L5178Y	Hela	PC12
1	7980 Bio	<i>Penicillium</i> sp.	Bio	85% 1µg/ml	41% 1µg/ml	7% 1µg/ml
2	7980 DiGe	<i>Penicillium</i> sp.	DiGe	39,7% 10µg/ml		
3	7978 Bio	<i>Penicillium</i> sp.	Bio	37% 30µg/ml		
4	7978 DiGe	<i>Penicillium</i> sp.	DiGe	82% 30µg/ml		
5	7979 Bio	<i>Penicillium</i> sp.	Bio	0		
6	7979 DiGe	<i>Penicillium</i> sp.	DiGe	57,3% 30µg/ml		



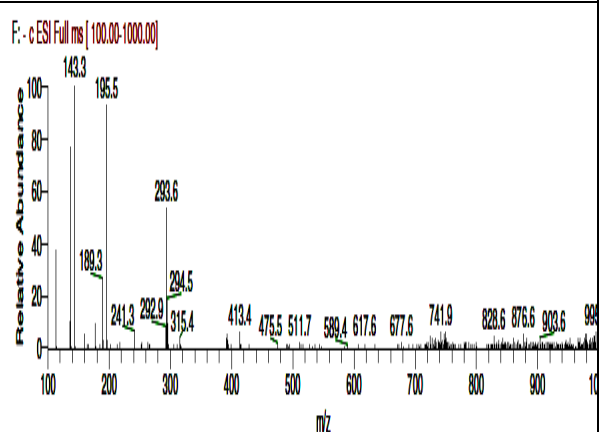
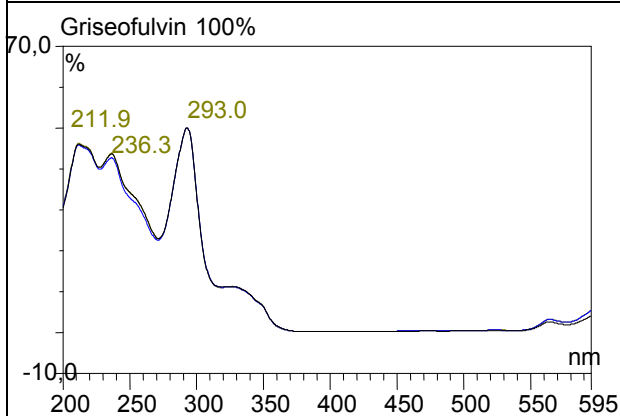
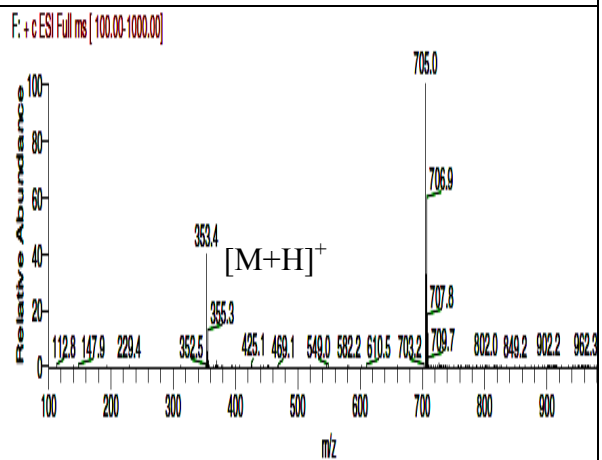
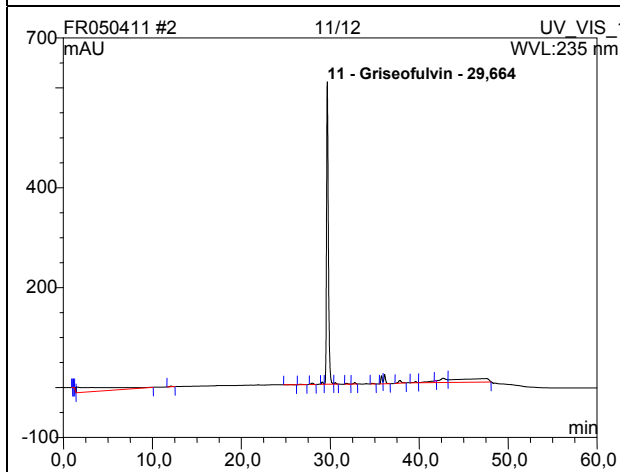
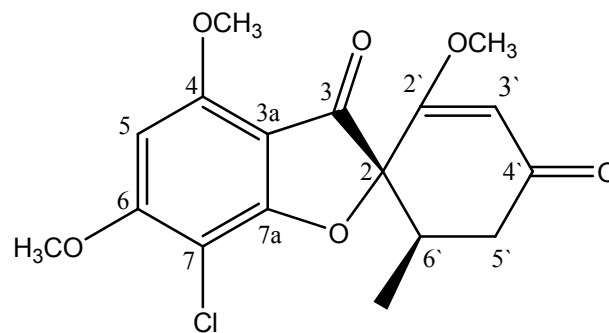
**Abb. 3.1:** HPLC vom Rohextrakt 7980Bio *Penicillium*

### 3.1.1. Griseofulvin

#### Analytische Daten von Griseofulvin

Systematischer Name	7-Chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methylspiro-[benzofuran-2(3H),1'-[2]cyclohexen]-3,4'-dion
Beschreibung	weiß-gelbliches Pulver
Biologische Quelle	7980 Bio <i>Penicillium spp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	7980Bio11/12
Substanzmenge	26,9 mg
Molekulargewicht	352 g/mol
Summenformel	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>6</sub>
HPLC-Retentionszeit	29,664 min

#### Strukturformel



Griseofulvin wurde im Verlauf dieser Arbeit aus marinen Stämmen von *Penicillium sp.* isoliert. Der Stamm 7980Bio wurde am Institut für Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig als Großkultur auf Biomalzmedium herangezogen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die Auftrennung des Rohextraktes erfolgte unter Anwendung einer Säulenchromatographie mit Kieselgel und einem Fließmittelsystem aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 95/5. Das relativ lipophile Griseofulvin wurde als erste Substanz in den Fraktionen 11 und 12 mit einer Ausbeute von 29,9 mg eluiert. Das beim HPLC-Lauf dieser Fraktion 7980Bio11/12 aufgezeichnete UV-Absorptionsmuster korrelierte beim Abgleich mit Daten aus der internen Spektrenbibliothek mit Griseofulvin. Die charakteristischen UV-Absorptionsmaxima lagen bei 211,9 nm, 236,3 nm und 293,0 nm. Die Retentionszeit betrug 29,6 min. Mit einer ähnlichen Retentionszeit von 28,8 min konnte Griseofulvin auch im Rohextrakt (vgl. Abb. 3.1) UV-spektrometrisch nachgewiesen werden. Im Positivmodus des Massenspektrums konnte der Basispeak mit 353,4 Masseneinheiten für  $[M+H]^+$  und eine Dimerisierung mit einem Massenpeak bei 706,9 entsprechend für  $[2M+H]^+$  beobachtet werden.

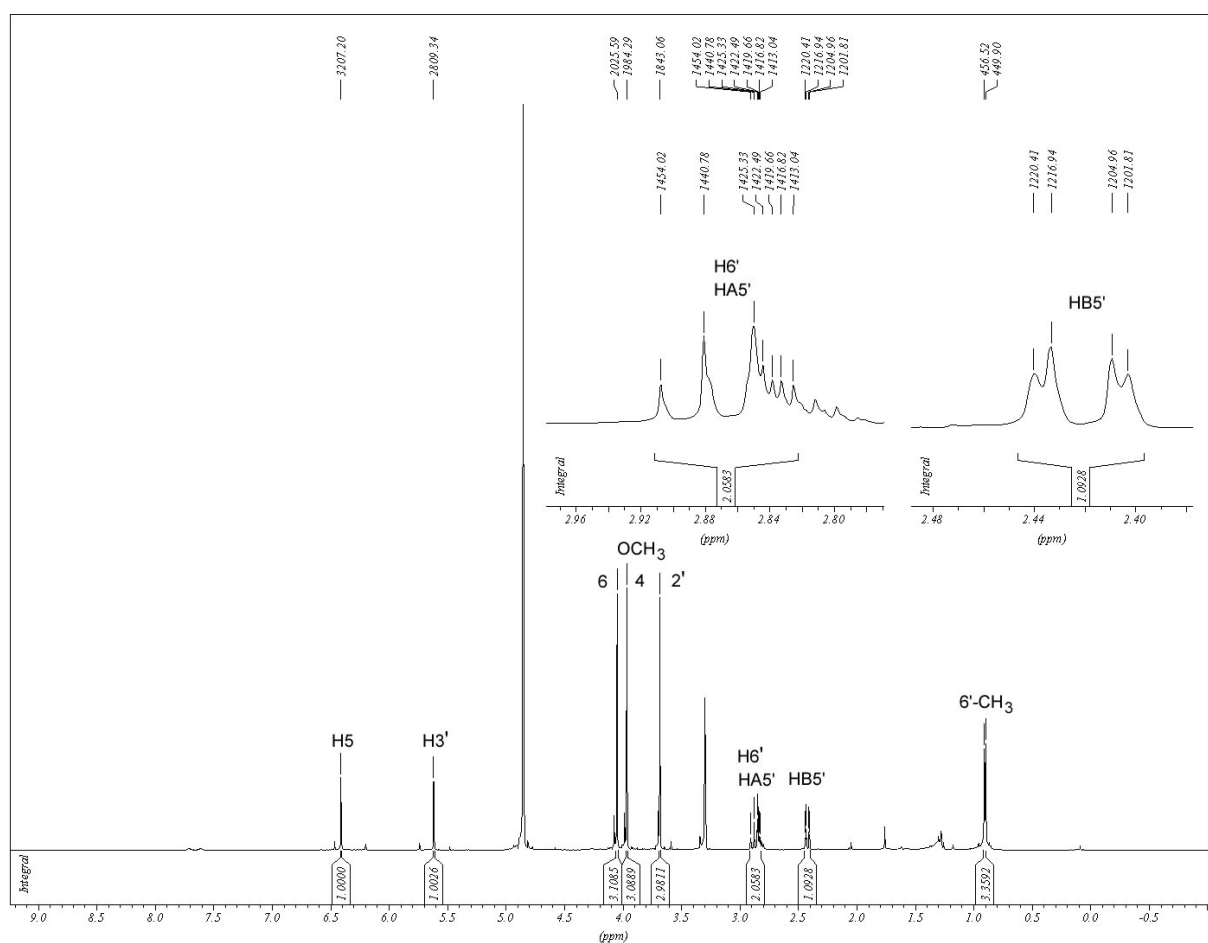
Als NMR-Spektrenmaterial zur Strukturaufklärung wurden Protonen-NMR, COSY- und HMBC-Spektren von der gewonnenen Fraktion 7980Bio11/12 in deuteriertem Methanol aufgenommen.

**Tab. 3.2:** NMR-Daten für **Griseofulvin** in CD<sub>3</sub>OD (500 bzw. 125 MHz)

Position	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz])	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz]) <sup>1</sup>	$\delta_C$ [ppm] <sup>2</sup>	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
2			92		
3			194		
3a			98		
4			160		
4-OCH <sub>3</sub>	3.97 (s)	3.95 (s)	57	<b>4-OCH<sub>3</sub></b> , 4	H5
5	6.41 (s)	6.40 (s)	91	3, 3a, 4, <b>5</b> , 6, 7	4-OCH <sub>3</sub> , 6-OCH <sub>3</sub>
6			168		
6-OCH <sub>3</sub>	4.05 (s)	4.10 (s)	59	<b>6-OCH<sub>3</sub></b> , 6	H5
7			106		
7a					
2'			174		
2'-OCH <sub>3</sub>	3.69 (s)	3.65 (s)	58	<b>2'-OCH<sub>3</sub></b> , 2'	H3'
3'	5.62 (s)	5.55 (s)	105	2, 2', <b>3'</b> , 4', 5'	HA5', 2'-OCH <sub>3</sub>
4'			200		
5'	A 2.86 (m, 3.15) B 2.42 (dd, 3.15, 3.47)	2.85 (m) 2.35 (m)	40	4', <b>5'</b> 2, 4', <b>5'</b> , 6'	B, 6'-CH <sub>3</sub> A, 6'-CH <sub>3</sub> , H6', H3'
6'	2.86 (m, 3.15, 3.47)	2.85 (m)	37	4', <b>6'</b>	6'-CH <sub>3</sub> , HB5'
6'-CH <sub>3</sub>	0.91 (d, 6.62)	0.90 (d)	14	2, 5', 6', <b>6'-CH<sub>3</sub></b>	H6', HA5', HB5'

<sup>1</sup>Aldrich Library of NMR spectra, 1992 in CD<sub>3</sub>OD

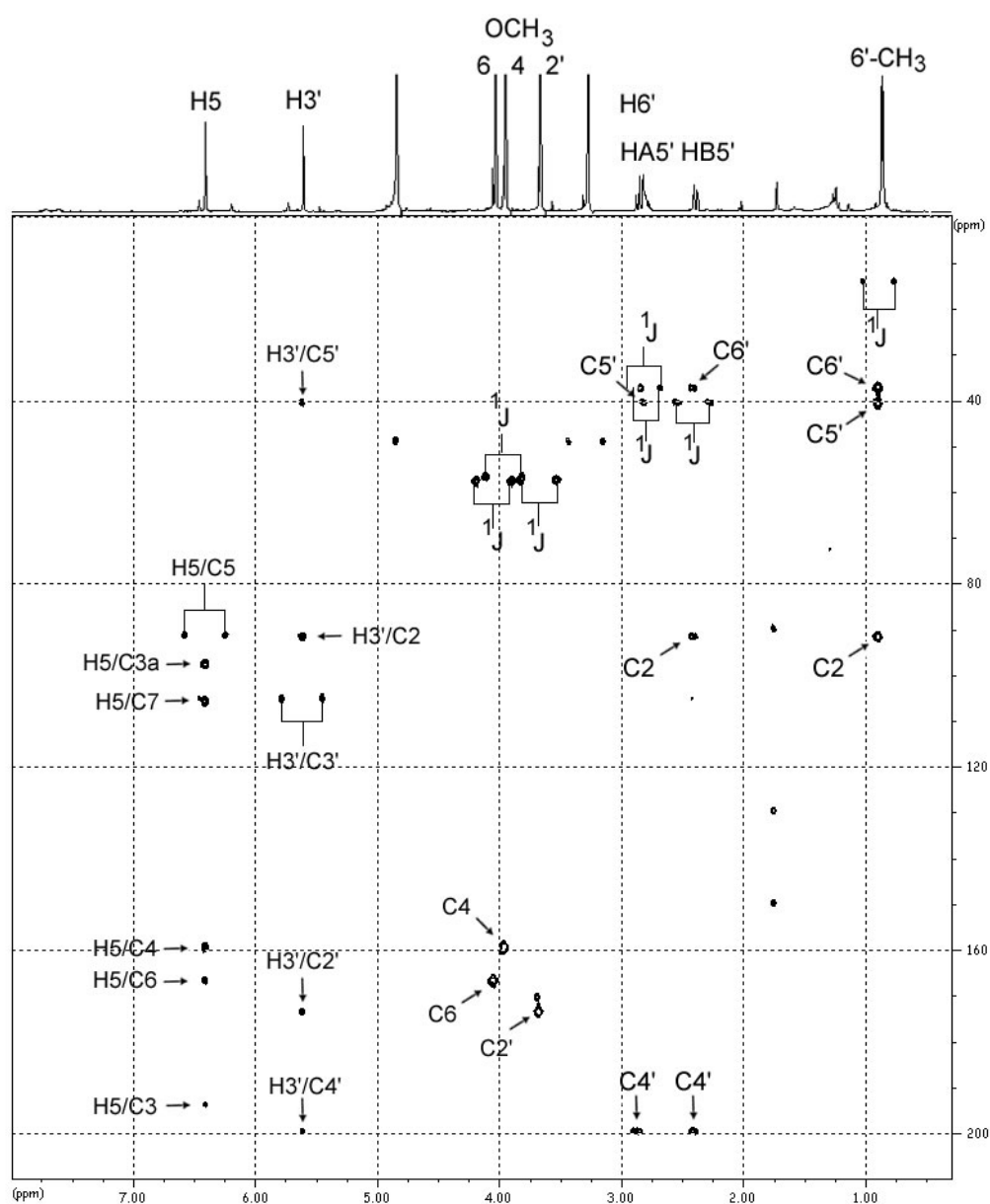
<sup>2</sup>Chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome aus dem HMBC entnommen



**Abb. 3.2:**  $^1\text{H-NMR}$  von 7980Bio11/12 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)

Das Protonenspektrum zeigte im aliphatischen Bereich die Methylgruppe am Cyclohexenring als Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  0,91 ppm. Das einzige mit dieser Methylgruppe koppelnde Proton, ebenfalls an Position 6', zeigte sich überlagernd mit einem Proton aus der benachbarten Methylengruppe (Integral von 2H) als Teil eines Multipletts bei  $\delta_{\text{H}}$  2,86 ppm. Das zweite Methylenproton symbolisierte als Doppeldublett bei  $\delta_{\text{H}}$  2,42 ppm die Kopplung zu seinem tieffeldverschobenen Gruppenpartner einerseits und zum Proton an Position 6' andererseits. Die gemeinsame Kopplungskonstante von  $^2J = 3,15$  Hz steht für die geminale Kopplung der beiden 5'-Methylenprotonen. Nur das weiter hochfeld liegende Proton 5'-H<sub>B</sub> zeigte eine vicinale Kopplung zum Proton an Position 6', mit einer gemeinsamen Kopplungskonstante von  $^3J = 3,47$  Hz. Grund für die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der beiden Methylenprotonen war die Chiralität des Griseofulvins. Zwei chirale Zentren im gesamten Molekül verliehen der Methylengruppe diastereotopen Charakter.

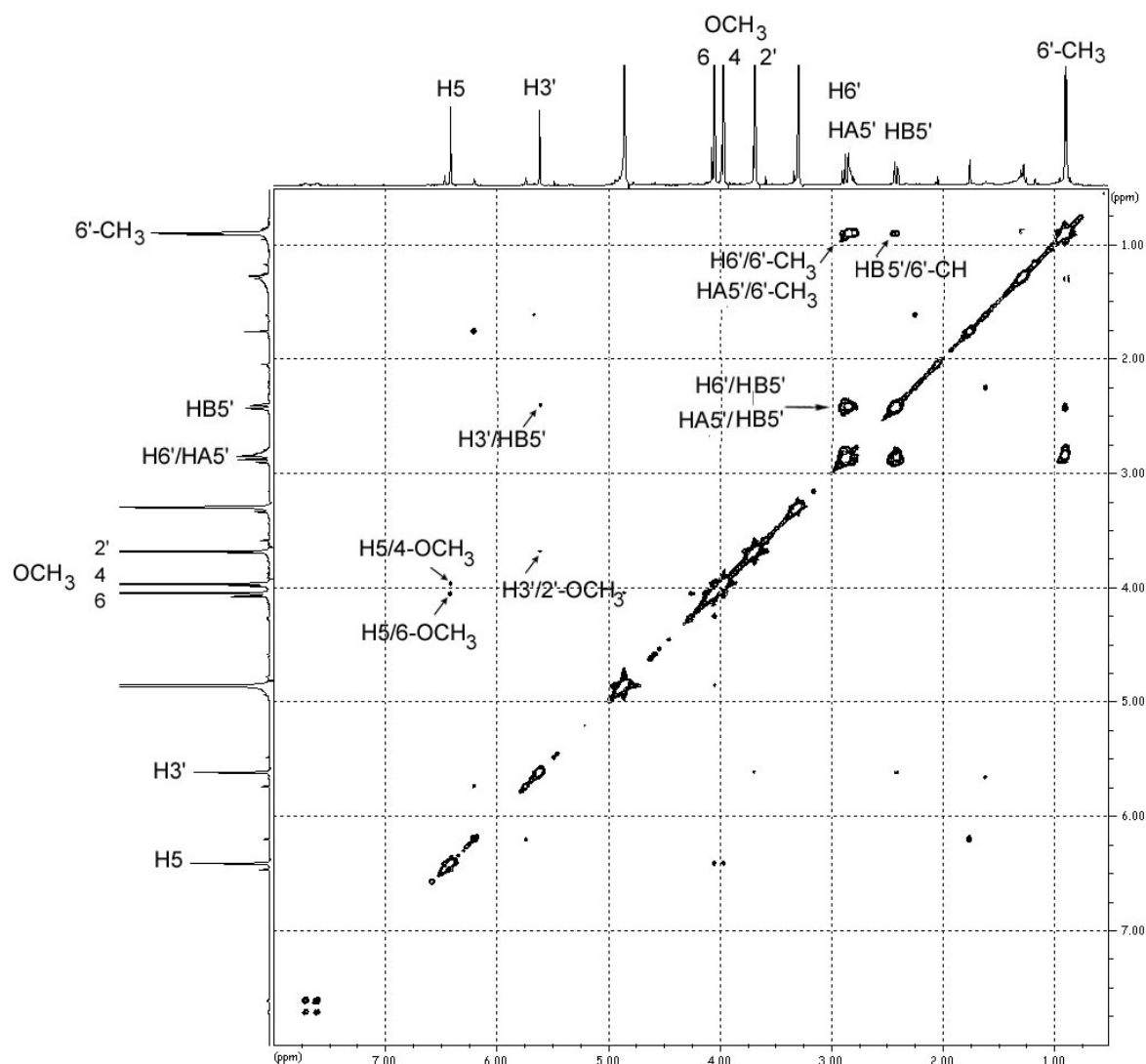
Die beiden Chiralitätszentren sind zum einen das Spirokohlenstoffatom und zum anderen der Kohlenstoff 6', der die Methylgruppe trägt. Weiter tieffeldverschoben bei  $\delta_H$  3,69 ppm,  $\delta_H$  3,97 ppm und bei  $\delta_H$  4,05 ppm, befanden sich die Singulets der drei Methoxygruppen, deren genaue Zuordnung erst das HMBC ermöglichte. Weitere Signale im Protonenspektrum waren die Singulets des olefinischen Protons an Position 3' bei  $\delta_H$  5,62 ppm und das des einzigen aromatischen Protons an Position 5 bei  $\delta_H$  6,41 ppm. Die Resonanzwerte der einzelnen Kohlenstoffatome wurden dem HMBC durch graphische Extrapolation der direkten Kopplungssignale entnommen.



**Abb. 3.3:** HMBC-Spektrum von 7980Bio11/12 in  $CD_3OD$

Die typischen Doppelsignale für Direktkorrelationen konnten für alle drei Methoxyprotonen zu den jeweiligen Methoxykohlenstoffen gefunden werden. Diese drei Signale lagen sehr nahe beieinander und betragen  $\delta_c$  57 ppm für die 4-OCH<sub>3</sub>,  $\delta_c$  58 ppm für die 2'-OCH<sub>3</sub> und  $\delta_c$  59 ppm für die Methoxyfunktion an Position 6. Direktkorrelationssignale konnten auch für das aromatische, das olefinische, das Proton an Position 6' und für 5'-H<sub>B</sub> gefunden und damit die entsprechenden chemischen Verschiebungen von C-5 ( $\delta_c = 91$  ppm), C-3' ( $\delta_c = 105$  ppm), C-6' ( $\delta_c = 37$  ppm) und für C-5' ( $\delta_c = 40$  ppm) bestimmt werden. Die chemischen Verschiebungen der drei Methoxygruppen konnten allesamt durch Kopplungsverhalten der Nachbarprotonen hergeleitet werden. Das olefinische Kohlenstoffatom der Position 2' kam als einziger gemeinsamer Korrelationspartner für die Protonen der 2'-Methoxygruppe und dem olefinischen Proton an Position 3' in Betracht. Auf diese Weise konnte einerseits die chemische Verschiebung des olefinischen 2'-Kohlenstoffs auf  $\delta_c$  175 ppm festgelegt und andererseits der Resonanzwert der 2'-Methoxygruppe mit  $\delta_H$  3,69 ppm bestimmt werden. Die weitere Unterscheidung der beiden aromatischen Methoxygruppen konnte lediglich nach Elektronegativität der Nachbaratome getroffen werden. Die zum Chloratom benachbarte 6-Methoxygruppe wurde als diejenige mit der höheren chemischen Verschiebung bei  $\delta_H$  4,05 ppm im Vergleich zur 4-Methoxygruppe bei  $\delta_H$  3,97 ppm charakterisiert. Der Carbonylkohlenstoff am Cyclohexenring konnte auf Grund seiner Korrelationspartner als der mit der höchsten chemischen Verschiebung von  $\delta_c$  200 ppm erkannt werden. Dies waren zwei Korrelationen über zwei Bindungen: Die des olefinischen Protons an Position 3' und die eines der beiden 5'-Methylenprotonen. Eine Korrelation über drei Bindungen ging vom Proton an Position 6' aus.





**Abb. 3.4:** H,H-COSY von 7980Bio11/12 in CD<sub>3</sub>OD

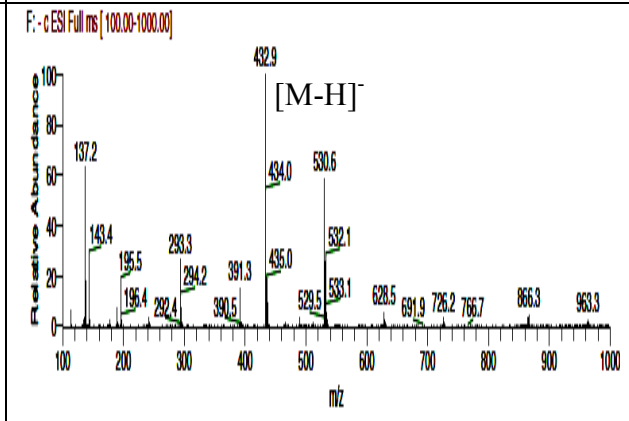
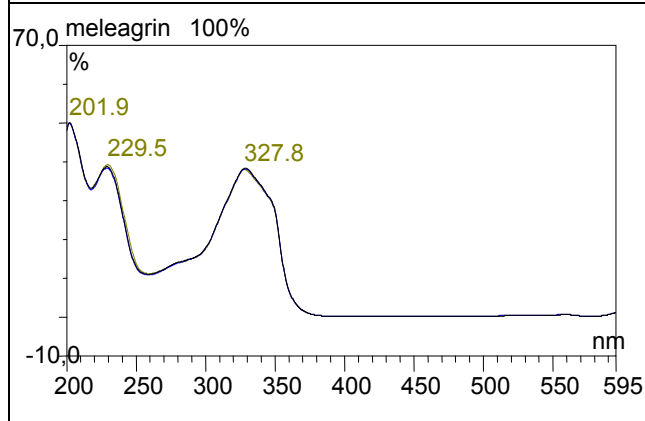
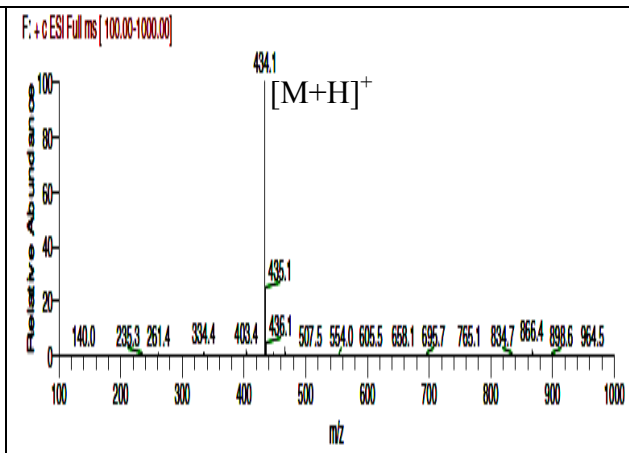
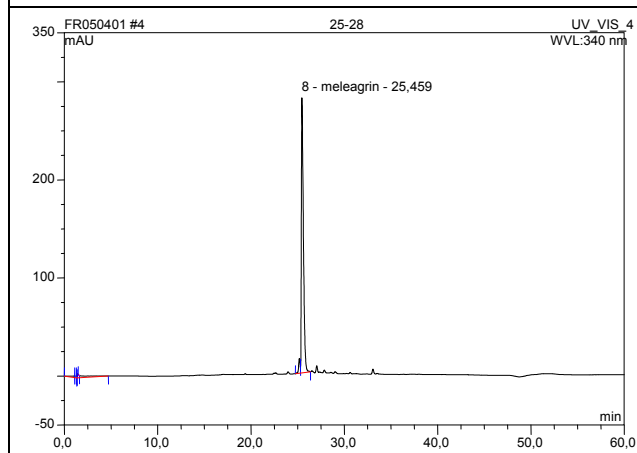
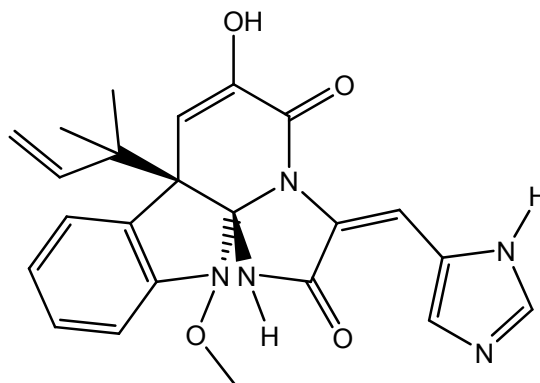
Das COSY zeigte eine geminale Kopplung der beiden Methylenprotonen an Position 5'. Zwei vicinale Kopplungen konnten für das einzelne Proton an Position 6' entnommen werden: Zum einen eine Kopplung mit dem hochfeldverschobenen Methylenproton H<sub>B</sub>5' und zum anderen die Kopplung zu den Methylprotonen an gleicher Position. Fernkopplungen waren zu entnehmen zwischen den 5'-Methylenprotonen und den 6'-Methylprotonen sowie zwischen dem olefinischem H-3' und dem hochfeldverschobenen H<sub>B</sub>5' der diastereotopen Methylengruppe. Desweiteren konnten drei schwache Signale für Kopplungen über fünf Bindungen gefunden werden: Das olefinische Proton H3' und das aromatische Proton an Position 5 zeigten beide Kopplungen zu ihren jeweils in direkter Nachbarschaft stehenden Methoxyprotonen.

### 3.1.2. Meleagrín

#### Analytische Daten von Meleagrín

Biologische Quelle	7980 Bio <i>Penicillium sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	7980Bio25-28
Substanzmenge	0,3 mg
Molekulargewicht	433 g/mol
Summenformel	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
HPLC-Retentionszeit	25,459 min

Strukturformel



Meleagrín wurde als zweite Substanz im Verlauf der Säulenchromatographie des *Penicillium*-Großextraktes 7980Bio nach Griseofulvin eluiert. Die sehr geringe quantitative Ausbeute machte die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung unmöglich, war aber dennoch ausreichend für eine eindeutige Identifizierung. Dies geschah durch Vergleich des charakteristischen UV-Spektrums der gewonnenen Fraktion 7980Bio25-28 mit gespeicherten Absorbtionsmustern bekannter Substanzen der internen Spektrenbibliothek der analytischen HPLC. Die typischen Absorbtionsmaxima lagen bei 201,9 nm, 229,5 nm und 327,8 nm, die nach einer Retentionszeit von 25,5 min detektiert wurden. Im Rohextrakt bereits nachgewiesen war die Retentionszeit mit 25,4 min nahezu identisch. Das Massenspektrum zeigte den Basispeak von 434,1 für das positive Ion  $[M+H]^+$  und den Basispeak von 432,9 für das negative Ion  $[M-H]^-$ . Meleagrín wurde außerdem noch in einem weiteren Kulturextrakt aus *Penicillium sp.* als Hauptmetabolit identifiziert. Der Extrakt Nr. 9151 *Penicillium spp.* bestand neben wenigen Verunreinigungen fast ausschließlich aus Meleagrín.

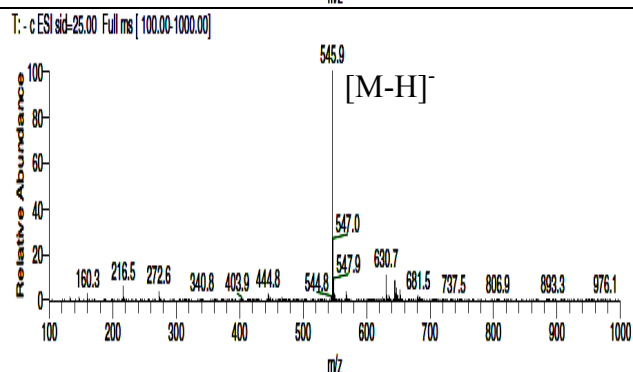
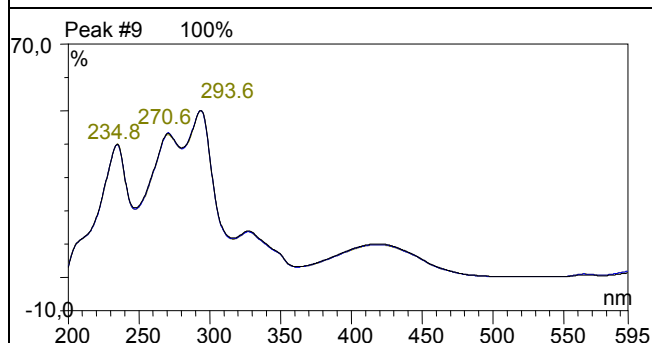
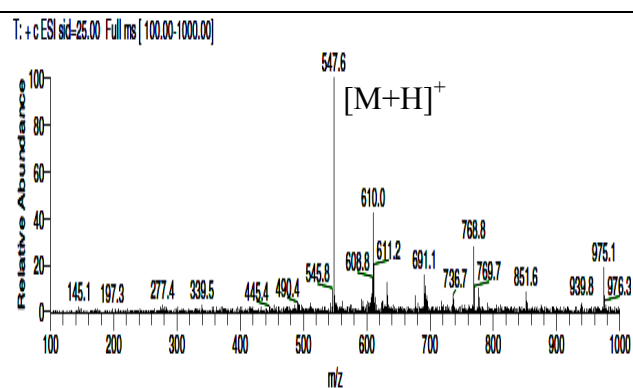
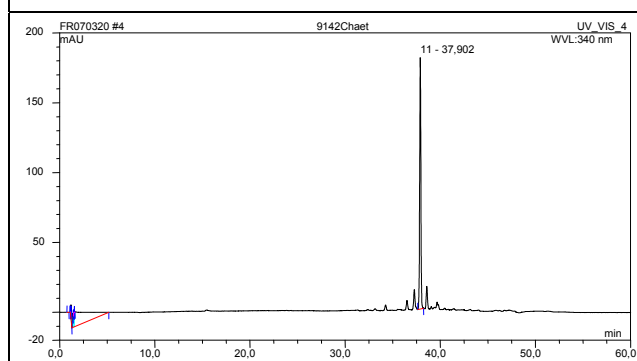
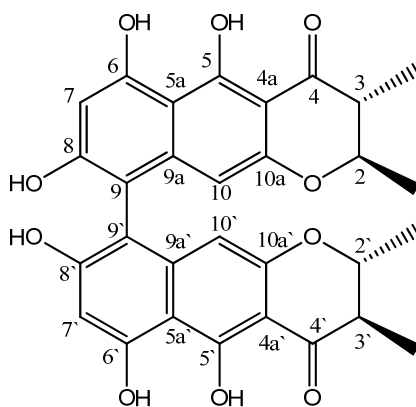
## 3.2. Inhaltsstoffe aus *Chaetomium sp.*

### 3.2.1. Chaetochromin A

#### Analytische Daten von Chaetochromin A

Verbindungsklasse	Tetrahydrohexahydroxybis-naphtho- $\gamma$ -pyrone
Beschreibung	grünes kristallines Pulver
Biologische Quelle	9142DiGe <i>Chaetomium sp.</i> aus <i>Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	ChaetoSX51-55IX
Substanzmenge	4 mg
Molekulargewicht	546 g/mol
Summenformel	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>
HPLC-Retentionszeit	37,902 min (Rohextrakt)
gemessener Drehwert	$[\alpha]_D^{20} + 616^\circ$ (c=1, CHCl <sub>3</sub> )
Literaturwert	$[\alpha]_D^{20} + 600^\circ$ (c=1, CHCl <sub>3</sub> ) [Singh <i>et al.</i> , 2003]

#### Strukturformel

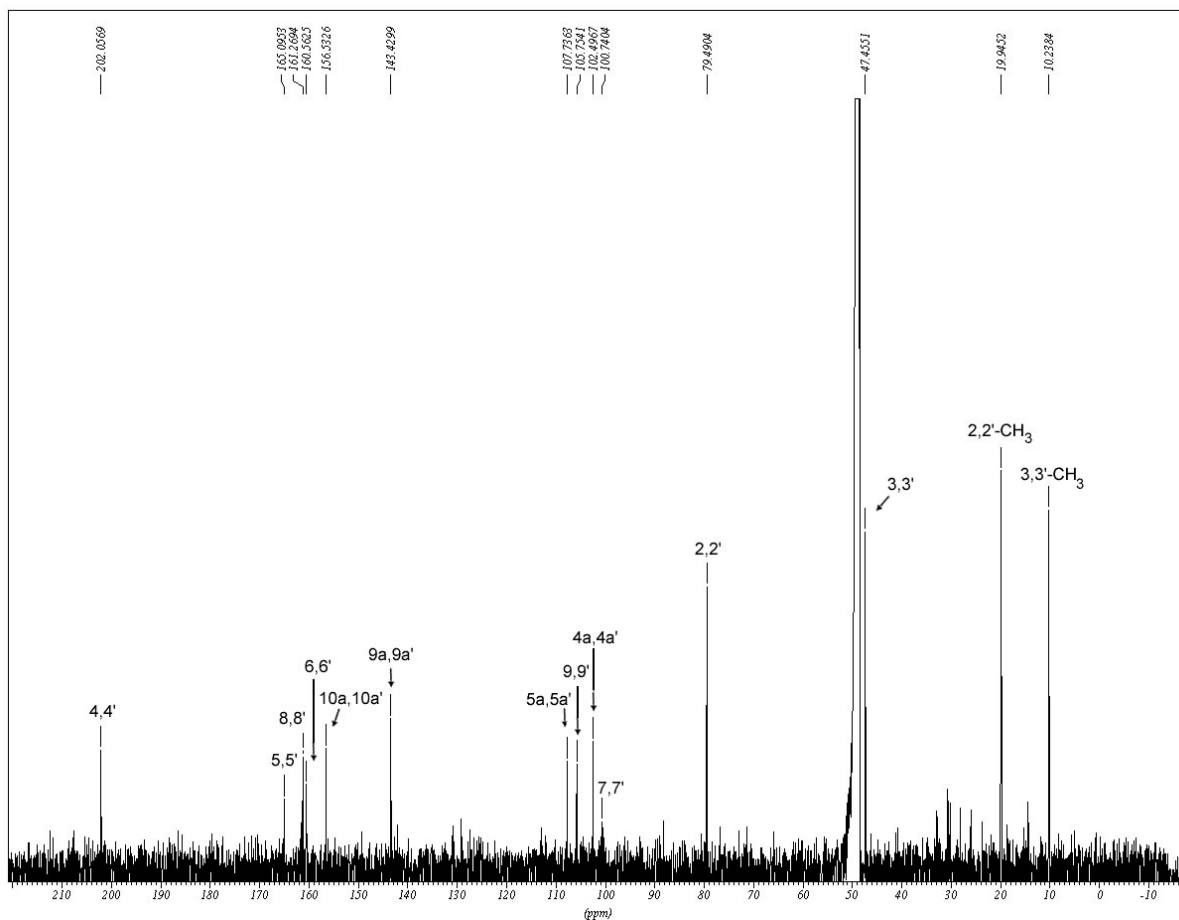


Aus dem sehr einfach zusammengesetzten Rohextrakt Nr. 9142, gewonnen aus marinen *Chaetomium sp.*, konnte in nur einem Aufreinigungsschritt der Sekundärmetabolit Chaetochromin A isoliert werden. Hierzu wurde der Rohextrakt über eine mit Sephadexmaterial gefüllte Säule gegeben und mit reinem Methanol als mobile Phase chromatographiert. Als grünes kristallines Pulver wurde Chaetochromin A in den 5 Fraktionen Nr. 51-55 mit einer Ausbeute von 4 mg angereichert. Im HPLC-Chromatogramm wurde die Substanz bei einer Retentionszeit von 37,9 min detektiert. Das UV-Spektrum zeigte ein Absorbtionsmuster, das typisch war für Verbindungen, die ein Naphtho- $\gamma$ -pyron-System als Chromophor enthalten [Koyama *et al.*, 1988]. Im UV-Spektrum fand sich ein hohes Absorbtionsmaximum bei 234,8 nm, gefolgt von einem sehr flachen bei 270,6 nm und einer Spitze bei 293,6 nm. Beim Chaetochromin A handelt es sich um ein symmetrisches Dimer, ein Bis(naphtho- $\gamma$ -pyron) mit einem Molekulargewicht von 546 g/mol, wie im Massenspektrum anhand der beiden Basispeaks von 547,6 für das positive Ion  $[M+H]^+$  und von 545,9 für das negative Ion  $[M-H]^-$  ersichtlich war. Als Spektenmaterial zur Aufklärung der Struktur wurde von der Fraktion ChaetoSX51-55IX ein Protonenspektrum, ein COSY und ein Kohlenstoffspektrum zunächst in deuteriertem Methanol und später nochmals in Anlehnung an die Literatur ein Protonenspektrum in deuteriertem Chloroform aufgezeichnet. Die eindimensionalen Spektrendaten wurden den Literaturdaten wie folgt gegenübergestellt:

**Tab. 3.3:** NMR-Daten für **Chaetochromin A** (500 bzw. 125 MHz)

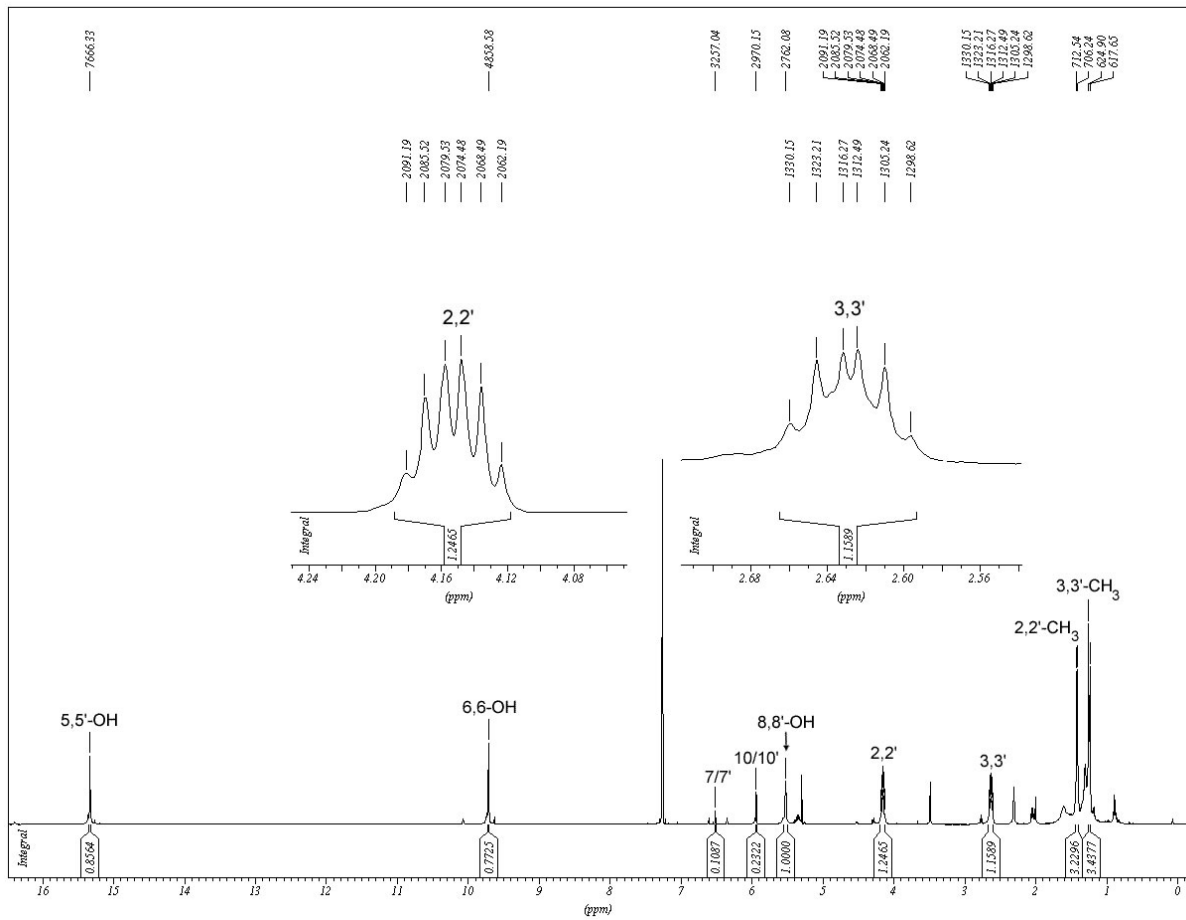
Position	$\delta_c$ [ppm] CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ [ppm] <sup>1</sup> CDCl <sub>3</sub>	$\delta_H$ [ppm] (mult.,J [Hz] ) CDCl <sub>3</sub>	$\delta_H$ [ppm] (mult.,J [Hz] ) <sup>1</sup> CDCl <sub>3</sub>
2,2`-CH <sub>3</sub>	19.9	19.6	1.42 (d, 6.0)	1.42 (d, 6.1)
3,3`-CH <sub>3</sub>	10.2	9.9	1.24 (d, 6.8)	1.24 (d, 6.7)
2,2`	79.5	78.4	4.16 (dq, 10.7, 6.0)	4.17 (dq, 11.0, 6.1)
3,3`	47.5	46.2	2.63 (dq, 10.7, 6.8)	2.62 (dq, 11.0, 6.7)
4,4`	200.1	200.8		
4a,4à	102.5	101.8		
5,5`	165.1	164.4		
5,5`-OH			15.33 (s)	15.27 (s)
5a,5à	107.7	105.6		
6,6`	160.6	159.8		
6,6`-OH			9.71 (s)	9.65 (s)
7,7`	100.7	99.7	6.51 (s)	6.48 (s)
8,8`	161.3	160.8		
8,8`-OH			5.52 (s)	5.70 br
9,9`	105.8	102.0		
9a,9à	143.4	141.9		
10,10`	100.6	99.3	5.94 (s)	5.93 (s)
10a, 10à	156.5	156.3		

<sup>1</sup>Koyama *et al.*, 1988



**Abb. 3.5:**  $^{13}\text{C}$ -NMR von ChaetoSX51-55IX in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (125 MHz)

Die chemischen Verschiebungen der gemessenen Kohlenstoffatome zeigten trotz Messungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln eine gute Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur. Da es sich beim Chaetochromin A um ein symmetrisches Dimer handelt, sind von den insgesamt 30 Kohlenstoffatomen jedoch nur 15 Resonanzsignale im Kohlenstoffspektrum zu erwarten. Das von der Reinsubstanz aufgenommene Kohlenstoffspektrum zeigte insgesamt 14 Signale: Das Kohlenstoffatom 10,10` wurde nicht detektiert.



**Abb. 3.6:** <sup>1</sup>H-NMR von ChaetoSX51-55IX in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

Der aliphatische Teil des Protonenspektrums umfaßt zwei unterschiedliche Paare von Methylgruppen. Das Resonanzsignal der 2,2'-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  1.42 ppm liegt wegen der geringeren Distanz zum Pyransauerstoff etwas mehr tieffeldverschoben als das der 3,3'-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  1.24 ppm. Bezüglich der Multiplizität sind beide Signale Dubletts, was in beiden Fällen die Kopplung der Methylprotonen zur jeweiligen Methineinheit an der gleichen Position dokumentiert. Die jeweiligen Kopplungskonstanten betragen für die vicinale Kopplung der jeweiligen Methylprotonen zu den entsprechenden Methinprotonen an der gleichen Position einmal  $^3J = 6$  Hz für die Position 2,2' und  $^3J = 6.9$  Hz für die Position 3,3'. Die unterschiedlich hohen chemischen Verschiebungswerte aller Protonen an den Positionen 2,2' im Vergleich zu allen Protonen an den Positionen 3,3 sind distanzbedingt in Bezug auf den Pyransauerstoff zu interpretieren: Das 2,2'-Kohlenstoffatom befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu Pyransauerstoff, deshalb sind auch sämtliche Resonanzsignale der daran bindenden Protonen tieffeldverschoben im Vergleich zu den Protonen an Position 3,3'. Die Resonanzen liegen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.15 ppm für die 2,2'-Methinprotonen und bei  $\delta_{\text{H}}$  2.63 ppm für die 3,3'-Methinprotonen. Diese 2,3 bzw. 2'3'-Protonen koppeln sowohl mit den jeweiligen Methylprotonen an gleicher Position als auch untereinander.



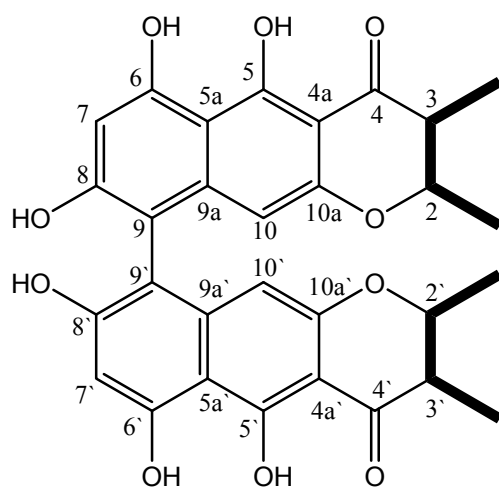
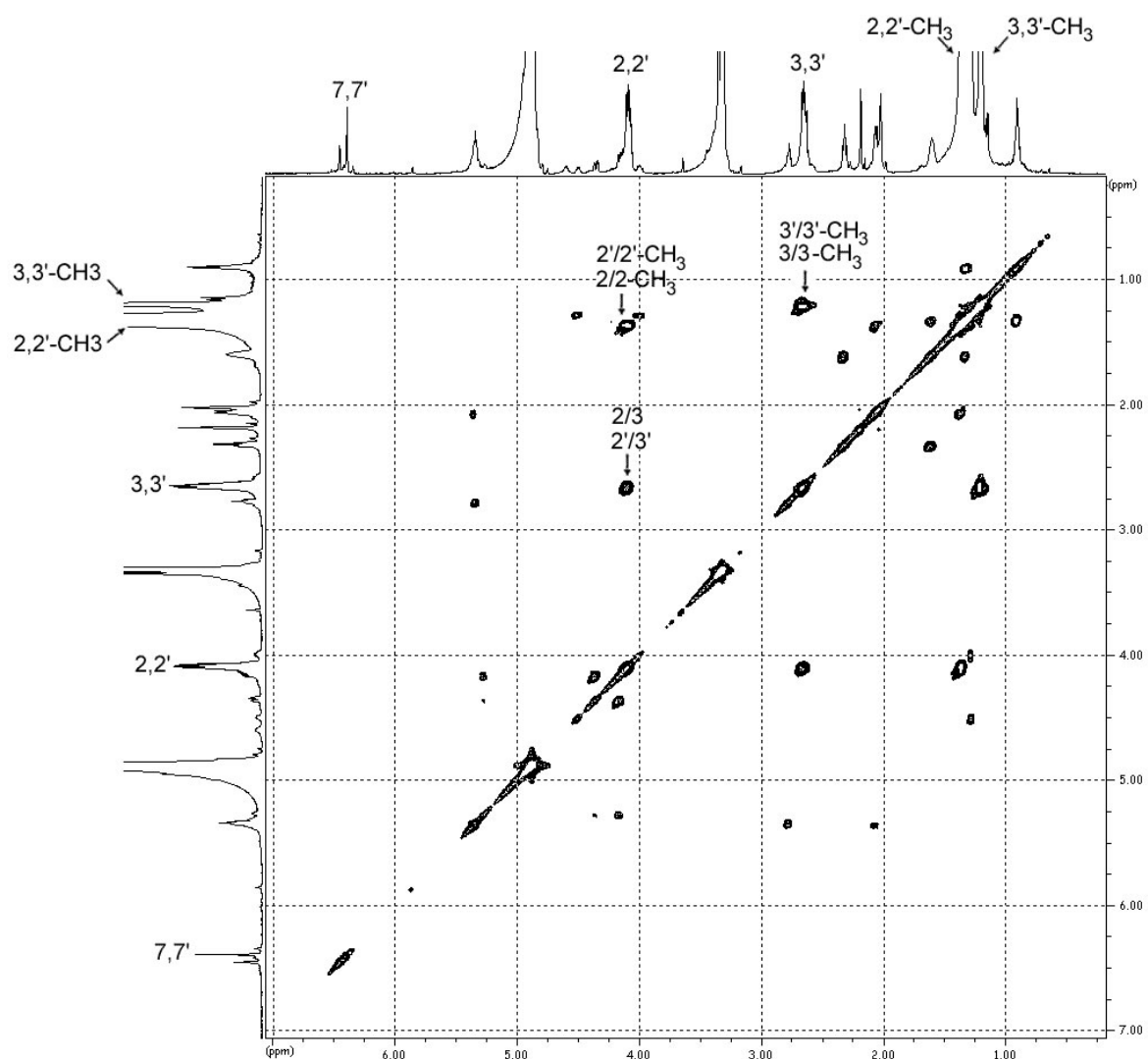


Abb. 3.7: H,H-COSY von ChaetoSX51-55IX in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz)

Das sehr einfach aufgebaute COSY-Spektrum zeigt zwei Kreuzsignale für die geminale Kopplungen der Methylprotonen an den Positionen 2 bzw. 2' und 3 bzw. 3' und drei weitere Kreuzsignale für vicinale Kopplungen. Zwei dieser Signale stehen für die Kopplungen der jeweiligen Methinprotonen zu den jeweiligen Methylprotonen an gleicher Position: Die Kopplungen zwischen den 2,2'-Methinprotonen und den 2,2'-Methylprotonen einerseits und zwischen den 3,3'-Methinprotonen und den 3,3'-Methylprotonen andererseits. Die Kopplungskonstanten betragen für die an 2,2' positionierten Protonen  ${}^3J = 6.0$  Hz und  ${}^3J = 6.8$  Hz für die koppelnden Protonen an 3,3'. Als weitere Kopplung vom vicinalen Typ konnte die zwischen den beiden Methinprotonen an Position 2 und 3 bzw. 2' und 3' beobachtet werden. Die hohe Kopplungskonstante  ${}^3J_{2,3}$  von 10.7 Hz sagt aus, dass die Bindung zwischen den Protonen 2 und 3 bzw. 2' und 3' eine transkonfigurierte sein muss. Diese Tatsache schloss das ebenfalls in Betracht gezogene stereoisomere und unsymmetrische Chaetochromin B als potentielle Substanz aus. Zusätzlich bewies die Messung des optischen Drehwinkels, dass es sich bei der isolierten Substanz um Chaetochromin A und nicht um das atropisomere Ustilaginoidin D handelt. Für die isolierte Reinsubstanz wurde ein positiver Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} +616^\circ$  gefunden, der im Vergleich zum Literaturwert um  $16^\circ$  höher ist. Ustilaginoidin D hingegen besitzt einen negativen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} -188^\circ$ , wurde allerdings in etwa der dreifach geringeren Konzentration und in einem anderen Lösungsmittel vermessen [Singh *et al.*, 2003]. Die chemischen Verschiebungswerte der drei aromatischen Hydroxylgruppenpaare differieren aufgrund der chemischen Umgebungen sehr stark (vgl. Tab. 3.3). Diese stehen in enger Korrelation mit den entsprechenden Entfernungen zum Carbonylsauerstoff. Somit steigen die Resonanzwerte in der Reihe 8,8'-OH ( $\delta_H$  5.52 ppm), 6,6'-OH ( $\delta_H$  9.71 ppm) und 5,5'-OH ( $\delta_H$  10.07 ppm). Analog sind auch die chemischen Verschiebungsdifferenzen der beiden unterschiedlichen Paare aromatischer Protonen an den Positionen 10,10' ( $\delta_H$  5.94 ppm) und 7,7' ( $\delta_H$  6.51 ppm) zu interpretieren.

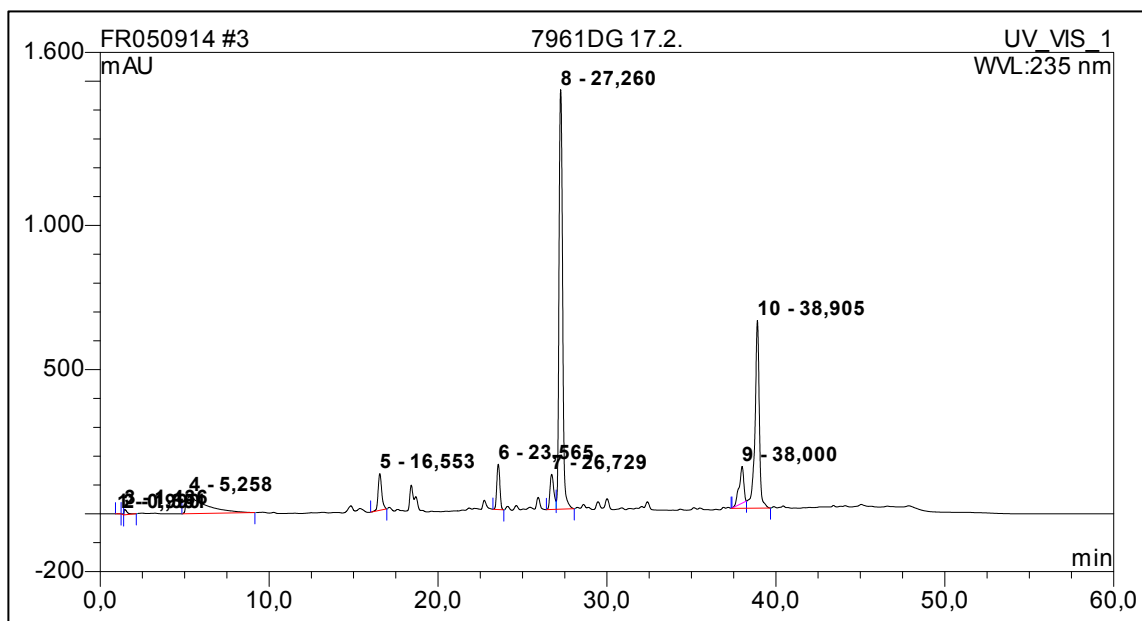


### 3.3. Inhaltsstoffe aus *Petriella* spp.

Auf der Suche nach neuen zytotoxischen Sekundärmetaboliten wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf Stämme der Gattung *Petriella* auf zwei verschiedenen Kulturmedien herangezüchtet, extrahiert und an drei unterschiedlichen Zelllinien getestet. Die ersten analytisch-chemischen Untersuchungen ließen eine qualitative Übereinstimmung aller fünf Stämme hinsichtlich deren Inhaltsstoffmuster erkennen. Daraufhin wurden die bioaktivsten Stämme als Großkultur angelegt und deren Extrakt bioassay-begleitend auf die zytotoxischen Verbindungen hin analysiert.

**Tab. 3.4:** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests verschiedener Extrakte aus Stämmen von *Petriella* spp. isoliert aus *Suberites domuncula*

Stamm-Nr.	Medium	ED50 [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
		L5178Y	Hela	PC12
7959	Bio	0.75	5.4	>10
7959	DiGe	<0,1	0.52	>10
7961	Bio	0.22	3.7	>10
7961	DiGe	<0,1	0.61	10
7962	Bio	0.4	2.51	>10
7962	DiGe	0.051	0.6	7.5
7963	Bio	0.85	7.1	>10
7963	DiGe	<0,1	0.46	4.6
7964	Bio	0.37	9.7	
7964	DiGe	<0,1	0.7	



**Abb. 3.8:** HPLC-Chromatogramm vom Rohextrakt aus *Petriella* spp.

Von den beiden Kulturmedien erwies sich das Dinkel-Gerste-Medium als produktiver hinsichtlich der Ausbeute an aktiven Substanzen. Für die Anfertigung der Großkultur fand der aktivste Stamm mit der Nr. 7961 besondere Berücksichtigung. Aus der angefertigten Großkultur resultierten 16 g Rohextrakt, von denen die Hälfte zur analytisch-chemischen Untersuchung verwendet wurde. Bei dem Rohextrakt, der fortan unter der Bezeichnung PLS (Petriella Large Scale) lief, handelte es sich von der Konsistenz her um eine braune klebrige Masse. Erster Schritt der gesamten Auftrennungsprozedur war die VLC-Technik, die Säulenchromatographie unter Vakuum, wie im Abschnitt 2.4.1. hinreichend beschrieben. Hierzu wurden 8g des Rohextraktes in wenig Methanol aufgenommen und in kleinen Portionen in das Kieselgel eingearbeitet. Als Fließmittelsystem wurden vier Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität sowohl kombiniert als auch in reiner Form eingesetzt. Die gesamte Elution fand in 10 Schritten, d.h. mit 10 verschiedenen Fließmittelsystemen nach aufsteigender Polarität statt. Die erhaltenen 10 Fraktionen wurden anschließend eingeengt, getrocknet und mengenmäßig bestimmt. Von jeder Fraktion wurden ca. 0,3 mg entnommen und für zytotoxische Aktivitätstests verwendet. Ermittelt wurde dann das prozentuale Wachstum von murinen Lymphomazellen bei zwei verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Fraktionen. Für hinreichend aktive Fraktionen konnten auch die ED<sub>50</sub>-Werte ermittelt werden.

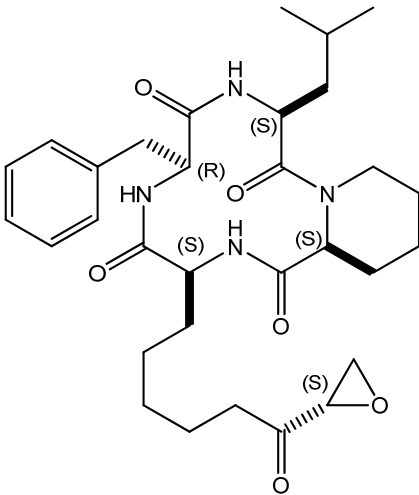
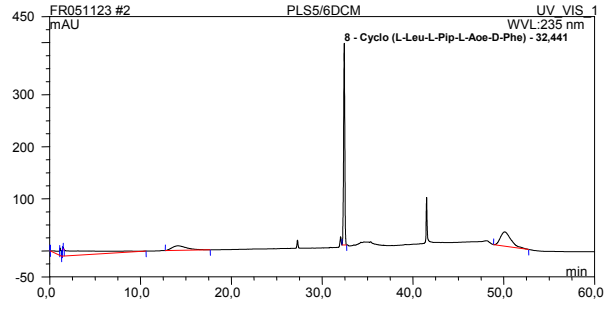
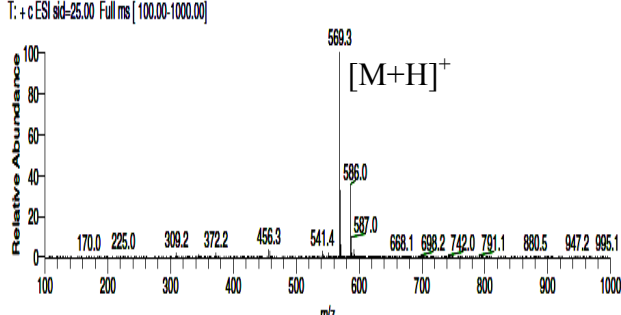
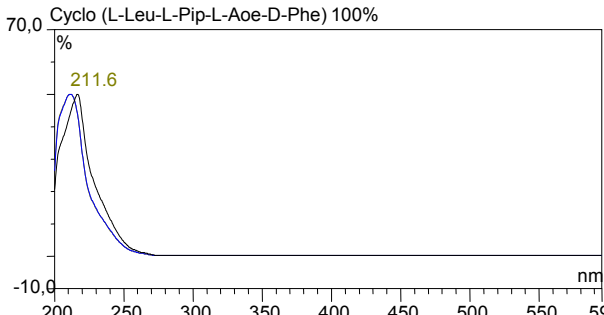
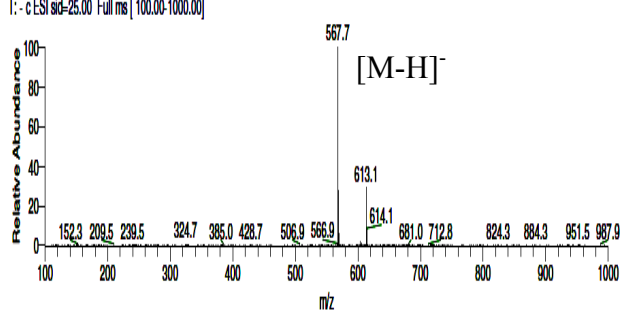
**Tab. 3.5:** Testung der VLC-Fraktionen in zwei Konzentrationen an L5178Y-Zellen

Wachstum L5178Y [%]					
Konzentration					
Fraktion	Fließmittel	Menge	3 µg/ml	10 µg/ml	ED <sub>50</sub> [µg/ml]
PLS 1	Hexan 100%	2 mg	107.7	103.6	negativ
PLS 2	Hex/EtOAc 75/25	4 mg	94.4	81.9	negativ
PLS 3	Hex/EtOAc 50/50	1.5 g	102.7	102.9	negativ
PLS 4	Hex/EtOAc 25/75	576 mg	0.4	-0.3	0.017
PLS 5	EtOAc 100%	261 mg	-0.3	-0.2	0.0014
PLS 6	DCM 100%	409 mg	-0.1	0.0	0.0018
PLS 7	DCM/MeOH 75/25	2 mg	-0.4	-0.9	0.034
PLS 8	DCM/MeOH 50/50	3.4 g	-1.2	-0.9	0.17
PLS 9	DCM/MeOH 25/75	425 mg	6.2	0.9	2
PLS10	MeOH 100%	251 mg	-0.1	-0.8	1

Die vorliegenden Testresultate bestimmten die weitere Vorgehensweise. Wie die obigen Testdaten verdeutlichten waren die hauptaktiven Komponenten in den Fraktionen PLS 5 und 6 aufzuspüren. Zudem erwiesen sich beide Fraktionen hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung als identisch und konnten somit vereinigt werden. In den ersten drei Fraktionen fanden sich Verunreinigungen und Fettsäuren, die offensichtlich erfolgreich von den interessanten Substanzen entfernt werden konnten. Dies zeigte vor allem die Fraktion PLS 3, die von ihrer Konsistenz her eine orange ölige Flüssigkeit war.

## 3.3.1. Antibiotic WF-3161

## Analytische Daten von Antibiotic WF-3161

Systematischer Name	Cyclo(L-Leu-L-Pip-L-Aoe-D-Phe)
Beschreibung	weiße Nadeln
Biologische Quelle	7959-7964 DiGe <i>Petriella sp.</i> aus <i>Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	PLS5/6DCM
Substanzmenge	5 mg
Molekulargewicht	568 g/mol
Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
HPLC-Retentionszeit	32,441 min
R <sub>f</sub> -Wert	R <sub>f</sub> = 0,6 (Kieselgel, DCM/MeOH 96/4)
gemessener Drehwert	[α] <sub>25</sub> <sup>D</sup> -90° (c=1; Chl)
literarischer Drehwert	[α] <sub>25</sub> <sup>D</sup> -120° (c=1; Chl) [Kawai <i>et al.</i> , 1986]
Strukturformel	
	
	
	

Cyclo(L-Leu-L-Pip-L-Aoe-D-Phe) wurde als Träger der höchsten Zytotoxizität im Großkulturextrakt aus marinen *Petriella spp.* aufgespürt, isoliert und identifiziert. Im Zuge der primären Auftrennung unter Anwendung der VLC-Technik, resultierten die beiden identischen Fraktionen PLS5 und PLS6, die gemäß dem Bioassay für die hohen Aktivitäten im Extrakt verantwortlich waren. Bei der Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen PLS5/6 wurde während des Lösevorgangs mit Methanol, zwecks Anfertigung einer HPLC-Probe, ein Niederschlag beobachtet, der sich in Form weißer Nadeln manifestierte. Nach Filtration und einigen Lösungsversuchen erwies sich lediglich Dichlormethan als geeignet zum Auflösen dieser unlöslichen Fraktion PLS5/6DCM. Durch DC-Analyse stellte sich heraus, dass der Unterschied zwischen dem methanolischen Überstand und der Dichlormethanphase lediglich quantitativer Natur war, wobei Methanol das schlechtere Lösungsmittel darstellte. Die Fraktion PLS5/6DCM erwies sich als Reinsubstanz, die bereits vor allem aufgrund ihrer hohen Antitumorwirkung bekannt war. Bei der isolierten Verbindung handelt es sich um ein zyklisches Tetrapeptid aus vier Aminosäuren, die zusammen ein 12-gliedriges zentrales Ringsystem ausbilden. Gemäß der IUPAC-Nomenklatur ist die proteinogene Aminosäure L-Leucin die erste in diesem Verbund, gefolgt von der seltenen Aminosäure namens L-Pipecolinsäure, die über einen tertiären Stickstoff die Amidbindung mit Leucin ausbildet. Bei der dritten Aminosäure handelt es sich um eine äußerst ungewöhnliche und seltene Form, die bereits in einigen Naturstoffen als Baustein beschrieben wurde, jedoch sind jegliche Informationen diesbezüglich durch Patente geschützt und daher nicht einsehbar. Bei dieser Aminosäure, abgekürzt mit L-Aoe, handelt es sich um ein Dekansäurederivat mit einer Ketofunktion an Position 8 und einem Epoxidring am nichtpeptidischen Ende. Die Abkürzung steht für L-2-Amino-8-oxo-9,10-epoxy-dekansäure. Als vierte Aminosäure stellt D-Phenylalanin, die aufgrund der D-Konfiguration nicht als proteinogen gilt, den Ringschluß zwischen der L-Aoe und dem L-Leucin her. Chromatographische Daten der Reinsubstanz PLS5/6DCM wurden mittels DC und HPLC gewonnen. Die DC auf Kieselgel ergab einen Retentionsfaktor von 0,6 bei einem Fließmittelgemisch aus DCM/MeOH im Verhältnis von 96:4. Die Retentionszeit auf der RP-18 Säule der analytischen HPLC betrug 32,4 min und die anschließende UV-Detektion zeigte ein Absorptionsmaximum der Substanz bei 211,6 nm.



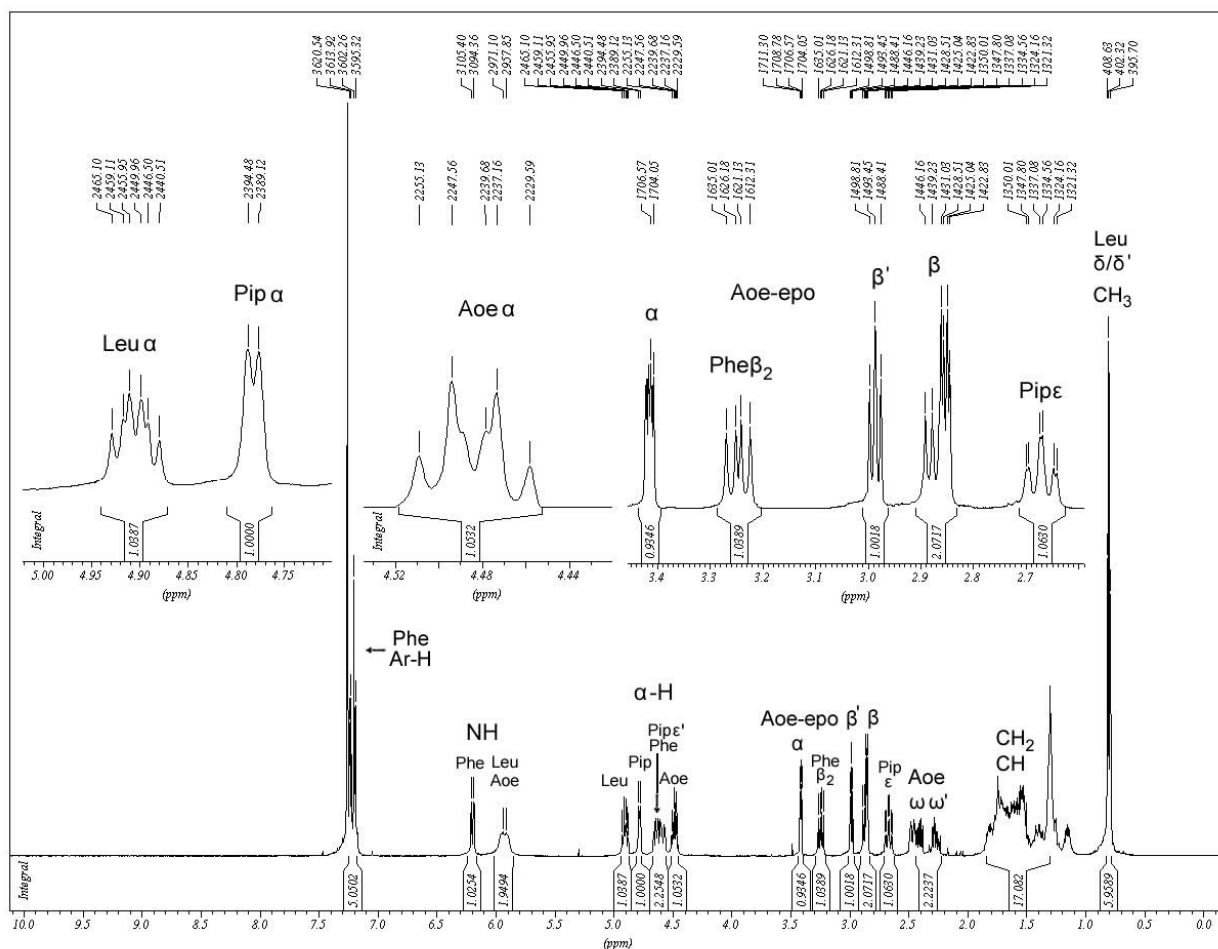
Die Basispeaks bei der massenspektrometrischen Analyse lagen bei 569,3 für  $[M+H]^+$  im Positivmodus und bei 567,7 für  $[M-H]^-$  im negativen Messmodus und indizierten somit ein Molekulargewicht von 568 g/mol. Durchgeführte stereochemische Untersuchungen waren die Messung der optischen Drehung (vgl. 2.6.4) und die Bestimmung der absoluten Konfiguration der einzelnen Aminosäuren unter Anwendung der Methode nach Marfey (vgl. 2.6.5). Der gemessene Drehwert von  $[\alpha]_D^{25} -90^\circ$  (c=1, Chl.) zeigte eine Differenz von  $30^\circ$  zum Literaturwert von  $[\alpha]_D^{25} -120^\circ$  (c=1, Chl.) [Umehara *et al.*, 1983] bei gleichen Messbedingungen. Mögliche Ursachen hierfür könnten optisch aktive Verunreinigungen in einer der beiden Proben sein oder ein unterschiedliches Enantiomerenverhältnis beider Proben. Da für die Durchführung der Marfey-Reaktion (vgl. 2.6.5.) jede einzelne zu bestimmende Aminosäure als Vergleichsstandard erforderlich war, konnte die Konfiguration der seltenen Aoe mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da diese kommerziell nicht verfügbar war. Als Spektrenmaterial zur Strukturaufklärung wurde von der Reinsubstanz PLS5/6DCM ein Protonenspektrum, ein COSY und ein HMBC in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Die zweidimensionalen Messungen erfolgten am Helmholtz-Institut für Infektionsforschung in Braunschweig durch Dr. Wray mit einem Spektrometer vom Typ DMX-600, Bruker. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome wurden durch graphische Extrapolation dem HMBC entnommen.

**Tab. 3.6:** NMR-Daten von **Cyclo(L-Leu-L-Pip-L-Aoe-D-Phe)** in CDCl<sub>3</sub>  
(500 bzw. 125 MHz)

Funktion	$\delta_c$ [ppm]	$\delta_c$ [ppm] <sup>1</sup>	$\delta_H$ [ppm] (Mult., J [Hz])	$\delta_H$ [ppm] (Mult., J [Hz]) <sup>1</sup>
Leu- $\alpha$	47.5	47.18	4.90 (ddd, 3.5, 6.0, 9.5)	4.91 (ddd, 2.7, 8.2, 10.2)
Leu- $\beta$	41.1	40.63	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Leu- $\gamma$	24.7	24.86	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Leu- $\delta$	23.2	22.15	0.80 (d, 6.7)	0.81 (d, 6.2)
Leu- $\delta'$	21.0	20.80	0.81 (d, 6.3)	0.82 (d, 6.2)
Leu-NH			5.94 (d, 8.8)	5.87 (d, 10)
Leu-C=O				
Pip- $\alpha$	57.5	57.26	4.80 (d, 5.4)	4.78 (d, 4.6)
Pip- $\beta, \beta'$	20.5	24.21	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Pip- $\gamma, \gamma'$	20.8	23.07	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Pip- $\delta, \delta'$	27.0	26.86	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Pip- $\epsilon$	40.5	41.33	2.67 (t, 12.9)	2.67 (t, 13.1)
Pip- $\epsilon'$	40.5	41.33	4.59-4.69 (m)	4.61-4.71 (m)
Pip-C=O	174.0			
Aoe- $\alpha$	54.3	54.22	4.51 (m)	4.48 (m)
Aoe- $\beta, \beta'$	27.4	28.71	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Aoe- $\gamma, \gamma'$	26.0	25.51	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Aoe- $\delta, \delta'$	28.1	27.73	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Aoe- $\epsilon, \epsilon'$	22.9	22.86	1.15-1.88 (m)	1.13-1.88 (m)
Aoe- $\omega, \omega'$	36.5	36.30	2.27-2.48 (m)	2.18-2.52 (m)
Aoe-epoxy- $\alpha$	53.3	53.41	3.43 (dd, 2.5, 4.7)	3.42 (dd, 2.5, 4.6)
Aoe-epoxy- $\beta$	46.0	46.04	2.85 (dd, 2.2, 5.7)	2.85 (dd, 2.3, 5.6)
Aoe-epoxy- $\beta'$			2.99 (dd, 5.0, 5.4)	2.99 (dd, 4.6, 5.5)
Aoe-epoxy-C=O				
Aoe-NH			5.96 (d, 8.5)	5.9 (d, 10.5)
Aoe-C=O		207.27		
Phe- $\alpha$	55.5	55.69	4.59-4.69 (m)	4.61-4.71 (m)
Phe- $\beta$	34.9	34.99		
Phe- $\beta_1$			2.87 (dd, 6.9, 13.8)	2.87 (dd, 6.8, 13.7)
Phe- $\beta_2$			3.25 (dd, 8.8, 13.8)	3.25 (dd, 6.7, 13.7)
Aromat-1'	137.0	136.84		
Aromat-2', 6'	129.2	129.21	7.21 (d, 6.9)	
Aromat-3', 5'	128.5	128.45	7.21 (d, 6.6)	
Aromat-4'	126.5	126.71	7.26 (m)	
Phe-NH			6.21 (d, 10.7)	6.17 (d, 10.9)
Phe-C=O				

<sup>1</sup>Kawai *et al.*, 1986

Die Gegenüberstellung der aufgenommenen Kernspinresonanzdaten von PLS5/6DCM mit denen aus der Literatur zeigt eine sehr gute Übereinstimmung.



**Abb. 3.9:**  $^1\text{H}$ -NMR von PLS5/6DCM in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

Das Protonenspektrum kann in vier charakteristische Resonanzregionen unterteilt werden: Einen aliphatischen Bereich bei  $\delta_{\text{H}}$  0.8-3.25 ppm mit den Signalen sämtlicher Methin-, Methylen- und Methylprotonen, eine Region bei  $\delta_{\text{H}}$  4.51-4.90 ppm mit den Resonanzen der Aminosäure- $\alpha$ -Protonen, der Resonanzabschnitt der amidischen Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  5.94-6.21 ppm und den aromatischen Bereich bei  $\delta_{\text{H}}$  7.21-7.26 ppm der fünf Protonen des Phenylalanins. Im aliphatischen Bereich befanden sich die Resonanzen der beiden Methylgruppen des Leucins bei  $\delta_{\text{H}}$  0.80 ppm für Leu- $\delta$  und bei  $\delta_{\text{H}}$  0.81 ppm für Leu- $\delta'$  nahezu überlappend sehr eng beieinander. Beide Signale manifestierten als Dubletts die Kopplung über drei Bindungen zum Leu- $\gamma$ -Proton. Dessen Resonanz befand sich etwas weiter tieffeldverschoben als Teil eines komplexen Multipletts, das sich über einem Resonanzintervall von  $\delta_{\text{H}}$  1.15-1.88 ppm erstreckt und gemäß dem Integral die Resonanzsignale von insgesamt 17 aliphatischen Protonen umfasste.

Dieses Multiplett umfasste außerdem noch die beiden Methylenprotonen des Leucins an  $\beta$ -Position, die sechs Methylenprotonen der Pipecolinsäure ( $\beta$ - $\delta$ ) und die acht der seltenen Aminosäure Aoe ( $\beta$ - $\epsilon$ ). Als eigenes Multiplett weiter tieffeldverschoben bei  $\delta_{\text{H}}$  2.27-2.48 ppm, zeigte sich jedoch die Methylengruppe der beiden Aoe- $\omega$ -Protonen. Das unterschiedliche Resonanzverhalten der beiden Protonen der  $\epsilon$ -Methylengruppe der Pipecolinsäure diente als entscheidender Hinweis für stereochemische Überlegungen. Die beträchtliche tieffeldverschobene Resonanz eines dieser Pip- $\epsilon$ -Protonen belegte, dass es sich bei der Amidbindung zwischen dem Leucin und der Pipecolinsäure um eine cis-amidische Bindung handeln muß [Kawai *et al.*, 1986]. Die tertiäre Amidbindung ist cis-konfiguriert, weil eines der beiden  $\epsilon$ -Protonen in der entschirmenden Region der Leucin-Carbonylgruppe liegt. Die Messdaten zeigten eines dieser Protonen als Triplet bei  $\delta_{\text{H}}$  2.67 ppm, während das andere sich als Teil des Multipletts im Resonanzbereich von  $\delta_{\text{H}}$  4.59-4.69 ppm der  $\alpha$ -Protonen befand. Ebenso belegten auch Daten aus  $^{13}\text{C}$ -Experimente die cis-Verknüpfung der Leu-Pip-Einheit. Die chemische Verschiebung des Leu- $\alpha$ -Kohlenstoffatoms war, wie gefordert, mit  $\delta_{\text{C}}$  47,5 ppm um 5 ppm hochfeldverschoben im Vergleich zu einem normalen Leucin- $\alpha$ , das gewöhnlich einen chemischen Verschiebungswert von  $\delta_{\text{C}}$  50-54 ppm aufweist [Kawai *et al.*, 1986]. Grund hierfür ist eine sterische Kompression, auch als sogenannter  $\alpha$ -Effekt bekannt, zwischen den beiden  $\alpha$ -Kohlenstoffen von Leucin und Pipecolinsäure. Die beiden Methylenprotonen des Aoe-Epoxidringes signalisierten ihren diastereotopen Charakter durch unterschiedliche Resonanzen, bei  $\delta_{\text{H}}$  2.85 ppm und bei  $\delta_{\text{H}}$  2.99 ppm. Beide lagen als Doppeldoublets vor, gemäß ihren beiden Kopplungen mit dem jeweils anderen Gruppenpartner sowie jeweils mit dem  $\alpha$ -Proton des Epoxidringes, dessen Resonanz ebenfalls als doppeltes Dublet weiter tieffeld bei  $\delta_{\text{H}}$  3,43 ppm zu finden war. Sein Doppeldoublet steht für die Kopplung mit den beiden diastereotopen Methylenprotonen des Epoxidringes. Ebenso folgten die Protonen der  $\beta$ -Methylengruppe des Phenylalanins den Resonanzgesetzmäßigkeiten der Diastereotopie mit Doppeldoublets bei  $\delta_{\text{H}}$  2.87 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3.25 ppm. Weiter tieffeld folgte im Protonenspektrum dann der Bereich für die  $\alpha$ -Protonen der vier Aminosäuren, beginnend mit dem der Aoe bei  $\delta_{\text{H}}$  4.51 ppm. Das  $\alpha$ -Proton des Phenylalanins befand sich als Multiplett im Resonanzintervall zwischen  $\delta_{\text{H}}$  4.59-4.69 ppm. In Richtung Tieffeld folgten dann das der Pipecolinsäure bei  $\delta_{\text{H}}$  4.80 ppm und das des Leucins bei  $\delta_{\text{H}}$  4.90 ppm mit der höchsten chemischen Verschiebung.

Im Bereich der Amidprotonen zeigten sich das des Leucins bei  $\delta_H$  5.94 ppm und der Aoe bei  $\delta_H$  5.96 ppm sehr nahe beieinander, wohingegen das amidische Proton des Phenylalanins etwas weiter abgesetzt von den anderen beiden bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_H$  6.21 ppm positioniert war. Alle drei Signale traten als Dublett auf, da die jeweiligen Amidprotonen das jeweilige  $\alpha$ -Proton als einzigen Kopplungspartner haben. Der aromatische Resonanzbereich zeigte die fünf Protonen des Phenylalaninsystems. Das aromatische Signal bei  $\delta_H$  7.21-7.26 ppm mit einem Flächenintegral von 3H stand für die fünf Protonen an den Positionen 2' bzw. 6', 3' bzw. 5' und 4'.

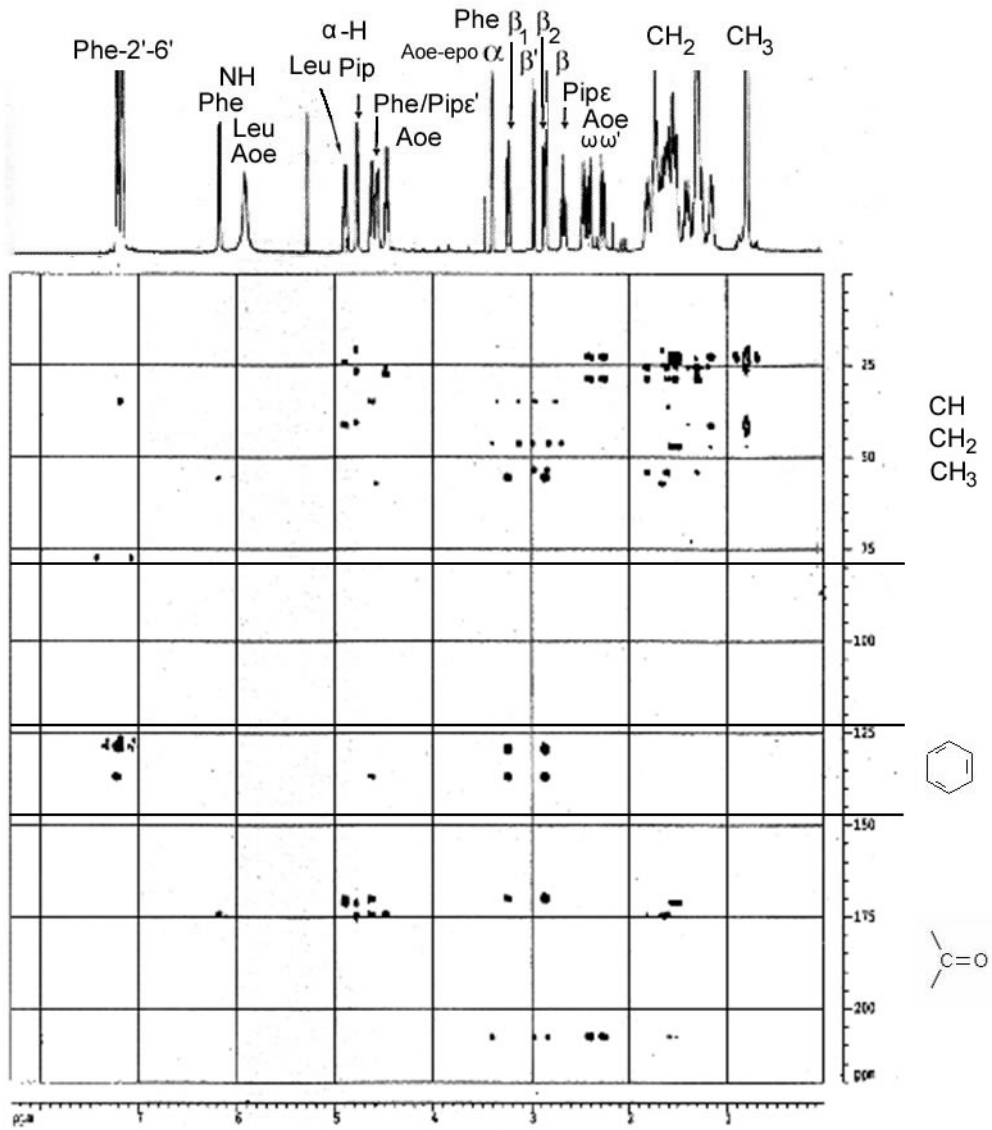


Abb. 3.10: HMBC-Spektrum von PLS5/6DCM in  $CDCl_3$

**Tab. 3.7:** HMBC-Daten von PLS5/6DCM

Funktion	HMBC (H→C)
Leu- $\alpha$	Leu- $\beta$ , Leu- $\gamma$ , Leu-C=O, Phe-C=O
Leu- $\beta$	Leu-C=O
Leu- $\gamma$	Leu- $\beta$ , Leu- $\delta$
Leu- $\delta$	Leu- $\delta$ , Leu- $\beta$
Leu- $\delta'$	Leu- $\delta'$ , Leu- $\beta$
Pip- $\alpha$	Pip- $\beta$ , Pip- $\gamma$ , Pip- $\epsilon$ , Pip-C=O, Leu-C=O
Pip- $\beta, \beta'$	Pip-C=O
Pip- $\epsilon'$	Pip- $\alpha$
Aoe- $\alpha$	Aoe- $\beta$ , Aoe- $\gamma$ , Aoe-C=O, Pip-C=O
Aoe- $\omega, \omega'$	Aoe- $\delta$ , Aoe- $\epsilon$ , Aoe-epoxy-C=O
Aoe-epoxy- $\alpha$	Aoe-epoxy- $\beta$ , Aoe-epoxy-C=O
Aoe-epoxy- $\beta, \beta'$	Aoe-epoxy- $\alpha$ , $\beta$ , Aoe-epoxy-C=O
Phe- $\alpha$	Phe- $\beta$ , Phe-1', Phe-C=O, Aoe-C=O
Phe- $\beta_1, \beta_2$	Phe- $\beta$ , Phe- $\alpha$ , Phe-1', 2', 6', Phe-C=O
Phe-2', 6'	Phe- $\beta$ , Phe-1'

Das HMBC-Spektrum konnte hinsichtlich der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in drei verschiedene Zonen unterteilt werden: Einen aliphatischen Bereich für  $\delta_C$  0-75 ppm mit Korrelationssignale zu aliphatischen Kohlenstoffatomen, eine aromatische Region für  $\delta_C$  125-150 ppm, welche die Korrelationen zum Benzolring des Phenylalanins zeigte und den für die Bestimmung der Aminosäuresequenz bedeutensten Bereich von  $\delta_C$  150-250 ppm, der u.a. die übergreifenden Korrelationen zwischen den einzelnen Aminosäuren zeigte.

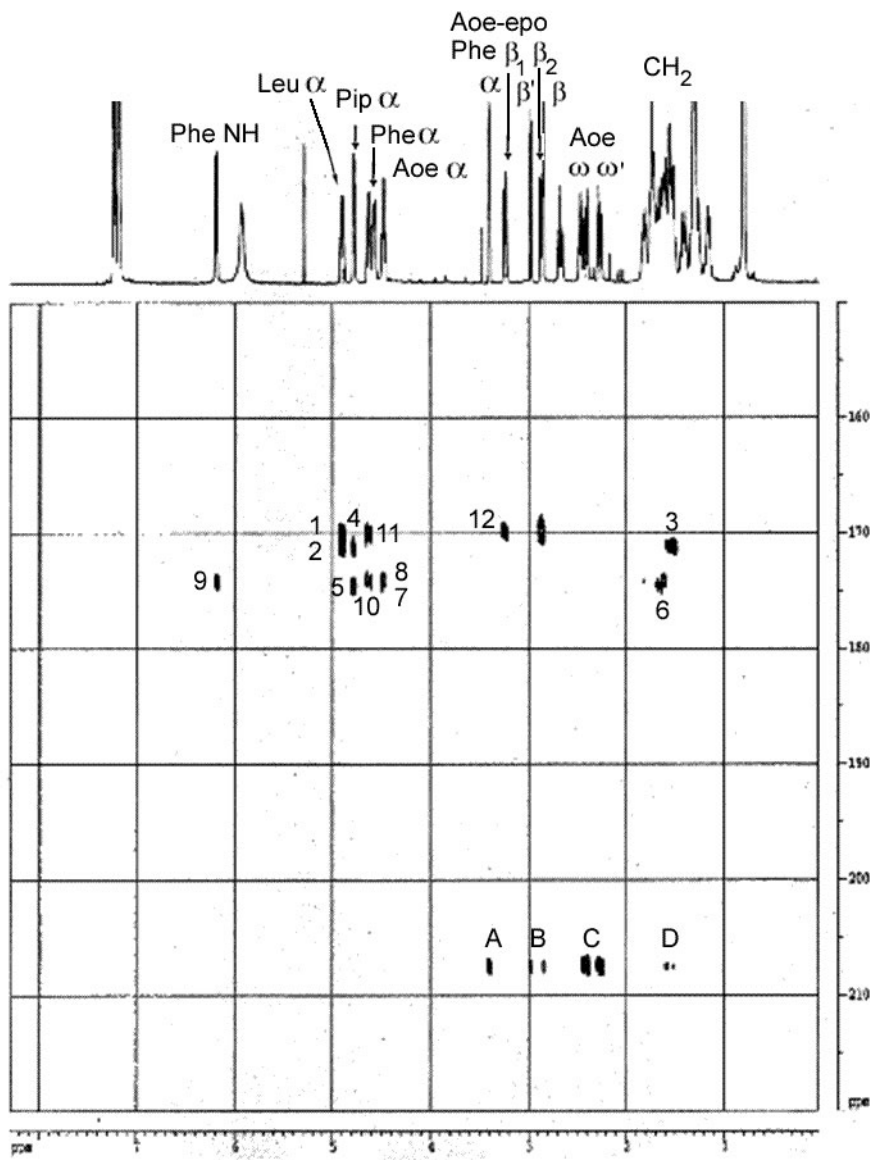
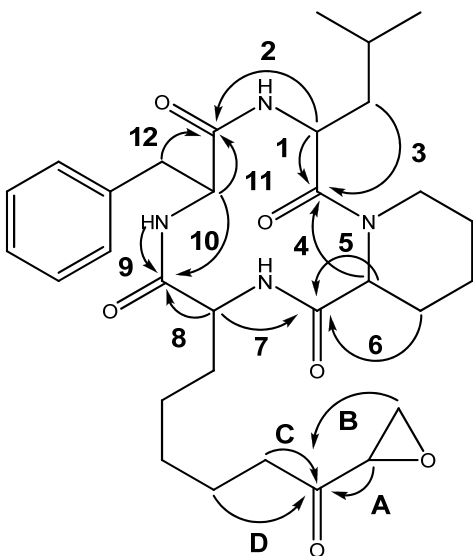


Abb. 3.11: Schlüsselkorrelationen von PLS5/6DCM zur Bestimmung der Sequenz





Diese intermolekularen Korrelationen gingen allesamt von den jeweiligen  $\alpha$ -Positionen einer Aminosäure aus und fanden jeweils über drei Bindungen zur Carbonylfunktion einer benachbarten Aminosäure statt. Jede der vier Aminosäuren fungierte somit sowohl als „Donator“, als auch als „Akzeptor“ einer Korrelation. Die übergreifenden Korrelationen der jeweiligen  $\alpha$ -Protonen zu benachbarten Carbonylkohlenstoffatome konnten gegen den Uhrzeigersinn wie folgt aus dem HMBC entnommen werden: Leu- $\alpha$ -H zum Phe-C=O (**2**), Phe- $\alpha$ -H zum Aoe-C=O (**10**), Aoe- $\alpha$ -H zum Pip-C=O (**7**) und die Korrelation des Pip- $\alpha$ -H zum Leu-C=O (**4**). Lediglich für das Phenylalanin konnte eine intermolekulare Korrelation, die vom Amidproton ausging beobachtet werden (**9**). Desweiteren konnten auch intramolekulare Korrelationen innerhalb jeder einzelnen Aminosäure wie folgt beobachtet werden: Innerhalb des L-Leucins zeigten sich zwei Kreuzsignale für Korrelationen zum Leu-C=O. Einmal die des Leu-  $\alpha$ -H (**1**) und einmal ausgehend von den beiden Methylenprotonen des Leu- $\beta$  (**3**). Analog zeigten sich auch beim Phenylalanin diese beiden Korrelationstypen. Das Phe- $\alpha$ -H (**11**) und die Phe- $\beta$ -Methylenprotonen korrelierten mit der Phe-C=O (**12**). Bei der Aoe zeigte nur das Aoe- $\alpha$ -H eine intramolekulare Korrelation zum Carbonylkohlenstoff (**5**). Vier weitere interne Korrelationen der Aoe bezogen sich auf die Carbonylfunktion in Nachbarschaft zum Epoxidring. Es zeigten sich zwei Korrelationen ausgehend von den Protonen des Epoxidringes, zum einen für das  $\alpha$ -Proton über zwei Bindungen (**A**) sowie für die beiden Protonen an  $\beta$ -Position über drei Bindungen (**B**). Zwei weitere Korrelationen betrafen aliphatische Protonen der Aoe und waren zum einen die Methylenprotonen der  $\omega$ -Position über zwei Bindungen (**C**) sowie die der  $\epsilon$ -Methylprotonen über drei Bindungen zum Aoe-epoxid-carbonyl (**D**).

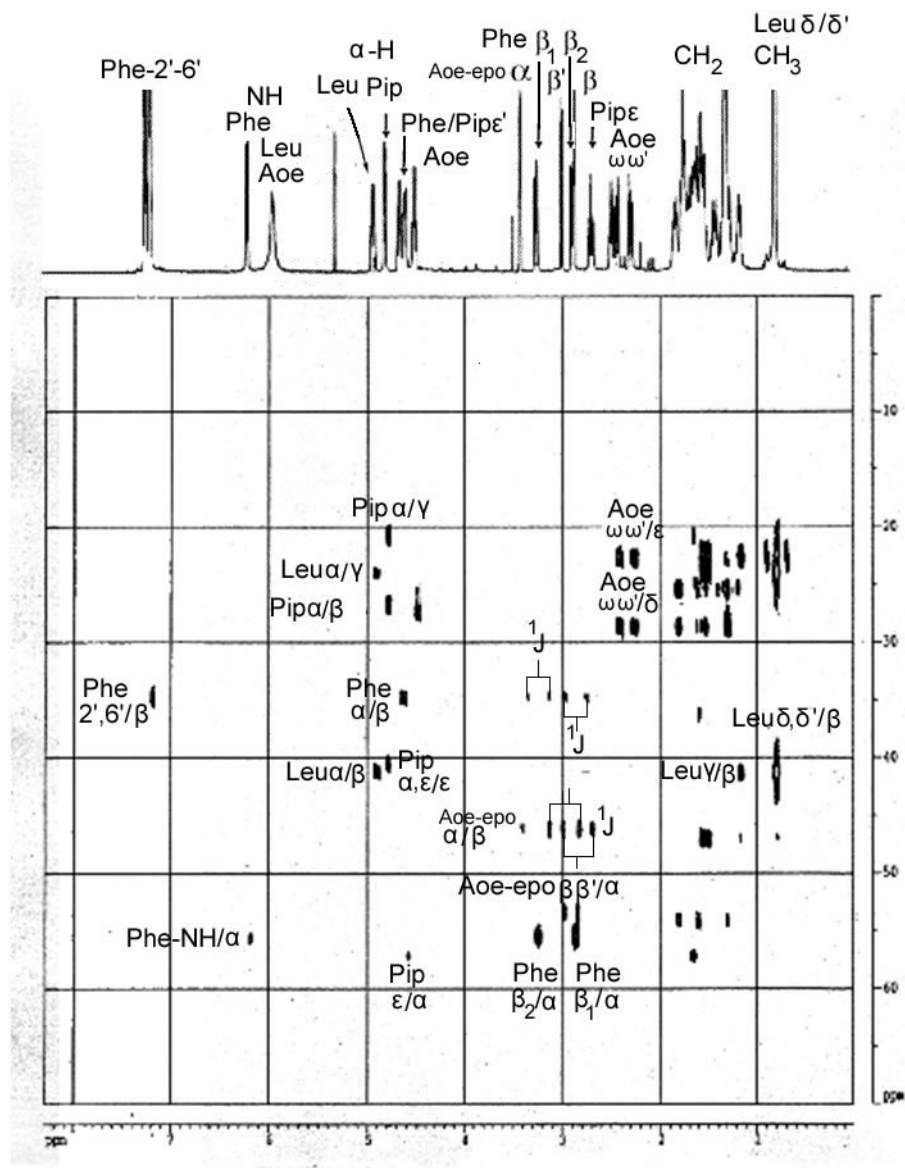
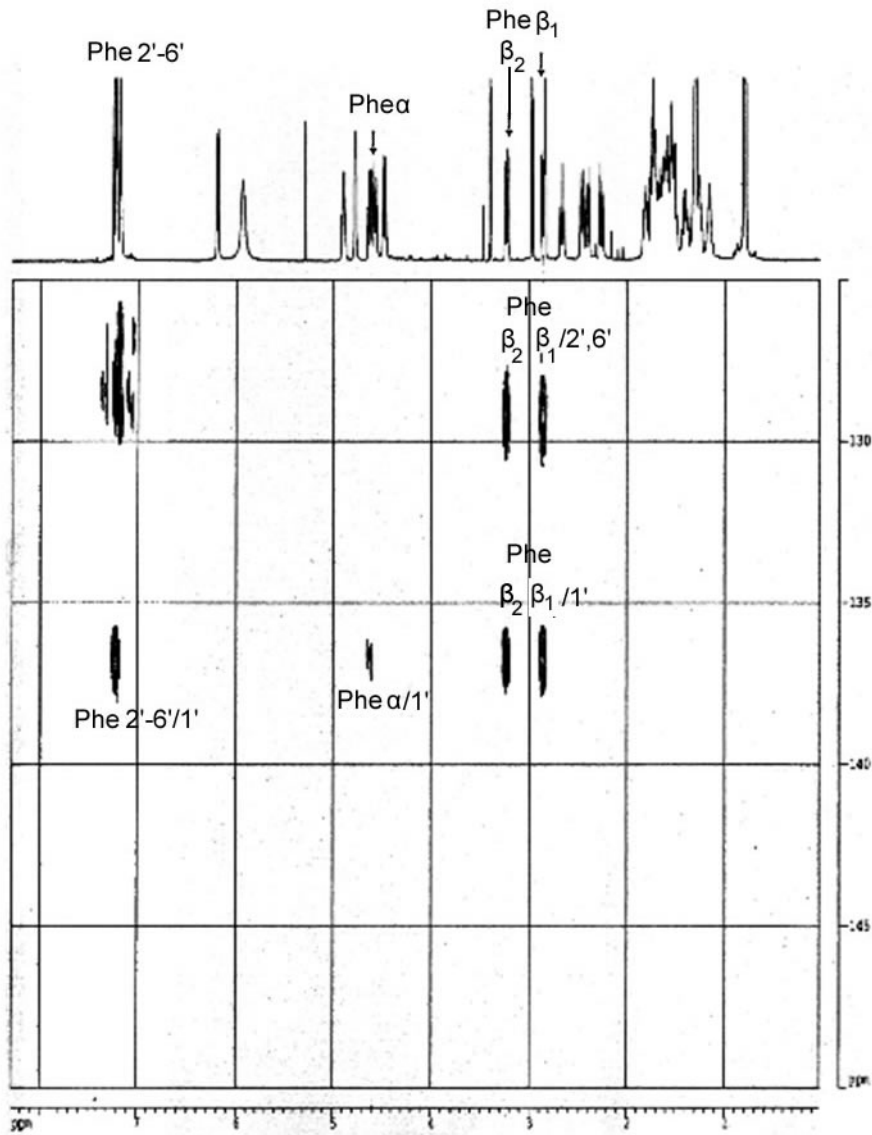


Abb. 3.12: HMBC-Korrelationen zu aliphatischen Kohlenstoffatomen

Die Korrelationen zu aliphatischen Kohlenstoffatomen lagen im Bereich von  $\delta_C = 20-60$  ppm. Aufgrund der starken Signalüberlappung konnten für die Protonen im Bereich von  $\delta_H = 0.8-1.88$  ppm lediglich drei des Leucins (Leu- $\gamma$  und Leu- $\delta$ ,  $\delta'$ ) zugeordnet werden. Bei diesen handelte es sich um die Korrelationen der  $\delta$ ,  $\delta'$ -Methylprotonen zum  $\beta$ -Kohlenstoffatom über drei Bindungen und die des Leucin- $\gamma$ -protons über zwei Bindungen ebenfalls zum  $\beta$ -Kohlenstoff. Ferner konnte auch das Signal für die Korrelation des Leucin- $\gamma$ -protons über zwei Bindungen zu den beiden Methylkohlenstoffatomen an den Positionen  $\delta$  und  $\delta'$  zugeordnet werden. Für die seltene Aminosäure Aoe konnten im aliphatischen Bereich zwei Korrelationen für die beiden  $\omega$ -Methylenprotonen zu den benachbarten Kohlenstoffatomen der Position  $\epsilon$  über zwei und zum  $\delta$ -Kohlenstoff über drei Bindungen zugeordnet werden. Direktkorrelationssignale fanden sich jeweils für die beiden Methylenprotonen an  $\beta$ -Position des Phenylalanins sowie zwei weitere für die Methylenprotonen des Aoe-epoxidringes. Ferner zeigten beide dieser Aoe- $\beta$ ,  $\beta'$ -Epoxidprotonen eine Korrelation zum benachbarten  $\alpha$ -Epoxid-Kohlenstoffatom. Beide  $\beta$ -Methylprotonen des Phenylalanins zeigten Korrelationen zum Phe  $\alpha$ -Kohlenstoff. Die  $\alpha$ -Protonen im Bereich von  $\delta_H = 4.5-4.9$  ppm zeigten allesamt Korrelationen zu den benachbarten  $\beta$ -Kohlenstoffatomen und mit Ausnahme des Phenylalanins auch Korrelationen zum jeweiligen  $\gamma$ -Kohlenstoff. Als einziges  $\alpha$ -Proton zeigte jenes der Pipekolinsäure auch eine Korrelation über drei Bindungen zum  $\epsilon$ -Kohlenstoff. Das Signal für das Proton  $\epsilon'$  der Pipekolinsäure befand sich ebenfalls im Bereich der  $\alpha$ -Protonen und zeigte eine Korrelation zum  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Als einziges amidisches Proton fand sich für das des Phenylalanins eine Korrelation zum  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Die beiden aromatischen Protonen an den Positionen 2' und 6' des Phenylalanins zeigten jeweils Kreuzsignale für Korrelationen über drei Bindungen zum  $\beta$ -Kohlenstoffatom.



**Abb. 3.13:** HMBC-Korrelationen zu aromatischen Kohlenstoffatomen

Korrelationen der aromatischen Protonen fanden sich für 2', 3', 5' und 6' des Phenylalanins zum aromatischen Kohlenstoff der Position 1'. Ferner konnte eine Korrelation des α-Protons zum C1' über drei Bindungen beobachtet werden. Für die β-Methylprotonen ergaben sich Kreuzsignale für Korrelationen mit dem C2' und dem C6' über drei Bindungen und mit dem C1' über zwei Bindungen.

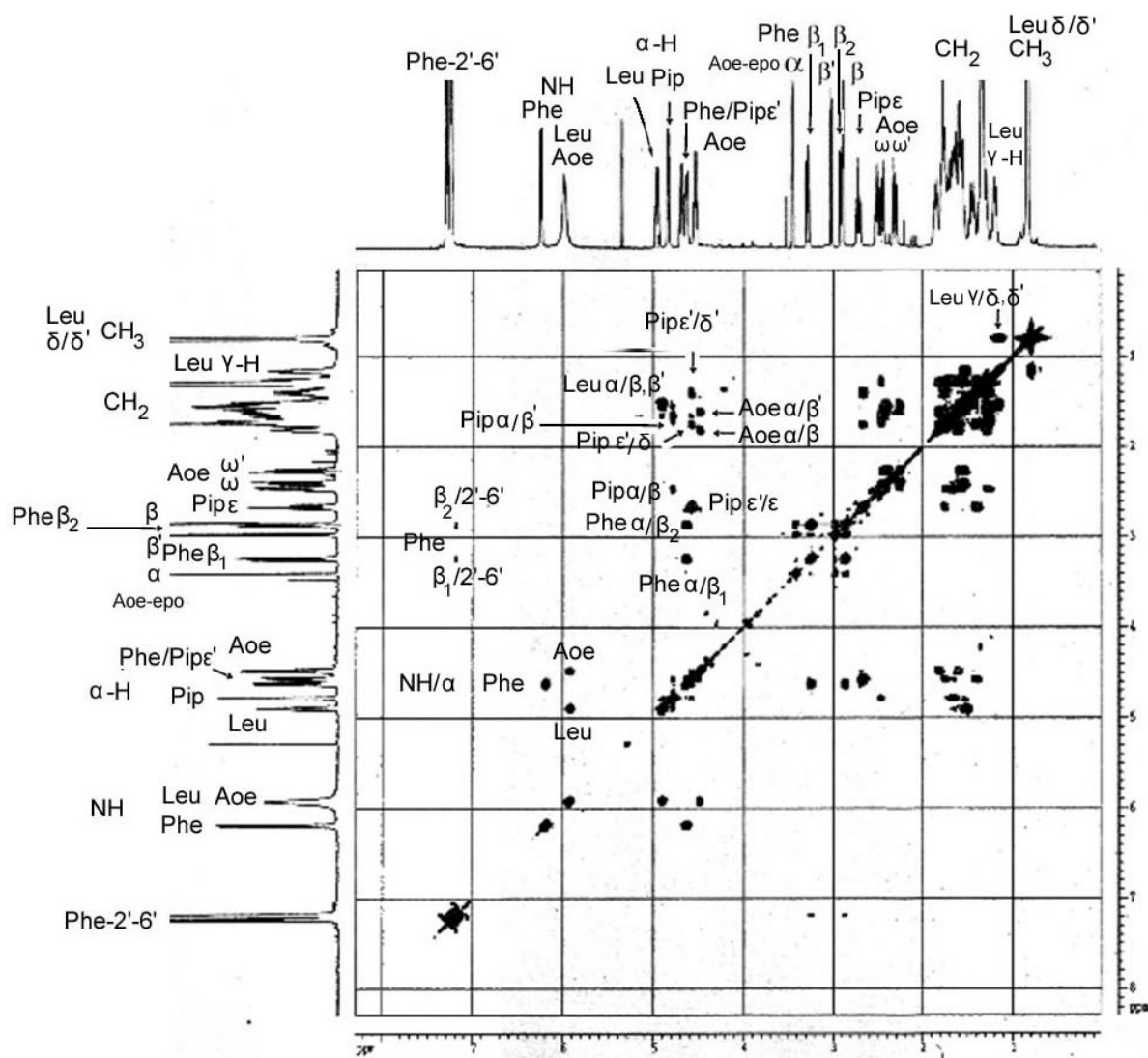


Abb. 3.14: H,H-COSY von PLS5/6DCM

**Tab. 3.8:** COSY-Daten von PLS5/6DCM in CDCl<sub>3</sub>

Funktion	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (Mult., J [Hz])	COSY (H→H)
Leu- $\alpha$	4.90 (ddd, 3.5, 6.0, 9.5)	Leu- $\beta$ , Leu-NH
Leu- $\beta$	1.15-1.88 (m)	Leu- $\alpha$
Leu-NH	5.94 (d, 8.8)	Leu- $\alpha$
Pip- $\alpha$	4.80 (d, 5.4)	Pip- $\beta, \beta'$
Pip- $\beta, \beta'$	1.15-1.88 (m)	Pip- $\alpha$
Pip- $\delta, \delta'$	1.15-1.88 (m)	Pip- $\epsilon'$
Pip- $\epsilon$	2.67 (t, 12.9)	Pip- $\epsilon'$
Pip- $\epsilon'$	4.59-4.69 (m)	Pip- $\epsilon$ , Pip- $\delta, \delta'$
Aoe- $\alpha$	4.51 (m)	Aoe- $\beta, \beta'$ , Aoe-NH
Aoe- $\beta, \beta'$	1.15-1.88 (m)	Aoe- $\alpha$
Aoe-NH	5.96 (d, 8.5)	Aoe- $\alpha$
Phe- $\alpha$	4.59-4.69 (m)	Phe- $\beta_1, \beta_2$ , Phe-NH
Phe- $\beta_1$	2.87 (dd, 6.9, 13.8)	Phe- $\alpha$ , Phe-2',6'
Phe- $\beta_2$	3.25 (dd, 8.8, 13.8)	Phe- $\alpha$ , Phe-2',6'
Phe-2',6'	7.21 (d, 6.9)	Phe- $\beta_1$ , Phe- $\beta_2$
Phe-NH	6.21 (d, 10.7)	Phe- $\alpha$

Das aufgezeichnete H,H-COSY von der Reinsubstanz PLS5/6DCM zeigte für alle  $\alpha$ -Protonen die vicinalen Kopplungen zu den angrenzenden  $\beta$ -Protonen. Für das Proton  $\epsilon'$  der Pipekolinsäure, dessen Resonanz sich auch innerhalb der  $\alpha$ -Region befand, zeigten sich Kreuzsignale für die geminale Kopplung zum anderen Gruppenpartner der diastereotopen Methylengruppe, dem  $\epsilon$ -Proton und auch die Kopplung vom vicinalen Typ zu den benachbarten Methylenprotonen an Position  $\delta$ . Abgesehen von der Pipekolinsäure, die über einen tertiären Stickstoff verfügt, fanden sich für alle übrigen drei Aminosäuren Kreuzsignale für die vicinalen Kopplungen zwischen den jeweiligen Amidprotonen und den  $\alpha$ -Protonen. Zwei Fernkopplungen zeigten sich innerhalb des Phenylalanins zwischen den aromatischen Protonen 2' und 6' mit den beiden  $\beta$ -Methylenprotonen.

## 3.3.2. Thymin

## Analytische Daten von Thymin

Systematischer Name	2,4-Dihydroxy-5-methylpyrimidin
Beschreibung	weißes Pulver
Biologische Quelle	7961 DiGe <i>Petriella sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	PS11SX10/11
Substanzmenge	1 mg
Molekulargewicht	126 g/mol
Summenformel	$C_5H_6N_2O_2$
HPLC-Retentionszeit	9,673 min

Strukturformel

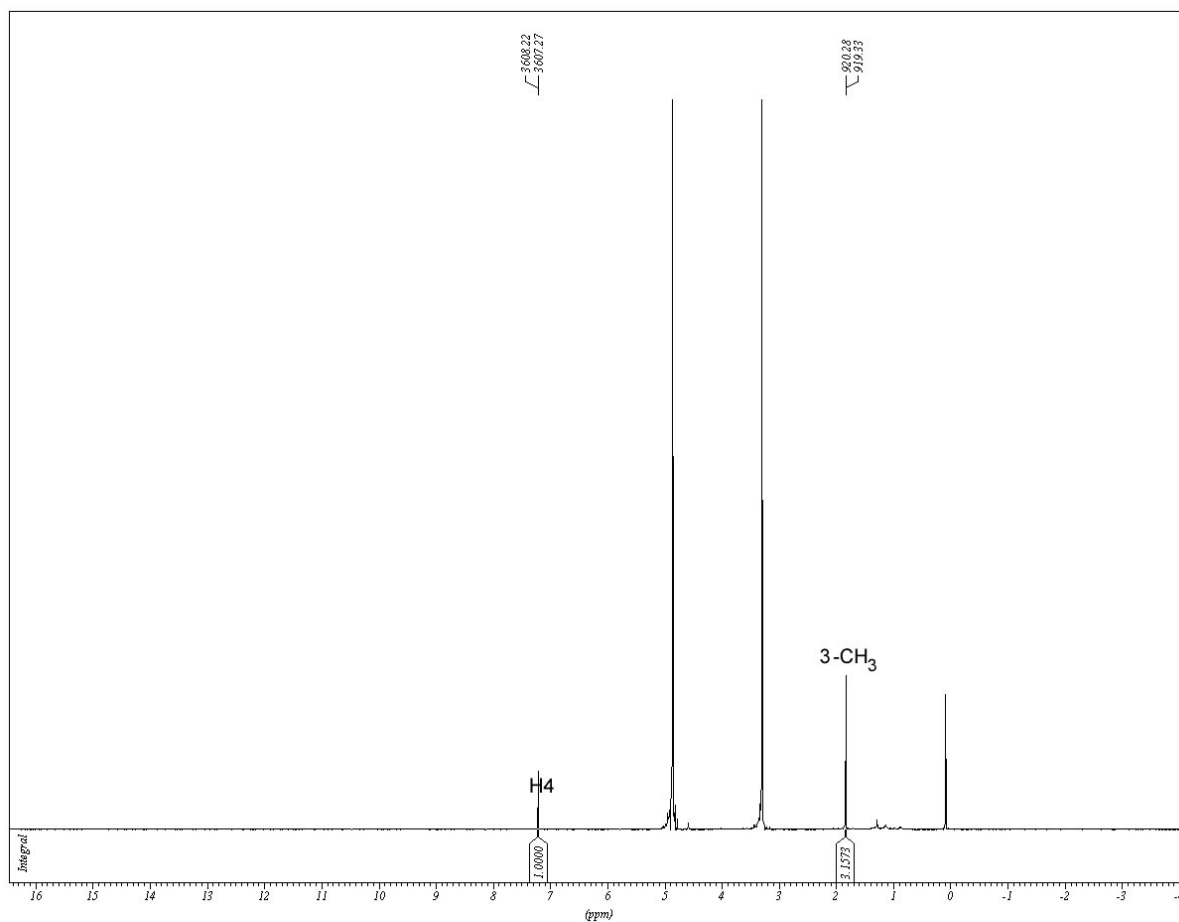
  


Thymin wurde als Nebenprodukt bei der Auftrennung des Extraktes aus *Petriella sp.* in zwei Trennschritten isoliert. Aus einer ersten Säulentrennung mit Kieselgel als erste Trennstufe, resultierten nach Vereinigung 11 Fraktionen. Die letzte dieser Fraktionen PS11 galt als Nachlauf durch welchen die Säule mit reinem Methanol gespült wurde. Positive Testresultate hinsichtlich Zytotoxizität gaben dann Anlaß zur weiteren Auftrennung dieser Fraktion, die dann mit Sephadex als stationäres Säulenmaterial chromatographiert wurde. Als Elutionsmittel hierbei fungierte reines Methanol. Bei der Trennung ergaben sich 11 Fraktionen, wobei Thymin in den letzten beiden nachgewiesen wurde. Grund für diese späte Elution war das sehr geringe Molekulargewicht des Thymins, das durch das Größenausschlußverfahren ganz am Ende aus dem starkporigen Dextrangeflecht freigegeben wurde. Die Fraktion PS11SX10/11 ergab in methanolischer Lösung eine Rotfärbung. Das sehr hydrophile Thymin wurde bereits bei einer Retentionszeit von 9,7 min auf der analytischen HPLC detektiert. Das UV-Spektrum zeigte zwei hohe und fast gleichgroße Absorptionsbanden bei 207,4 nm und 264,5 nm. Im Massenspektrum wurde für das positive Ion  $[M+H]^+$  ein Basispeak bei 127,1 und für das negative Ion  $[M+H]^-$  ein entsprechender Massenpeak bei 125,1 gefunden, was auf einem Molekulargewicht von 126 amu schließen ließ. Thymin fungiert als Nucleinbase und ist als komplementärer Bindungspartner des Adenins ein Grundbaustein der DNA. In Bakterien wurde es bereits im freien Zustand detektiert. Zur Strukturaufklärung wurde von der Reinsubstanz PS11SX10/11 ein Protonenspektrum und ein COSY in deuteriertem Methanol aufgezeichnet.

**Tab. 3.9:** NMR-Daten für **Thymin** in CD<sub>3</sub>OD (500 bzw. 125 MHz)

Funktion	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz] )	COSY (H→H)
3-CH <sub>3</sub>	1.84 (d, 0.95)	H4
H4	7.21 (d, 0.95)	3-CH <sub>3</sub>





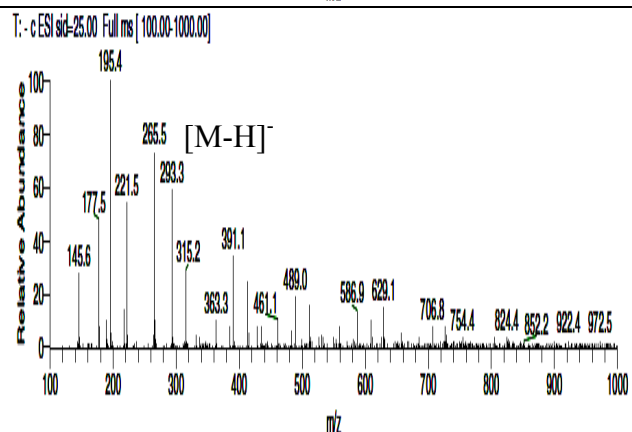
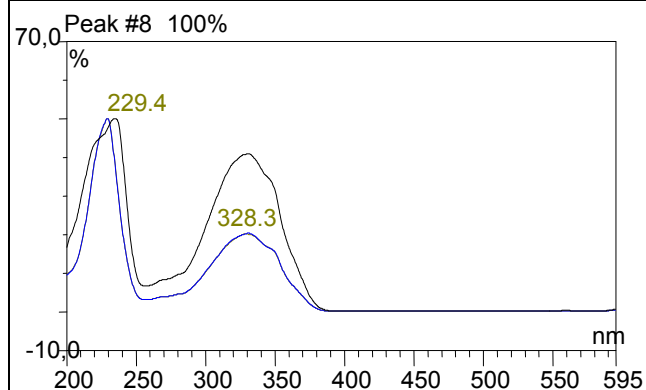
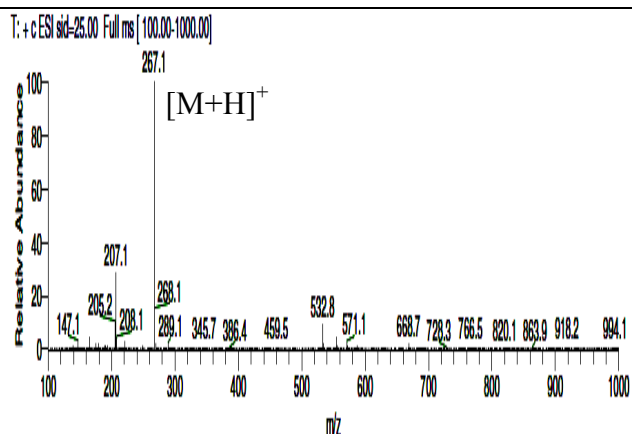
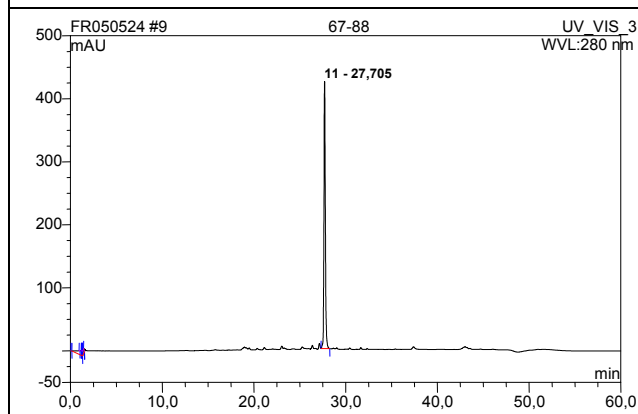
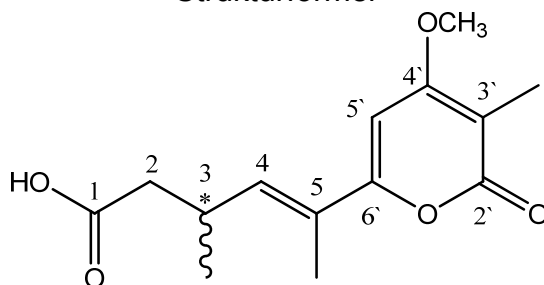
**Abb. 3.15:**  $^1\text{H-NMR}$  von PS11SX10/11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)

### 3.3.3. Dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff)

#### Analytische Daten von Dihydroinfectopyron

Systematischer Name	(4E)-5-(4-methoxy-5-methyl-6-oxo-6H-pyran-2-yl)-3-methylhex-4-ensäure
Beschreibung	weißes Pulver
Biologische Quelle	7961 DiGe <i>Petriella sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	PS7(67-88)
Substanzmenge	13 mg
Molekulargewicht	266 g/mol
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>
HPLC-Retentionszeit	27,706 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> -3,2° (c=1, MeOH)
Zytotoxizität	ED50 [µg/ml] System 0,17 L5178Y 2,30 HeLa >10 PC12

#### Strukturformel



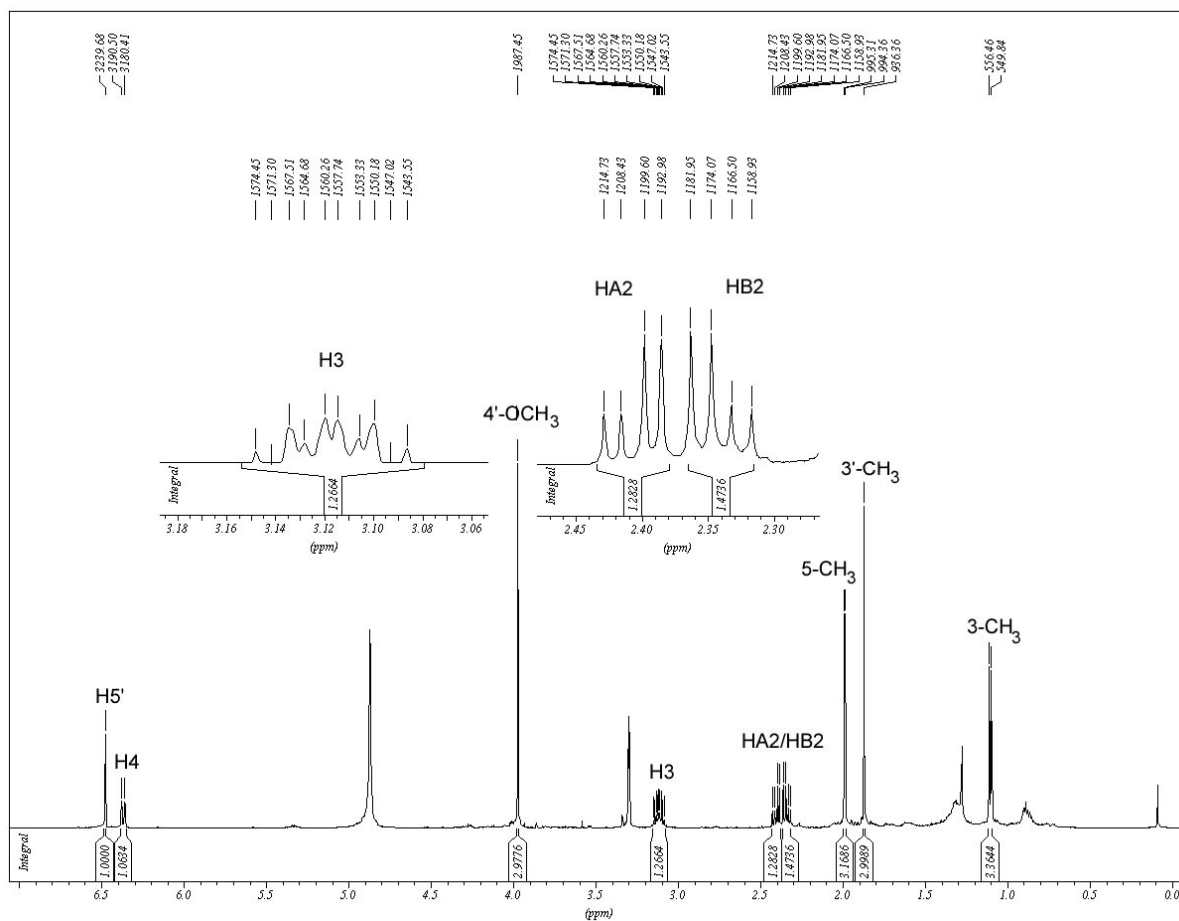
Aus einer ersten kleineren Probe des zytotoxisch aktiven Rohextraktes 7961DiGe aus schwammassoziierten *Petriella* sp., konnte Dihydroinfectopyron als neuer Naturstoff gewonnen werden. Diese Substanz gehört der Verbindungsklasse der  $\alpha$ -Pyrone an und ist das Dihydro-Analogon des bereits bekannten Naturstoffs Infectopyron [Larsen *et al.*, 2003]. Der methanolische Extrakt (1024 mg) wurde fraktioniert mit einer Säulenchromatographie unter Anwendung von Kieselgel als stationärer Phase und einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 95/5 als Fließmittel. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen ermöglichten die Vereinigung chemisch gleicher Fraktionen und deren Minimierung auf 11. Als weißes Pulver wurde Dihydroinfectopyron in Fraktion Nr. 7 aus vorab 22 identischen Fraktionen (67-88) angereichert. Bei der Benennung der Fraktion mit PS7(67-88) wurden der Quellorganismus (P=*Petriella*), das stationäre Trennmateriale (S=Silica gel) und die Fraktionsnummern verwendet. Beim Lauf auf der analytischen HPLC wurde Dihydroinfectopyron bei einer Retentionszeit von 27,7 min detektiert. Das UV-Spektrum zeigte das typische Absorptionsmuster für  $\alpha$ -Pyrone mit einem starken Maximum bei 229,4 nm und einem sehr breiten bei 328,3 nm. Die ESI-MS Untersuchungsergebnisse mit Basispeaks bei 267,1 für das positive Ion  $[M+H]^+$  und 265,5 für das negative Ion  $[M-H]^-$ , ließen auf ein Molekulargewicht von 266 g/mol schließen. Die Untersuchungen mit HR-ESI-MS zeigten ein pseudomolekulares Ion bei 267,1220 entsprechend einer Summenformel von  $C_{14}H_{19}O_5$  für  $[M+H]^+$ . Im zytotoxischen Bioassay wurde an drei proliferierenden Zelllinien dokumentiert, dass Dihydroinfectopyron neben dem Cyclotetrapeptid (vgl. 3.3.1.) für die hohen zytotoxischen Eigenschaften des Extraktes verantwortlich ist. Die  $ED_{50}$ -Werte betragen 0,17  $\mu\text{g/ml}$  an L5178Y-Zellen und 2,30  $\mu\text{g/ml}$  an HeLa-Zellen. Die unempfindlichsten PC12-Zellen wurden noch bei einer Konzentration der Reinsubstanz von über 10  $\mu\text{g/ml}$  zur Hälfte inhibiert. Stereochemische Untersuchungen die sich auf die Messung der optischen Drehung beliefen, ergaben einen negativen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -3,2$ , ( $c=1$ , MeOH). Der Kohlenstoff an Position 3 in der Seitenkette stellt das Chiralitätszentrum des Dihydroinfectopyrons dar. Prototyp dieses neu entdeckten Naturstoffs ist das ehemals aus dem terrestrischen Pilzstamm *Alternaria infectoria* isolierte Analogon Infectopyron [Larsen *et al.*, 2003]. Dieses besitzt eine zusätzliche Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3 und ist somit nicht chiral.

Als Spektrenmaterial zur Strukturaufklärung der Reinsubstanz PS7(67-88), wurden ein Protonenspektrum, ein COSY und ein HMBC in deuteriertem Methanol aufgezeichnet. Die Kernspinresonanzexperimente des Dihydroinfectopyrons zeigten, dass durch die Chiralität die Methylengruppe im Molekül diastereotop ist, wobei die entsprechenden Methyleneprotonen verschiedene chemische Verschiebungswerte ergaben.

**Tab. 3.10:** NMR-Daten für **Dihydroinfectopyron** in CD<sub>3</sub>OD (500 bzw. 125 MHz)

[Proksch P, Ebel R, Riebe F *et al.*, 2008]

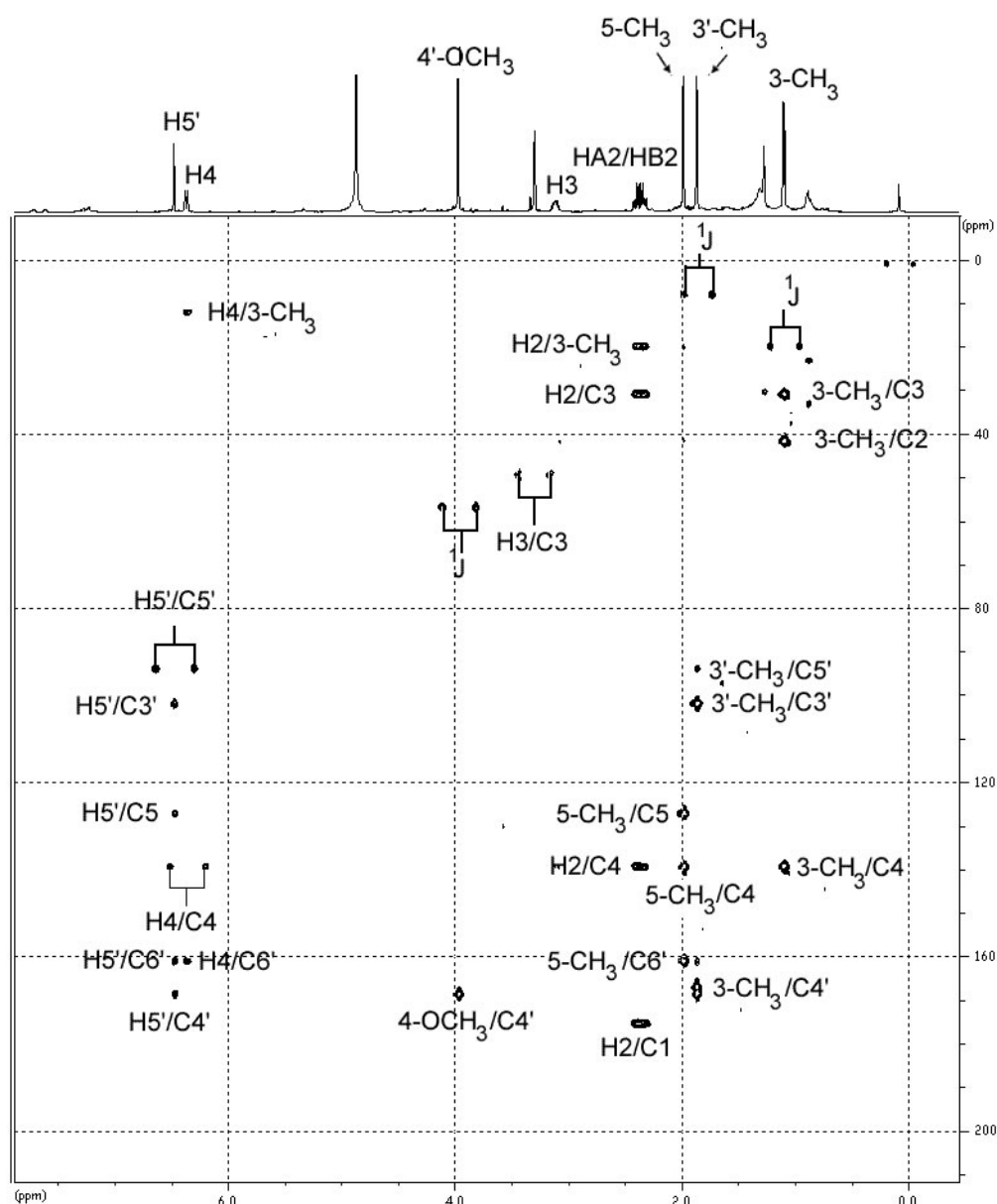
Position	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz])	$\delta_C$ [ppm]	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1		175.5		
2	A 2.42 (dd, 15.3, 6.5) B 2.35 (dd, 15.3, 7.7)	41.8	1, 2, 3, 4, 3-CH <sub>3</sub> 1, 2, 3, 4, 3-CH <sub>3</sub>	B, H3 A, H3
3	3.13 (ddq, 7.7, 6.5, 6.7)	31.2	1, 2, 3, 4, 5, 3-CH <sub>3</sub>	3-CH <sub>3</sub> , H2A/B, H4
4	6.38 (dd, 9.9, 1.3)	139.5	2, 4, 5, 6', 3-CH <sub>3</sub> , 5-CH <sub>3</sub>	5-CH <sub>3</sub> , H3
5		127.1		
2'		167.1		
3'		102.0		
4'		168.7		
5'	6.49 (s)	94.1	5, 3', 4', 5', 6'	
6'		161.2		
3-CH <sub>3</sub>	1.12 (3H, d, 6.7)	20.2	2, 3, 4, 3-CH <sub>3</sub>	H3
5-CH <sub>3</sub>	2.00 (3H, d, 1.3)	12.4	4, 5, 6', 5-CH <sub>3</sub>	H4
3'-CH <sub>3</sub>	1.88 (3H, s)	8.2	2', 3', 4', 3'-CH <sub>3</sub>	
4'-OCH <sub>3</sub>	3.98 (3H, s)	57.0	4', 4'-OCH <sub>3</sub>	



**Abb. 3.16:**  $^1\text{H-NMR}$  von PS7(67-88) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)

Die beiden Protonen der 2-Methylengruppe zeigen gemäß der Diastereotopie unterschiedliche Resonanzwerte bei  $\delta_{\text{H}}$  2.35 ppm und bei  $\delta_{\text{H}}$  2.42 ppm. Die hohe Kopplungskonstante von  $^2\text{J} = 15.3$  Hz steht für die Kopplung dieser beiden Methylenprotonen über zwei Bindungen zueinander. Für die jeweiligen Kopplungen über drei Bindungen zum benachbarten Proton der Position 3 besitzen beide Methylenprotonen unterschiedliche Kopplungskonstanten. Die größere Kopplungskonstante von  $^3\text{J} = 7.7$  Hz des mehr hochfeldverschobenen Methylenprotons  $\text{H}_{\text{B}2}$  drückt aus, dass sich dieses Proton räumlich näher zum benachbarten  $\text{H}_3$  befindet als sein anderer Gruppenpartner. Die Kopplungskonstante für die Kopplung dieses mehr tieffeldverschobenen  $\text{H}_{\text{A}2}$  zum benachbarten  $\text{H}_3$  betrug dagegen nur  $^3\text{J} = 6.5$  Hz. Die alphabetische Differenzierung der beiden Methylenprotonen mit  $\text{H}_{\text{A}}$  und  $\text{H}_{\text{B}}$  ist nomenklatorisch festgelegt, wobei das Proton mit der höheren Resonanz definitionsgemäß die Bezeichnung  $\text{H}_{\text{A}}$  erhält.

Die Multiplizitäten der beiden 2-Methylenprotonen als Doppeldoublets steht für die jeweilige geminale Kopplung zueinander sowie die jeweils vicinale Kopplung zum benachbarten H3. Das H3 bei  $\delta_{\text{H}} = 3.13$  ppm, zeigt eine dritte Kopplung mit der Methylgruppe an gleicher Position über drei Bindungen, was die Kopplungskonstante von  ${}^3\text{J} = 6.7$  Hz symbolisiert. Beide Methylgruppen der Seitenkette treten als Doublets auf, da sie jeweils mit einem weiteren Proton in Nachbarschaft koppeln. Die kleine Kopplungskonstante der 5-Methylgruppe von  ${}^4\text{J} = 1.3$  Hz steht für die Kopplung über vier Bindungen mit dem einzigen olefinischen Proton H4 in der Seitenkette. Für das olefinische Proton H4 bei  $\delta_{\text{H}} 6.38$  ppm, konnte eine weitere Kopplungskonstante von  ${}^3\text{J} = 9.9$  Hz errechnet werden, die für die vicinale Kopplung zum H3 stand. Die chemischen Verschiebungen der beiden Methylgruppen der Seitenkette betragen  $\delta_{\text{H}}$  1.12 ppm für die 3-Methylgruppe und  $\delta_{\text{H}}$  2.00 ppm für die Methylgruppe an Position 5. Sämtliche Protonen des Pyronringes zeigten keinerlei Kopplungen und erscheinen folglich im Protonenspektrum als Singulets. Im aliphatischen Bereich bei  $\delta_{\text{H}}$  1.88 ppm befand sich das Singulett des 3'-Methylsubstituenten des Pyronringes, bei  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm das Singulettsignal des 4'-Methoxysubstituenten und bei  $\delta_{\text{H}}$  6.49 ppm das Singulettsignal des olefinischen Protons H5'.

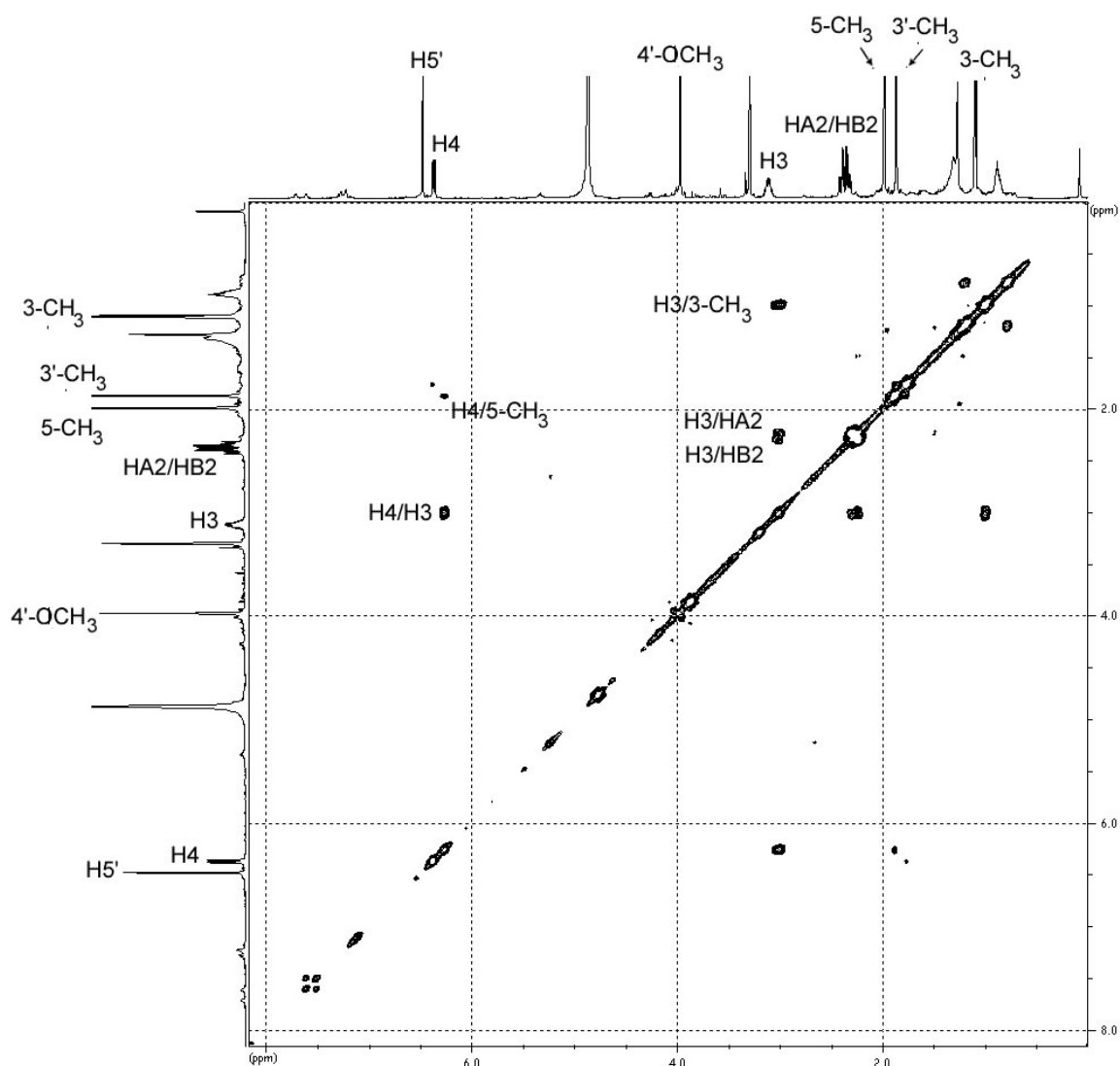


**Abb. 3.17:** HMBC-Spektrum von PS7(67-88) in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Einen weiteren entscheidenden Beitrag zur Strukturaufklärung leisteten einige Korrelationen aus dem HMBC. Bezüglich der Seitenkette lieferten die Korrelationen der 2-Methylenprotonen und des H3 zu einem Kohlenstoff mit der Resonanz von  $\delta_{\text{C}}$  175.5 ppm die Erkenntnis, dass dieser Kohlenstoff am Ende der Seitenkette Bestandteil einer freien Carboxylgruppe sein musste. Korrelationen vom H4 zum C5 bei  $\delta_{\text{C}}$  127.1 ppm und zur 5-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{C}}$  12.4 ppm, ebenso wie die Direktkorrelation zum C4 bei  $\delta_{\text{C}}$  139.5 ppm enthüllten den olefinischen Charakter der Bindung zwischen C4 und C5. Die Korrelationen des olefinischen H4 und der 5-Methylgruppe zum 6'-Kohlenstoff bei  $\delta_{\text{C}}$  161.2 ppm zeigten die Bindung der Seitenkette zum Pyronring.

Einzig weitere Korrelation zu diesem C6` war die vom olefinischen H5` ausgehende. Im Anbetracht des hohen Resonanzwertes des C6` von  $\delta_C$  161.2 ppm und der Beteiligung an einer Doppelbindung handelt es sich bei diesem C6` um ein einfach sauerstoffgebundenes quartäres Kohlenstoffatom. Bezüglich des olefinischen C5` des Pyronringsystems bei  $\delta_C$  94.1 ppm, zeigten sich abgesehen von der Direktkorrelation von H5` ausgehend, keine weiteren Korrelationen zu diesem C5`. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass die am Pyronring substituierte Methylgruppe sich nicht in ortho-Stellung zu diesem olefinischen C5` befinden konnte. Als weitere Korrelationen von H5` ausgehend waren die zum C3`, dem Träger der Methylgruppe und zum C4`, dem Träger der Methoxygruppe. Außerdem zeigte H5` Korrelationen zum quartären C6` und dem quartären C5 der Seitenkette. Die Tatsache, dass die 3`-Methylprotonen die einzigen Korrelationspartner des Carbonylkohlenstoffs bei  $\delta_C$  167.1 ppm waren, legte für diesen die  $\alpha$ -Position zum Pyransauerstoff eindeutig fest. Als weitere Korrelationen der 3`-Methylprotonen fanden sich die zum C3` über zwei Bindungen, zum C4` über drei Bindungen und die Direktkorrelation zum 3`-Methylkohlenstoff. Die 4`-Methoxyprotonen zeigten die Direktkorrelation zum 4`-Methoxykohlenstoff und eine zum C4` über drei Bindungen. Weitere Korrelationen der Seitenkette waren die der beiden Methylenprotonen an Position 2 über zwei Bindungen zum benachbarten C3 sowie über drei Bindungen zum Methylkohlenstoff an Position 3 und zum C4. Auch ein Kreuzsignal für eine Direktkorrelation wurde beobachtet. Für das H3 konnten, abgesehen von der 5-Methylposition, Korrelationen zu alle Kohlenstoffen der Seitenkette, einschließlich der Direktkorrelation, beobachtet werden. Für die 3-Methylprotonen wurden, neben der Direktkorrelation, Signale für Korrelationen zu den Kohlenstoffatomen C2, C3 und C4 gefunden. Analog konnten auch die Korrelationen für die 5-Methylprotonen zu den Kohlenstoffen C4, C5 und C6` im gleichen Abstand beobachtet werden. Das olefinische H4 zeigte Korrelationen über vier Bindungen zu beiden Methylkohlenstoffatomen der Seitenkette sowie zu den Kohlenstoffen C2, C4, C5 und C6`, nicht jedoch zum C3.





**Abb. 3.18:** H,H-COSY von PS7(67-88) in  $\text{CD}_3\text{OD}$

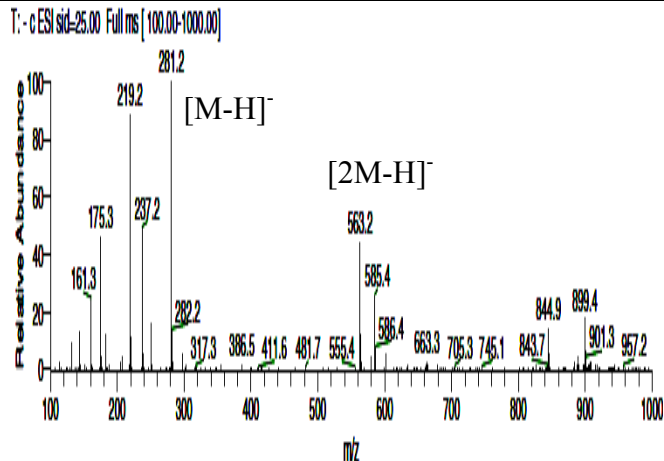
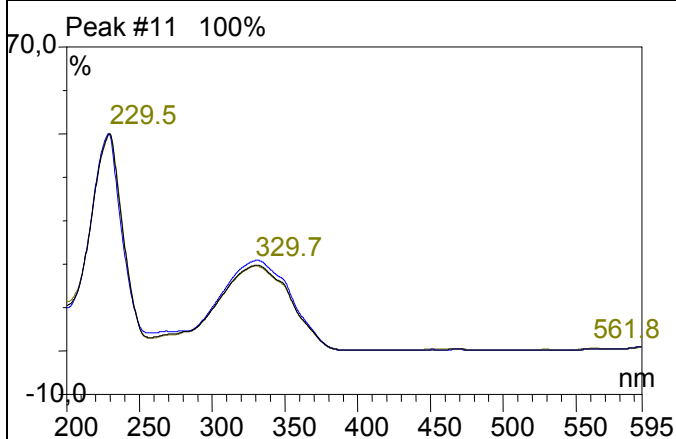
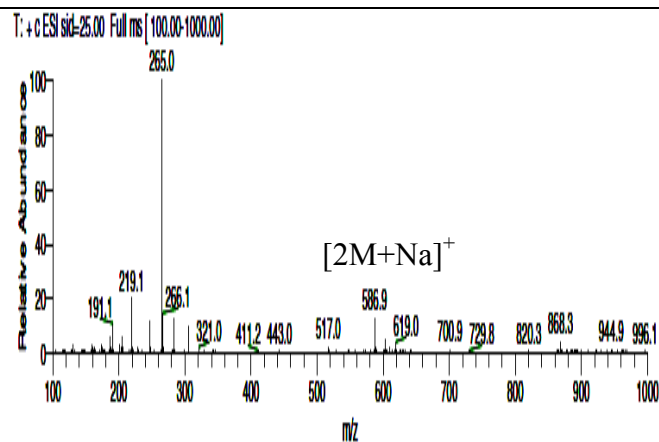
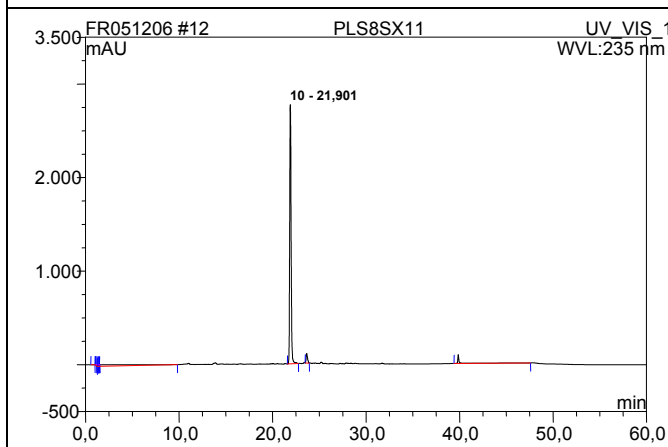
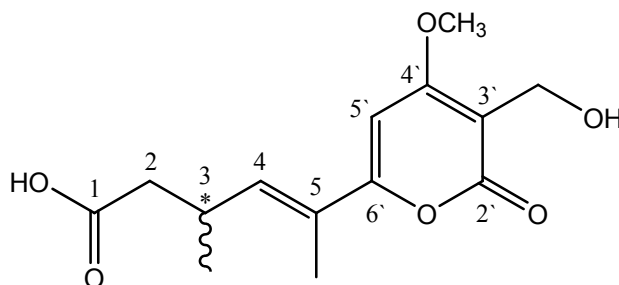
Das COSY-Spektrum zeigt lediglich Kopplungen von Protonen der Seitenkette, da im Pyronring oder übergreifend auf die Seitenkette keine Protonen zu finden sind, die sich im Abstand von vier Bindungen oder näher zueinander befinden. Das Kreuzsignal für die geminale Kopplung der beiden Protonen der diastereotopen Methylengruppe in Position 2 liegt auf der Diagonalen. Insgesamt waren drei vicinale Kopplungen zu erkennen: Zwischen H3 und der 3-Methylgruppe, zwischen dem H3 und den diastereotopen 2-Methylenprotonen und zwischen dem H3 und dem olefinischen Proton H4. Eine long-range Kopplung konnte zwischen dem olefinischen Proton H4 und den 5-Methylprotonen beobachtet werden.

### 3.3.4. 3`-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff)

#### Analytische Daten von 3`-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron

Systematischer Name	(4E)-5-(5-hydroxymethyl)-4-methoxy-6-oxo-6H-pyran-2-yl)-3-methylhex-4-ensäure
Beschreibung	weißes Pulver
Biologische Quelle	7959-7964 DiGe <i>Petriella sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	PLS8SX11
Substanzmenge	76 mg
Molekulargewicht	282 g/mol
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
HPLC-Retentionszeit	21,901 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = -60,6° (c=0.5, MeOH)
Zytotoxizität	84% Wachstum L5178Y

#### Strukturformel

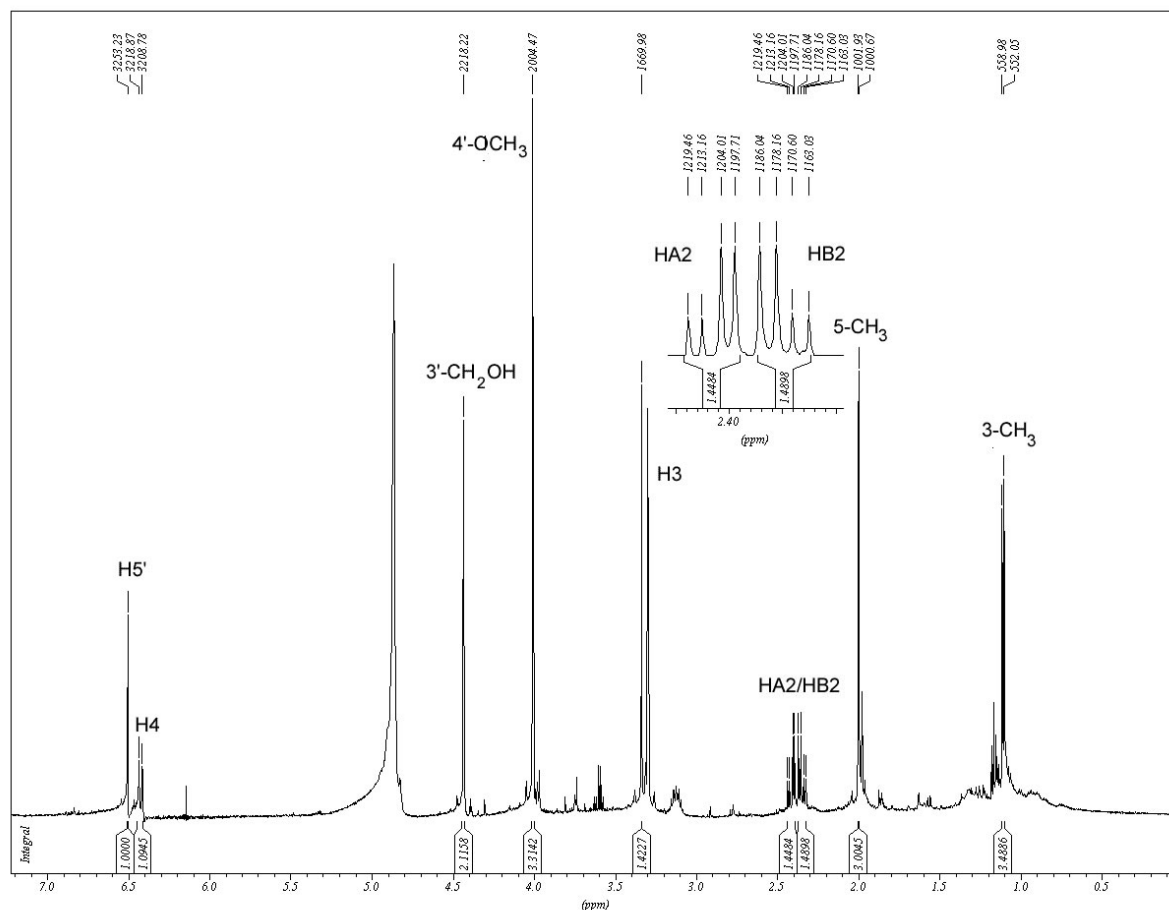


Aus dem methanolischen Extrakt einer Großkultur der beiden zytotoxisch aktivsten Stämmen 7961 und 7962 von *Petriella* sp. konnte ein weiteres Derivat aus der Klasse der Infectopyrone als neuer Naturstoff isoliert werden. Hierbei handelte es sich ebenfalls um ein in Position 2,3 der Seitenkette hydriertes Dihydroanalogon des Infectopyrons. Die chemische Abwandlung gegenüber Dihydroinfectopyron war die Substitution der 3`-Methylgruppe im Pyronring durch eine Hydroxymethylgruppe. Der methanolische Großkulturextrakt (8g) wurde in einem primären Trennschritt unter Anwendung der VLC-Technik chromatographiert (vgl. 2.4.1.). Mit Kieselgel als stationärer Phase wurde dabei in einer Gradientenelution mit 10 verschiedenen Fließmittelsystemen gearbeitet. Von den resultierenden 10 Fraktionen befand sich das hydroxymethylierte Dihydroinfectopyron-Analogon in Fraktion 8 neben einigen Verunreinigungen. Die Aufreinigung dieser Fraktion erfolgte anschließend mittels einer Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 und einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol zu gleichen Teilen. Von den daraus erhaltenen 11 Fraktionen enthielt Fraktion 11 (76 mg) den neuen Naturstoff in Form eines weißen Pulvers. Im Massenspektrometer wurde das positive Ion  $[M+H-H_2O]^+$  bei 265.0 Masseneinheiten detektiert. Im negativen Probenmodus des Massenspektrums erschien ein Basispeak von 281,2 Masseneinheiten für  $[M-H]^-$  und ein weiteres Signal von 563.2 für das dimere Ion  $[2M-H]^-$ . Im Vergleich zum Dihydroinfectopyron war das Molekulargewicht dieses Analogons um 16 Masseneinheiten höher, was auf ein zusätzliches Sauerstoffatom im Molekül hinwies. Die Messungen im HR-ESIMS bestätigten diesen Sachverhalt und zeigten ein pseudomolekulares Ion bei  $m/z = 283,1170$  entsprechend einer Summenformel von  $C_{14}H_{19}O_6$  für  $[M+H]^+$  (berechnet zu 283,1176). Die auf der RP-18 Säule der analytischen HPLC beobachtete Retentionszeit von 21,9 min war um etwa 6 min geringer als beim Dihydroinfectopyron mit 27,7 min. Grund für die frühere Elution von der RP-18 Säule war die höhere Polarität des hydroxymethylierten Derivates. Die anschließende UV-Detektion zeichnete das typische Absorbtionsmuster für  $\alpha$ -Pyronsysteme auf mit Maxima bei 229,5 nm und 329,7 nm. In Analogie zum Dihydroinfectopyron besaß auch das hydroxymethylierte Derivat an der gleichen Position in der Seitenkette ein Chiralitätszentrum. Polarimetrische Untersuchungen ergaben auch hier einen negativen Drehsinn ( $[\alpha]_D^{20} = -60,6^\circ$ ,  $c = 0.5$ , MeOH). Zur Strukturaufklärung wurden ein Protonenspektrum und ein HMBC von der Reinsubstanz PLS8SX11 in deuteriertem Methanol aufgenommen.

**Tab. 3.11:** NMR-Daten für **3'-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron**in CD<sub>3</sub>OD (500 bzw. 125 MHz)[Proksch P, Ebel R, Riebe F *et al.*, 2008]

Position	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz] )	$\delta_C$ [ppm]	HMBC (H→C)
1		175.5	
2	A 2.43 (dd, 15.3, 6.4) B 2.36 (dd, 15.3, 7.8)	41.9	1, <b>2</b> , 3, 4, 3-CH <sub>3</sub> 1, <b>2</b> , 3, 4, 3-CH <sub>3</sub>
3	3.14 (ddq, 7.8, 6.4, 6.7)	31.3	1, 2, <b>3</b> , 4, 5, 3-CH <sub>3</sub>
4	6.43 (dd, 9.9, 1.4)	140.7	2, 3, <b>4</b> , 5, 6', 3-CH <sub>3</sub> , 5-CH <sub>3</sub>
5		127.3	
2'		166.3	
3'		105.0	
4'		170.5	
5'	6.51 (s)	94.2	5, 3', 4', <b>5'</b> , 6'
6'		163.5	
3-CH <sub>3</sub>	1.12 (3H, d, 6.7)	20.1	2, 3, 4, <b>3-CH<sub>3</sub></b>
5-CH <sub>3</sub>	2.01 (3H, d, 1.4)	12.4	4, 5, 6'
3'-CH <sub>2</sub> OH	4.44 (2H, s)	53.8	2', 3', 4', <b>3'-CH<sub>2</sub>OH</b>
4'-OCH <sub>3</sub>	4.02 (3H, s)	57.3	4', <b>4'-OCH<sub>3</sub></b>

In beiden Experimenten zeigten die Messdaten eine nahezu völlige Übereinstimmung mit denen des Dihydroinfectopyrons (vgl. 3.3.3.).



**Abb. 3.19:**  $^1\text{H-NMR}$  von PLS8SX11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)

Die Substitution im Pyronring zeigte sich im Protonenspektrum durch das fehlende Singulett für eine 3`-Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  1.88 ppm und stattdessen dem zusätzlichen Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  4.44 ppm mit einem Peakflächenintegral von 2H für die 3`-Hydroxymethylengruppe. Auch die chemische Verschiebung für das tragende Kohlenstoffatom an Position 3` belief sich nicht mehr wie beim Dihydroinfectopyron auf  $\delta_{\text{C}}$  8.2 ppm sondern betrug hier  $\delta_{\text{C}}$  53.8 ppm. Das HMBC zeigte die gleichen Korrelationen wie beim Dihydroinfectopyron (vgl. Abb. 3.18 und Tab. 3.10).

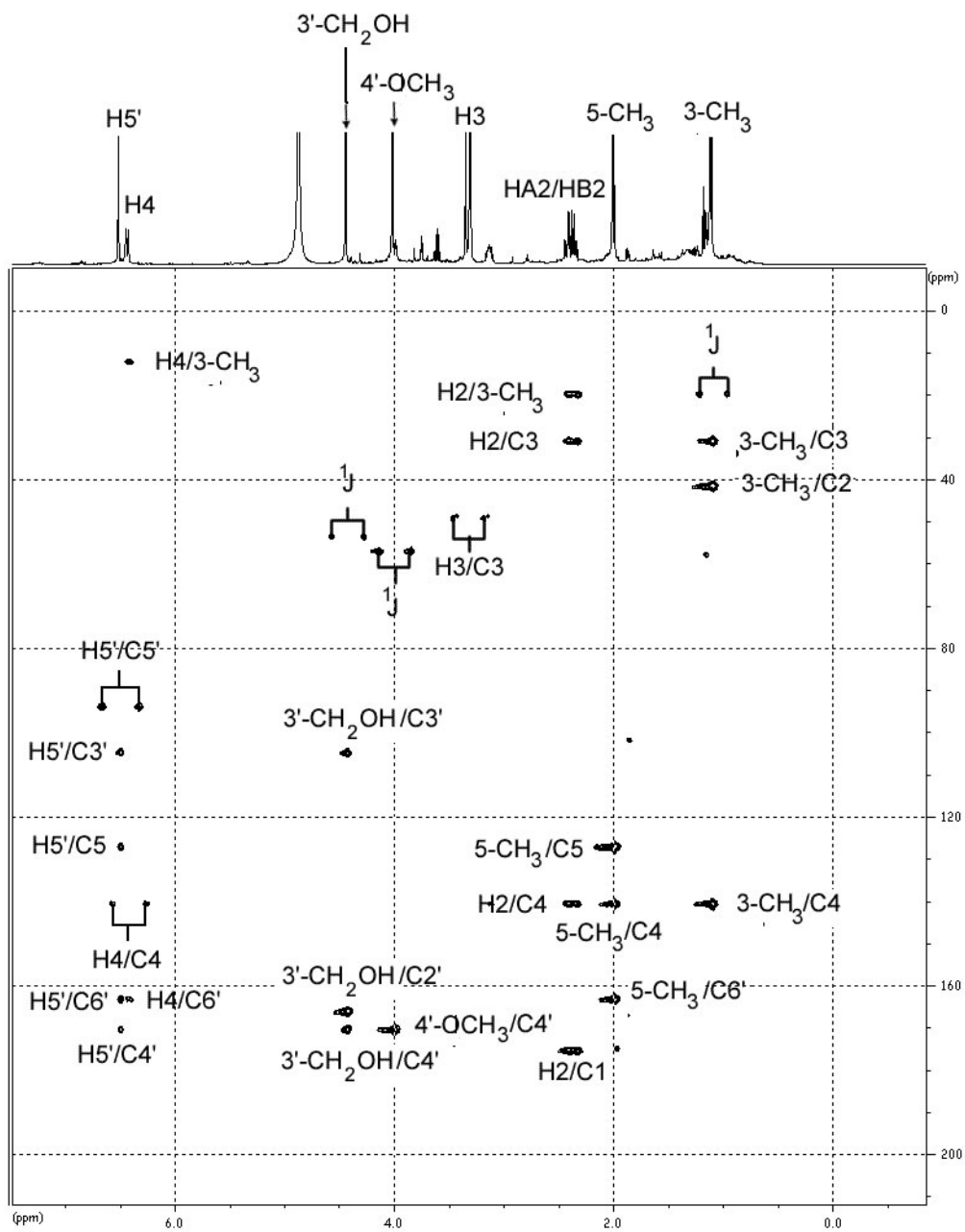


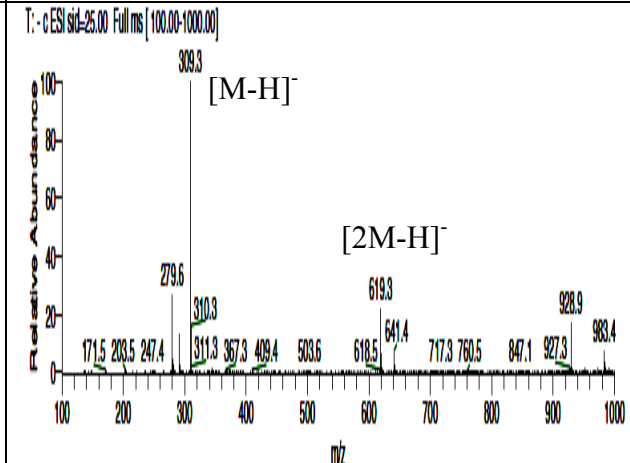
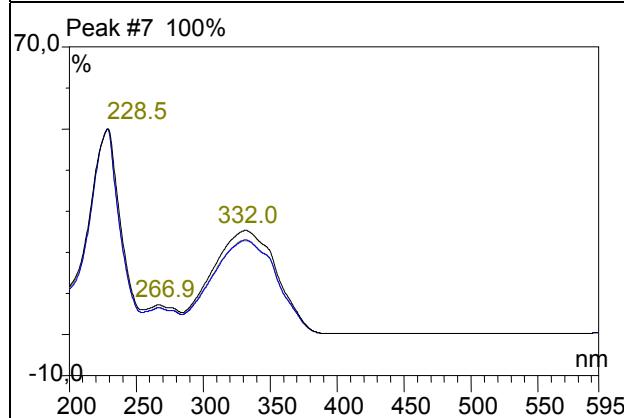
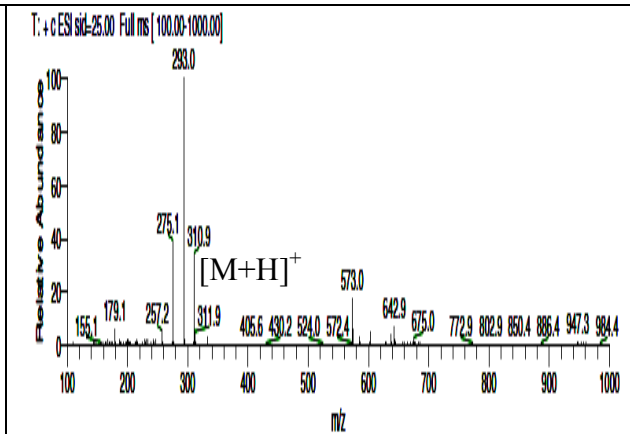
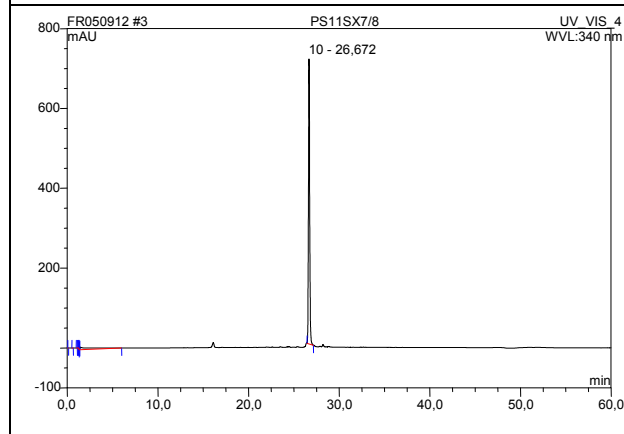
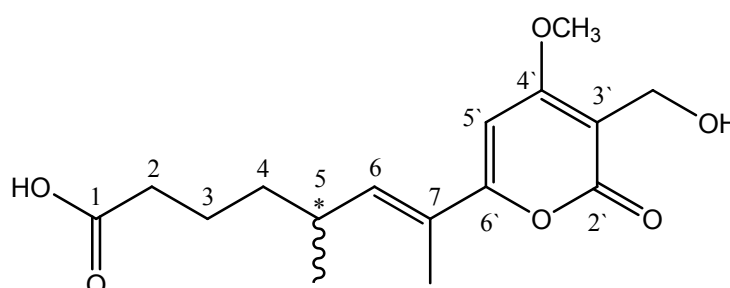
Abb. 3.20: HMBC-Spektrum von PLS8SX11 in CD<sub>3</sub>OD

### 3.3.5. Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron (neuer Naturstoff)

#### Analytische Daten von Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron

Systematischer Name	(6E)-7-(5-(hydroxymethyl)-4-methoxy-6-oxo-6H-pyran-2-yl)-5-methyloct-6-ensäure
Beschreibung	gelbgrünes Pulver
Biologische Quelle	7961 DiGe <i>Petriella sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	PS11SX7/8
Substanzmenge	3 mg
Molekulargewicht	310 g/mol
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>
HPLC-Retentionszeit	26,671 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = -17° (c=0.1, MeOH)
Zytotoxizität	54,1% Wachstum L5178Y

#### Strukturformel



Ein weiterer neuer Naturstoff aus der Klasse der Infectopyrone wurde wie das Dihydroinfectopyron aus demselben Extrakt und im Zuge desselben Isolierungsweges gewonnen. Bei diesem Derivat waren im Bezug auf Dihydroinfectopyron sowohl Veränderungen im Pyronring als auch in der Seitenkette erkennbar. Im Pyronring war wiederum die 3`-Methylgruppe durch eine Hydroxymethylengruppe substituiert (vgl. 3.3.4.). Zusätzlich war die saure Seitenkette um zwei Methylenheiten verlängert, so dass es sich hierbei um ein homologes Dihydroinfectopyron handelte. Nomenklatorisch wird dies durch den Präfix Dihomo- kenntlich gemacht. Zusammengefasst erhielt dieses neue Pyron-Analogon dann die Bezeichnung Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron. Dieses wurde isoliert aus dem methanolischen Extrakt der *Petriella*-Stammkultur Nr. 7961, die auf Dinkel-Gerste-Getreidemedium angezchtet wurde. Der Extrakt (1024 mg) wurde über eine Säule aus Kieselgel mit DCM/MeOH (95:5) chromatographiert. Aus den daraus resultierenden 11 Fraktionen befand sich neben einigen Verunreinigungen in der letzten Fraktion Nr. 11 neben einigen Verunreinigungen dieses homologe Dihydroinfectopyronderivat. Zur Aufreinigung wurde die Fraktion 11 weiter säulenchromatographisch mit Sephadex LH-20 und einem Fließmittelgemisch zu gleichen Teilen aus Dichlormethan und Methanol verarbeitet. Das homologe Analogon wurde in den Fraktionen 7 und 8 angereichert (3 mg) und zeigte sich als gelbgrünes grobkörniges Pulver. Das Chromatogramm der analytischen HPLC zeigte eine Retentionszeit von 26,7 min und wieder die typischen Absorbptionsmaxima bei 228,5 nm, 266,9 nm und 332,0 nm. Massenspektrometrische Analyse zeigte im ESI-Positivmodus einen Basispeak von 310,9 amu für  $[M+H]^+$  und im negativen Probenmodus einen Basispeak von 309,3 Masseneinheiten für  $[M-H]^-$ . Desweiteren konnten im Negativmodus ein Peak von 619,3 amu für ein Dimer  $[2M-H]^-$  und von 928,8 amu für ein Trimer  $[3M-H]^-$  beobachtet werden. Das Molekulargewicht von 310 g/mol war um 44 Masseneinheiten höher im Vergleich zum Dihydroinfectopyron. Hierbei entfielen 16 amu auf den zusätzlichen Sauerstoff am Pyronring und 28 amu auf zwei zusätzliche Methylenheiten in der Seitenkette. Das Chiralitätszentrum befand sich analog zum Dihydroinfectopyron im gleichen Abstand zum Pyronring. Die polarimetrische Messung ergab einen negativen Drehsinn von  $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  (c = 0.1, MeOH). Zur Strukturbestimmung wurde ein Protonenspektrum, COSY und HMBC herangezogen.



**Tab. 3.12:** NMR-Daten für **Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron**  
in CD<sub>3</sub>OD (500 bzw. 125 MHz)  
[Proksch P, Ebel R, Riebe F *et al.*, 2008]

Position	$\delta_H$ [ppm] (mult., J [Hz])	$\delta_C$ [ppm]	HMBC (H→C)
1		177.2	
2	2.25-2.30 (2H, m)	34.7	1, 3, 4
3	1.55-1.61 (2H, m)	23.8	1, 2, 4
4	A 1.47-1.52 (m) B 1.36-1.43 (m)	37.4	2, 3 2, 3
5	2.60-2.72 (1H, m)	33.9	
6	6.41 (dd, 10.0, 1.2)	142.7	6`
7		126.8	
2`		166.3	
3`		104.7	
4`		170.6	
5`	6.50 (s)	93.7	7, 3`, 4`, 5`, 6`
6`		163.5	
5-CH <sub>3</sub>	1.06 (3H, d, 6.7)	20.3	4, 5, 6, 5-CH <sub>3</sub>
7-CH <sub>3</sub>	1.99 (3H, d, 1.2)	12.5	6, 7, 6`
3`-CH <sub>2</sub> OH	4.45 (2H, s)	53.8	2`, 3`, 4`, 3`-CH <sub>2</sub>
4`-OCH <sub>3</sub>	4.02 (3H, s)	57.2	4`, 4`-OCH <sub>3</sub>

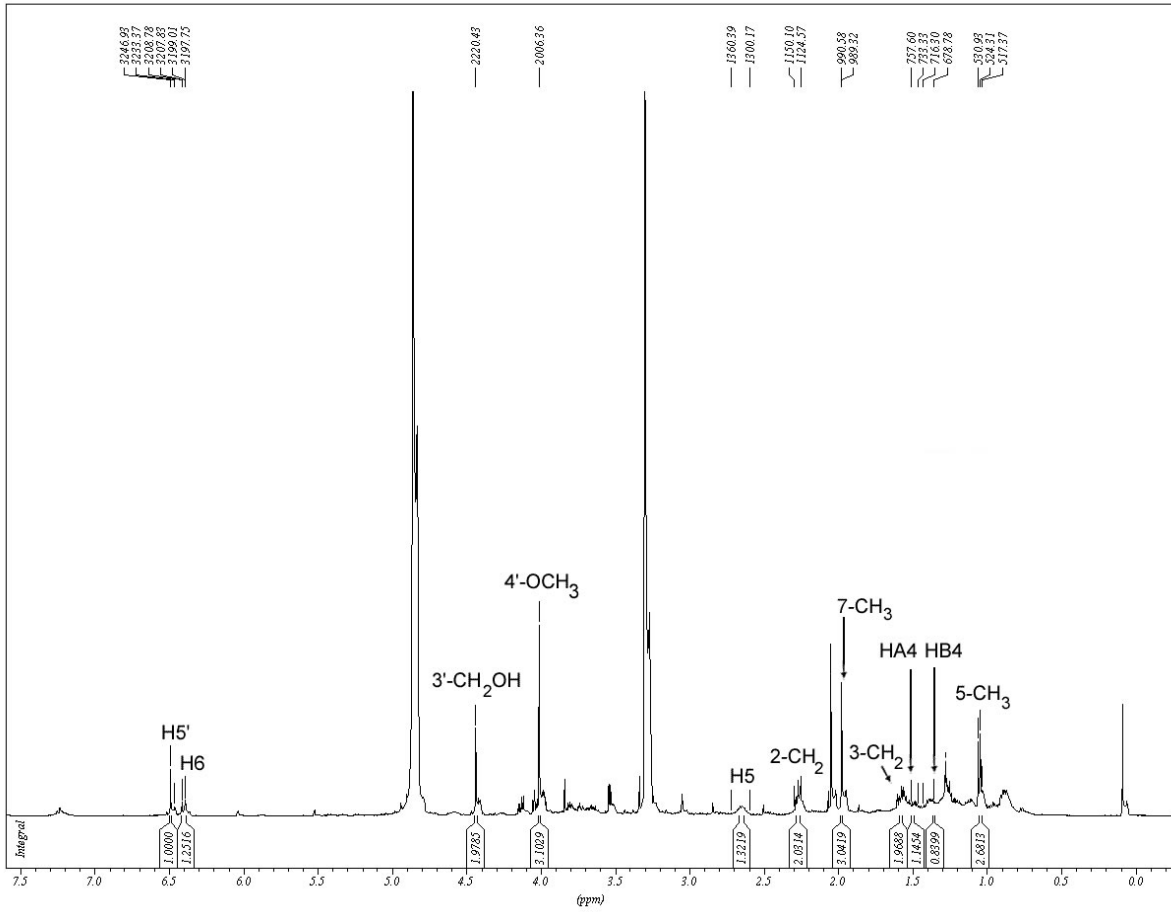
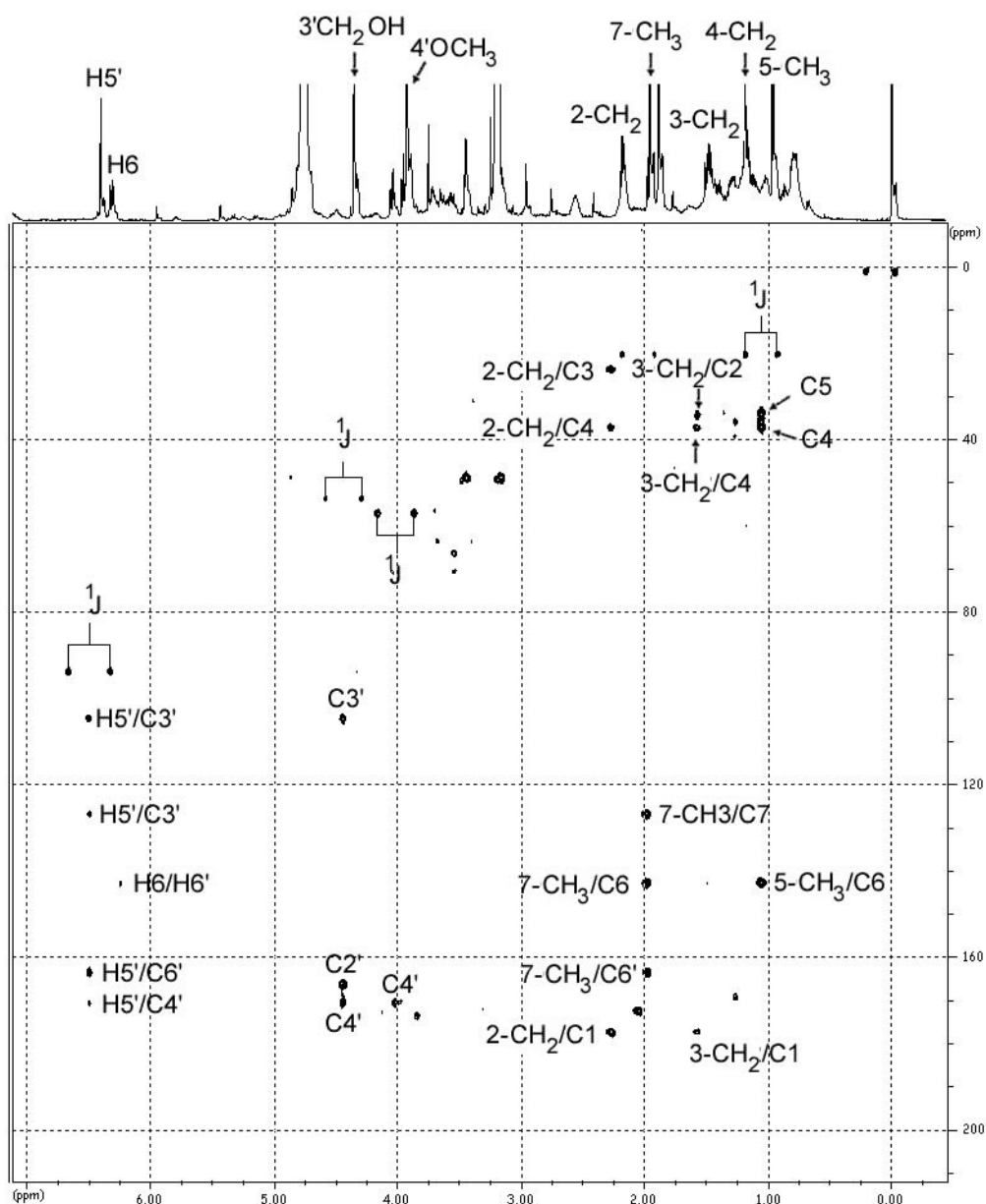


Abb. 3.21: <sup>1</sup>H-NMR von PS11SX7/8 in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz)

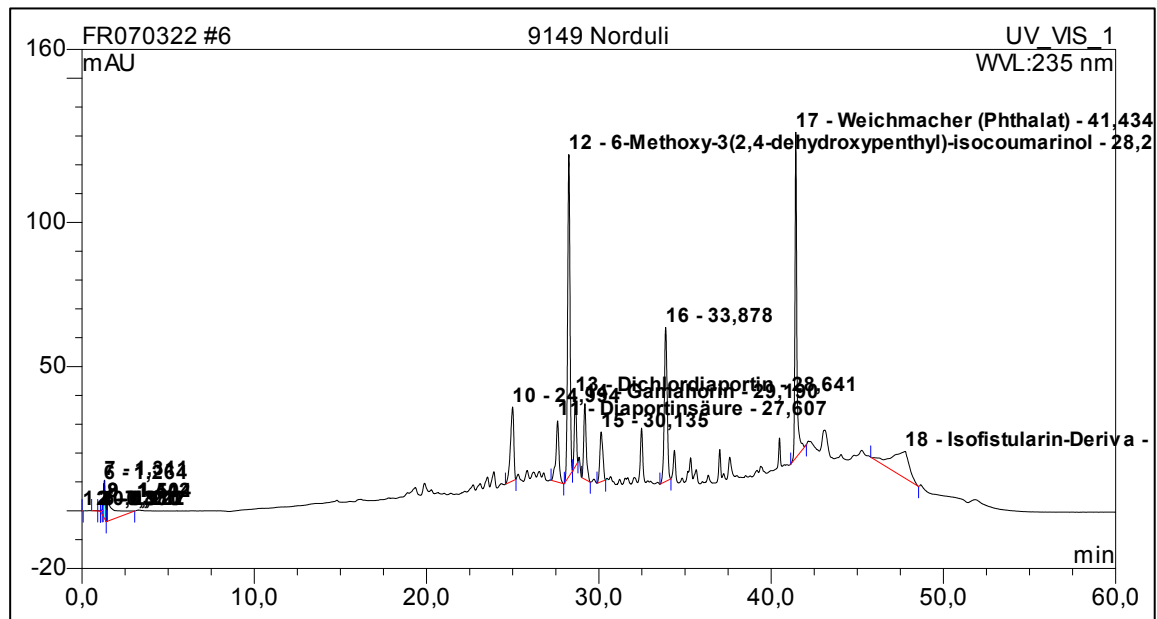


**Abb. 3.22:** HMBC-Spektrum von PS11SX7/8 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Die Protonenverschiebungen der drei Methylengruppen in der Seitenkette zeigten sich als Multipletts in Resonanzintervallen. Ausgehend vom terminalen Carbonsäureende waren die Protonenresonanzen der 2-Methylengruppe in einem Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  2.25-2.30 ppm lokalisiert. Diese Protonen zeigten im HMBC Korrelationen zum C-1, dem Carboxy-Kohlenstoff bei  $\delta_{\text{C}}$  177,2 ppm sowie zu den beiden benachbarten Methylengruppen C-3 und C-4 in Richtung Pyronring. Die Resonanzen der Protonen aus der 3-Methylengruppe lagen wegen der größeren Entfernung zur Carboxylgruppe weiter hochfeld zwischen  $\delta_{\text{H}}$  1.55-1.61 ppm.

Für die 3-Methylprotonen zeigte das HMBC die Korrelation über drei Bindungen zum Carboxyl-Kohlenstoff sowie jeweils beidseitig zu den benachbarten Methylenkohlenstoffen C2 und C4 über zwei Bindungen. Die beiden Protonen der 4-Methylengruppe zeigten jeweils unterschiedlich hohe Resonanzwerte. Das tieffeldverschobene  $H_{A4}$  im Intervall von  $\delta_H$  1.47-1.52 ppm und das  $H_{B4}$  im höheren Feld bei  $\delta_H$  1.36-1.43 ppm. Von den beiden 4-Methylprotonen waren nur Korrelationen zu den beiden benachbarten Methylengruppen C2 und C3 in Richtung Carboxyterminalem Ende erkennbar. Das Proton H5 am Chiralitätszentrum befand sich als Multiplett im Bereich von  $\delta_H$  2.60-2.72 ppm und zeigte im HMBC keine Korrelationen. Das olefinische Proton H6 ergab ein doppeltes Dublett bei  $\delta_H$  6.41 ppm und zeigte eine Korrelation zum C6' des Pyronringes. Eine Korrelation vom Pyronring zum quartären C7 Seitenkette zeigte das olefinische H5' über drei Bindungen. Neben seiner Direktkorrelation zum C5' korrelierte das H5' über zwei Bindungen mit den benachbarten C6' und C4' im Pyronringes sowie über drei Bindungen mit C3'. Die Tatsache, dass die Protonen der 3'-Hydroxymethylengruppe die einzigen waren, die eine Korrelation zum 2'-Carbonylkohlenstoffatom zeigten, legt die Nachbarschaft beider Gruppierungen fest. Die Methylenprotonen der 3'-Hydroxymethylengruppe korrelierten außerdem noch über zwei Bindungen mit C3' und über drei Bindungen mit C4'. Im Protonenspektrum zeigte sich die Hydroxymethylensignal als Singulett bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_H$  4.45 ppm. Die Protonen der 5-Methylgruppe ergaben im Protonenspektrum ein Dublett bei  $\delta_H$  1.06 ppm. Im HMBC zeigten sie neben der Direktkorrelation auch eine Korrelation zum chiralen Kohlenstoff C5 über zwei Bindungen sowie über drei Bindungen zum olefinischen C6 und zum Methylenkohlenstoff C4. Die Protonen der 7-Methylgruppe erschienen im Protonenspektrum ebenfalls als Dublett bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_H$  1.99 ppm. Das HMBC zeigte Korrelationen über zwei Bindungen zum quartären olefinischen C7 sowie über drei Bindungen zum olefinischen C6 und zum quartären C6' des Pyronringes.

### 3.4. Inhaltsstoffe aus *Nodulisporium sp.*



**Abb. 3.23:** HPLC vom Rohextrakt 9149 DG aus *Nodulisporium sp.*

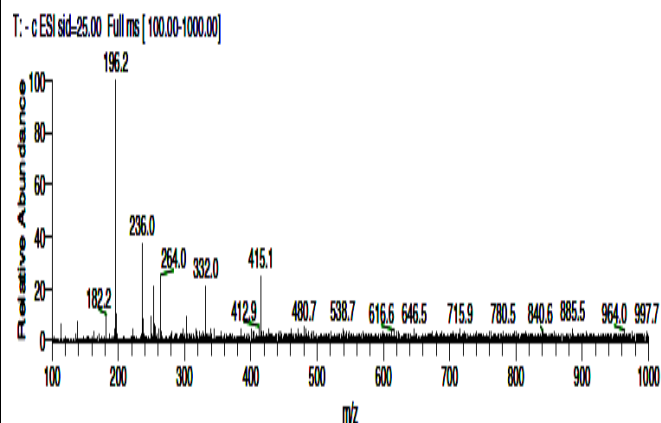
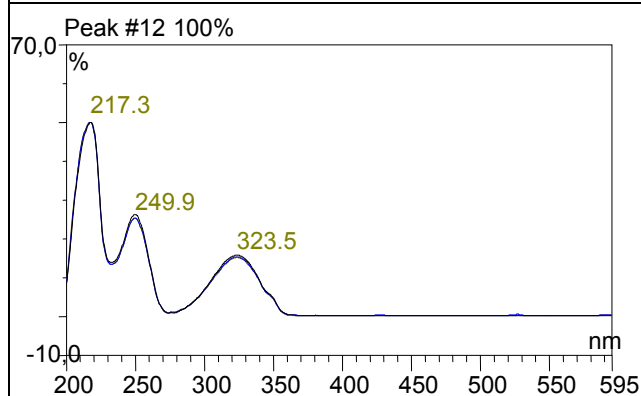
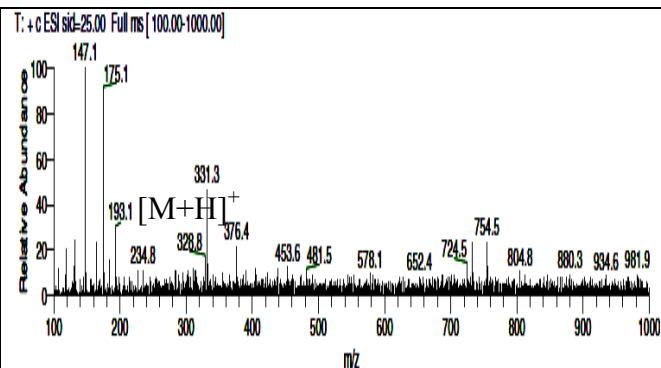
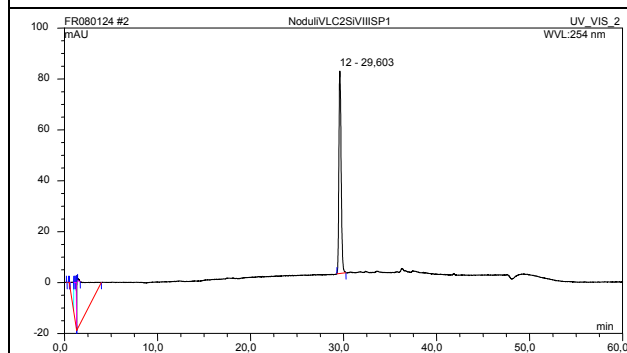
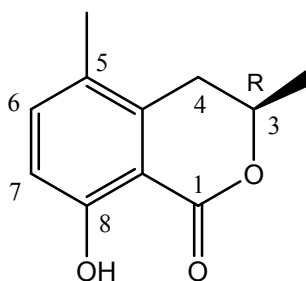
Der Rohextrakt aus Stammkulturen von *Nodulisporium sp.*, die aus *Suberites domuncula* isoliert wurden, erwies sich nach dem Lauf auf der analytischen HPLC als chemisch sehr interessant und wurde daraufhin in als Großansatz reproduziert. Das vorliegende HPLC-Chromatogramm (vgl. Abb. 3.24) lieferte bereits erste Hinweise auf ein potentielles Vorhandensein von Isocoumarin-Derivaten.

### 3.4.1. 5-Methylmellein

#### Analytische Daten von 5-Methylmellein

Systematischer Name	(3R)-8-Hydroxy-3,5-dimethyl-3,4-dihydroisocumarin
Beschreibung	weißes Pulver
Biologische Quelle	9149 DiGe <i>Nodulisporium sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	NV2K8SP1/3
Substanzmenge	1 mg
Molekulargewicht	192 g/mol
Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
HPLC-Retentionszeit	29,609 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> - 98° (c=0.1, CHCl <sub>3</sub> )
Literaturwert	[α] <sub>D</sub> <sup>21</sup> -115° (CHCl <sub>3</sub> ) [De Alvarenga <i>et al.</i> , 2003]

Strukturformel

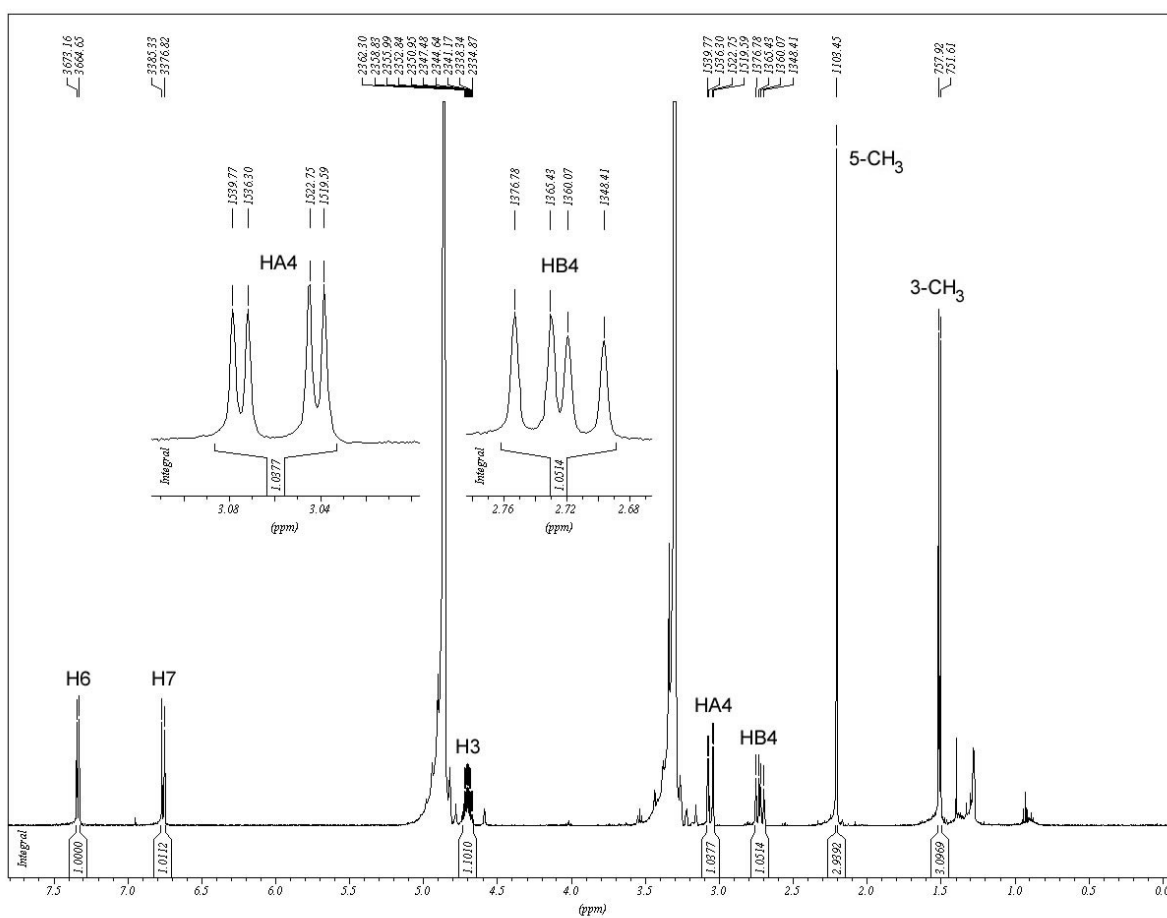


Aus dem Extrakt 9149 DiGe, angefertigt aus Stammkulturen von marinen *Nodulisporium* sp., wurde die Substanz 5-Methylmellein in drei Trennstufen isoliert. Hierbei handelt es sich um ein trisubstituiertes Dihydroisocumarin-Derivat mit der für diese Stoffklasse typischen Esterpartialstruktur. Zur primären Auftrennung des Rohextraktes wurde eine VLC-Säule (vgl. 2.4.1.) mit Kieselgel als stationäre Phase durchgeführt. In einer Gradientenelution wurden 10 verschiedene Fließmittelsysteme nach aufsteigender Polarität eingesetzt. Die aus dieser Trennung resultierende zweite Fraktion (NVLC2), eluiert durch ein Gemisch aus Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 75/25, wurde anschließend über eine Säule aus Kieselgel weiter aufgetrennt. Die daraus gewonnene achte Fraktion NVLC2KG8(34-44) mit einer Ausbeute von 187 mg, wurde dann nochmals aufgereinigt. In einem dritten Isolierungsschritt wurde mit Hilfe der semipräparativen HPLC das 5-Methylmellein in einer Ausbeute von 1 mg gewonnen. Die Reinsubstanz NVLC2KG8(34-44)SP1/3 hatte eine weiße, pulvrige Konsistenz. Auf der analytischen HPLC betrug die Retentionszeit 29,6 min und das UV-Spektrum zeigte das für Isocumarin-Grundkörper typische Absorptionsmuster. Eine hohe Absorption fand sich bei 217,3 nm, gefolgt von einem abgeschwächten mittelgroßen Maximum bei 249,9 nm und ein kleines Maximum bei 323,5 nm. Im Massenspektrum wurde nur eine positive Ionisierung beobachtet. Der Basispeak zeigte 193,1 Masseneinheiten für das positive Ion  $[M+H]^+$ , was auf das geringe Molekulargewicht von nur 192 g/mol schließen ließ. Als Spektrenmaterial zur Strukturaufklärung wurde zunächst ein Protonenspektrum in deuteriertem Methanol aufgezeichnet. Zur genaueren Strukturaufklärung wurden später nochmals Messungen in DMSO am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig vorgenommen. Die erneute Aufzeichnung des Protonenspektrums erfolgte auf Spektrometern vom Typ DFX-300 und die durchgeführten 2D-Experimente wie COSY und HMBC erfolgten auf einem DMX-600. Die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Kohlenstoffatome wurden durch graphische Extrapolation aus dem HMBC entnommen. Die Literaturwerte der Protonenresonanzen für 5-Methylmellein [De Alvarenga *et al.*, 1978] waren in der Tau-Skala angegeben und mussten zum Zweck der Gegenüberstellung in die Einheit  $\delta_H$  [ppm] nach folgender Formel umgerechnet werden:

$$\tau = (10 + \delta) \text{ ppm}$$

**Tab. 3.13:**  $^1\text{H-NMR}$ -Daten für **5-Methylmellein** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)

Position	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (Mult., J [Hz]) $\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (Mult., J [Hz]) <sup>1</sup> DMSO
3	4.67-4.72 (ddq, 11.4, 6.3, 3.5)	4.5-4.9 (m)
3- $\text{CH}_3$	1.52 (d, 6.3, 3H)	1.58 (d, 6.0, 3H)
$\text{H}_{\text{eq-4}}$	A 3.04 (dd, 16.7, 3.5)	A 3.00 (dd, 16.0, 4.0)
$\text{H}_{\text{ax-4}}$	B 2.72 (dd, 16.7, 11.5)	B 2.72 (dd, 16.0, 10.5)
5- $\text{CH}_3$	2.21 (s, 3H)	2.21 (s, 3H)
6	7.32 (d, 8.5)	7.25 (d, 8.0)
7	6.77 (d, 8.5)	6.84 (d, 8.0)
8-OH		11.02 (s)

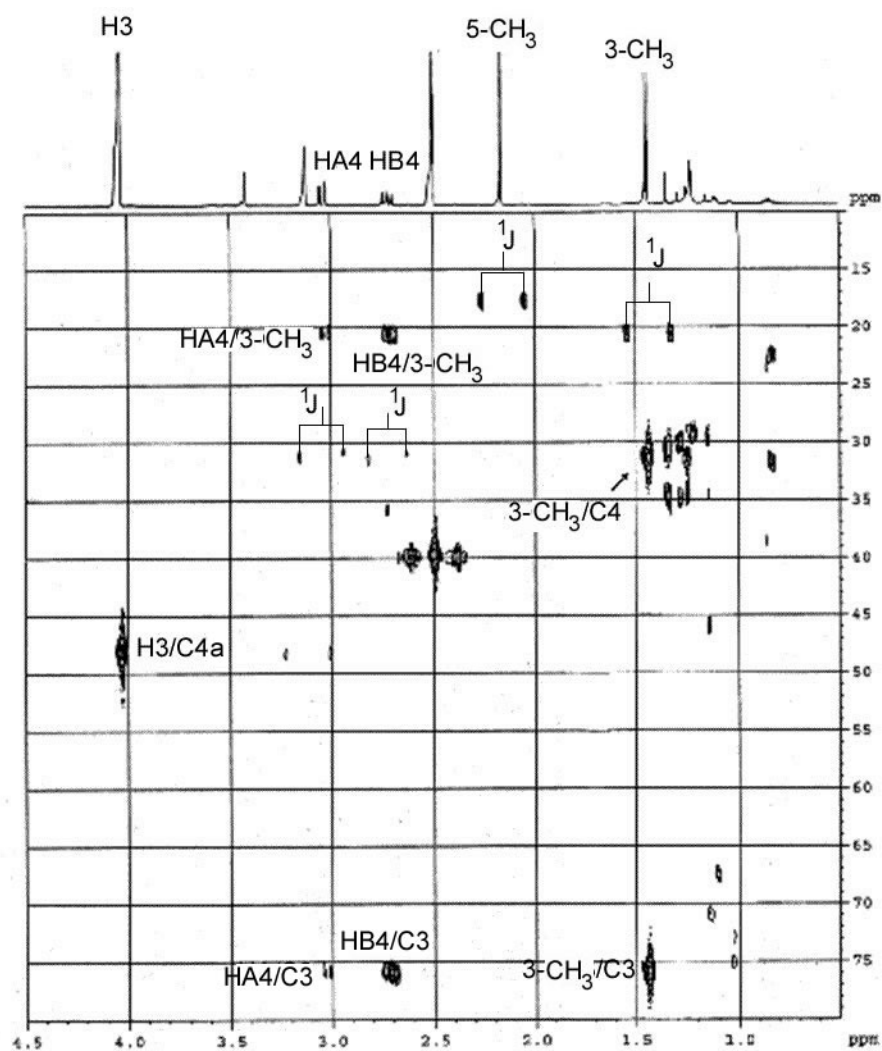
<sup>1</sup>De Alvarenga *et al.*, 1978**Abb. 3.24:**  $^1\text{H-NMR}$  von NV2K8SP1/3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz)



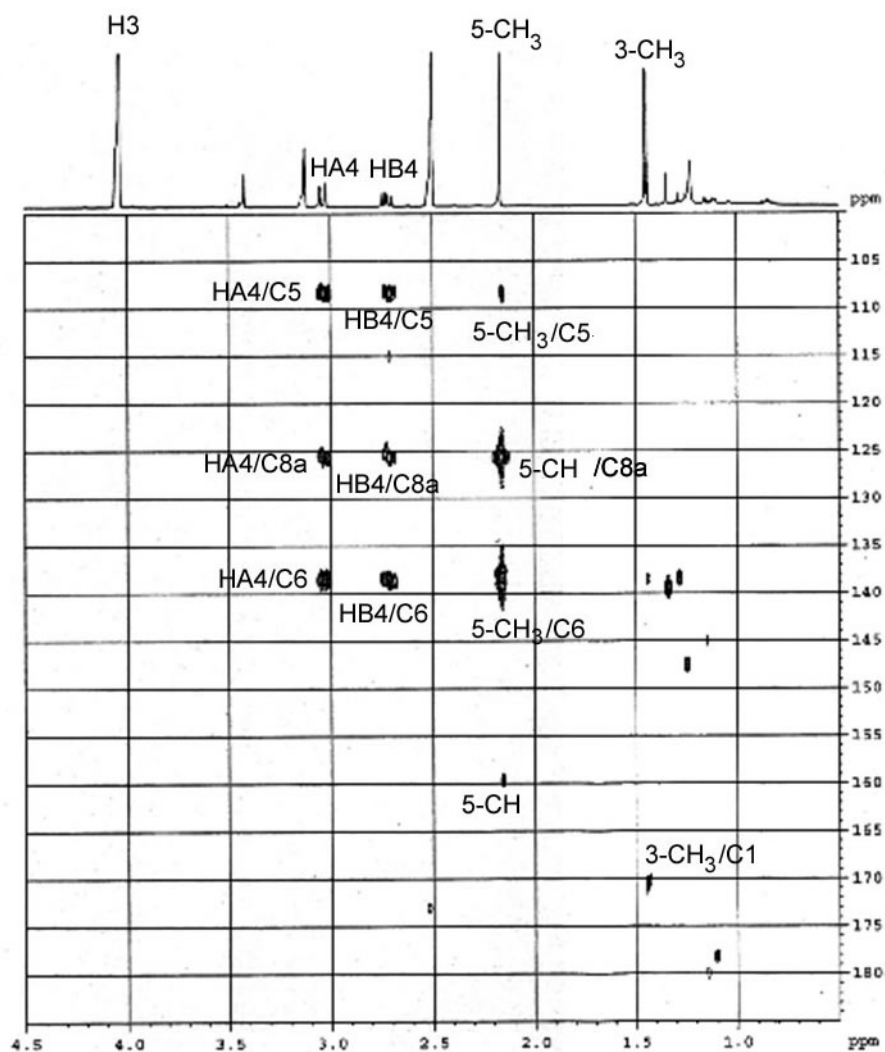
In der aliphatischen Region des Protonenspektrums lag die Resonanz der 3-Methylgruppe als Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  1.52 ppm im höchsten Feld. Die Kopplungskonstante von 6.3 Hz stand für die vicinale Kopplung zum benachbarten H3 am chiralen Kohlenstoff. Dieses H3 zeigte sich in einem Resonanzintervall bei  $\delta_{\text{H}}$  4.67-4.72 ppm als komplexes Multiplettsignal. Diese hohe chemische Verschiebung basierte auf die Nachbarschaft zu dem Sauerstoffatom der Lactonpartialstruktur. Das H3 zeigte neben der vicinale Kopplung zu den 3-Methylprotonen noch zwei weitere vom vicinalen Typ mit den beiden Protonen der benachbarten diastereotopen Methylengruppe an Position 4. Diese beiden 4-Methylenprotonen erschienen als doppelte Dubletts mit Resonanzsignale bei  $\delta_{\text{H}}$  2.72 ppm für H<sub>B</sub> und  $\delta_{\text{H}}$  3.04 ppm für H<sub>A</sub> im tieferen Feld. Die hohe Kopplungskonstante für die gegenseitige geminale Kopplung wurde zu  $^2J = 16.7$  Hz berechnet. Als Folge der Diastereotopie zeigten beide 4-Methylenprotonen für ihre jeweilige dreibindige Kopplung zum Proton H3 die große Differenz von 8 Hz bezüglich ihrer Kopplungskonstanten. Die kleinere ( $^3J_{\text{cis}} = 3.5$  Hz) ergab sich für das mehr tieffeldverschobene Methylenproton H<sub>A</sub>4 und deutet an, dass es in Bezug auf das Proton H3 am chiralen Zentrum cis-ständig ist. Das andere Proton H<sub>B</sub>4 ist zum chiralen H3 trans-orientiert, was die hohe gemeinsame Kopplungskonstante von  $^3J_{\text{trans}} = 11.5$  Hz erkennen lässt. Die 5-Methylgruppe am aromatischen System zeigte als Singulettsignal bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}}$  2.21 ppm keine Kopplungen. Im aromatischen Bereich lagen die Resonanzen für die beiden ortho-ständigen Protonen jeweils als Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  6.77 ppm für H7 und bei  $\delta_{\text{H}}$  7.32 ppm für H6. Die ermittelte gemeinsame Kopplungskonstante ( $^3J_{\text{ortho}}=8.5$  Hz) war charakteristisch für eine ortho-Kopplung. Um die Stellung der Hydroxylgruppe zu klären erfolgte die Aufnahme eines weiteren Protonenspektrums von der Reinsubstanz in DMSO. Diese Messung ergab, dass das Proton der Hydroxylgruppe als Teil einer Wasserstoffbrücke dem Carbonylsauerstoff benachbart war. Die chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{H}}$  10.91 ppm war hierfür charakteristisch und gleichzeitig der Beweis für die Stellung der Hydroxylgruppe an Position 8.

**Tab. 3.14:** 2D-NMR-Daten von **5-Methylmellein** in DMSO-d<sub>6</sub> (600 MHz)

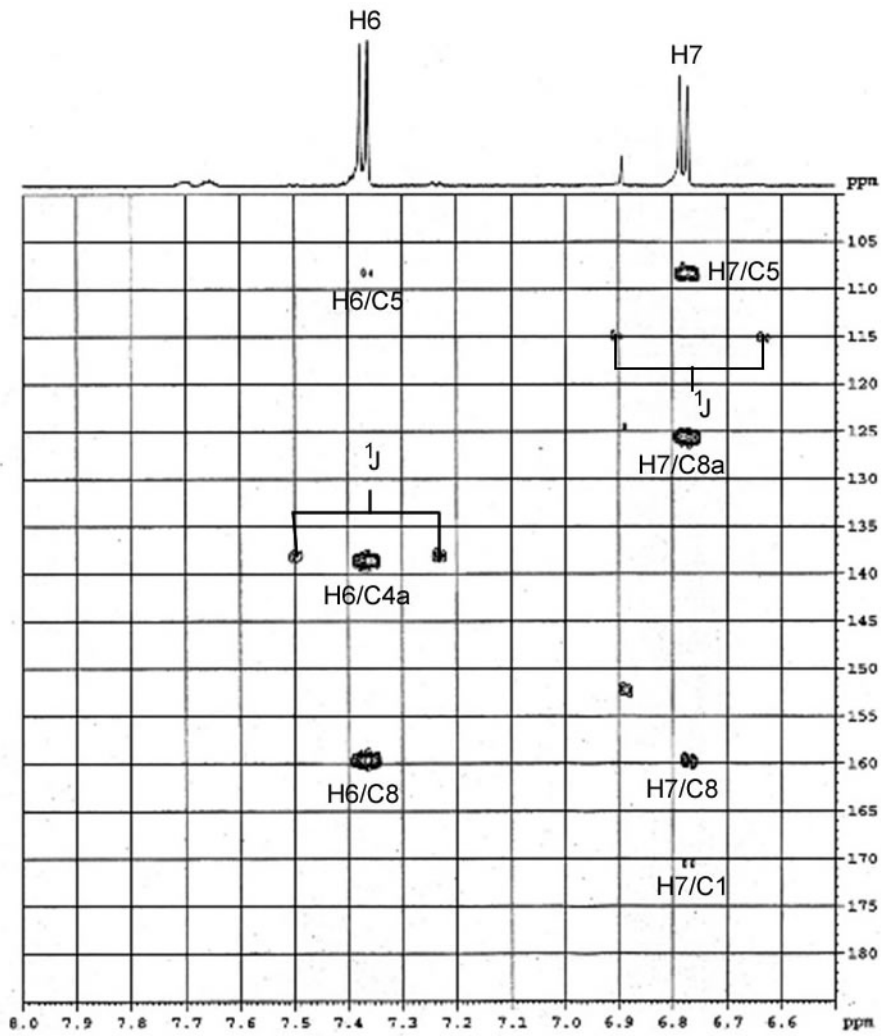
Position	$\delta_c$ [ppm]	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	170.5		
3	76.0		3-CH <sub>3</sub> , HA4, HB4
3-CH <sub>3</sub>	20.9	1, 3-CH <sub>3</sub> , 3, 4, 4a, 8a	H3
4	31.5	3, 4, 4a, 5, 6, 8a, 3-CH <sub>3</sub>	H3
4a	139.0		
5	108.5		
5-CH <sub>3</sub>	18.0	5-CH <sub>3</sub> , 4a, 5, 6, 8a	HB4
6	138.1	4, 4a, 5, 6, 8, 5-CH <sub>3</sub>	
7	115.0	1, 5, 7, 8, 8a	
8	159.9		
8a	126.0		

**Abb. 3.25:** HMBC-Spektrum von NV2K8SP1/3 in DMSO-d<sub>6</sub> (600 MHz)

Korrelationen der aliphatischen Protonen

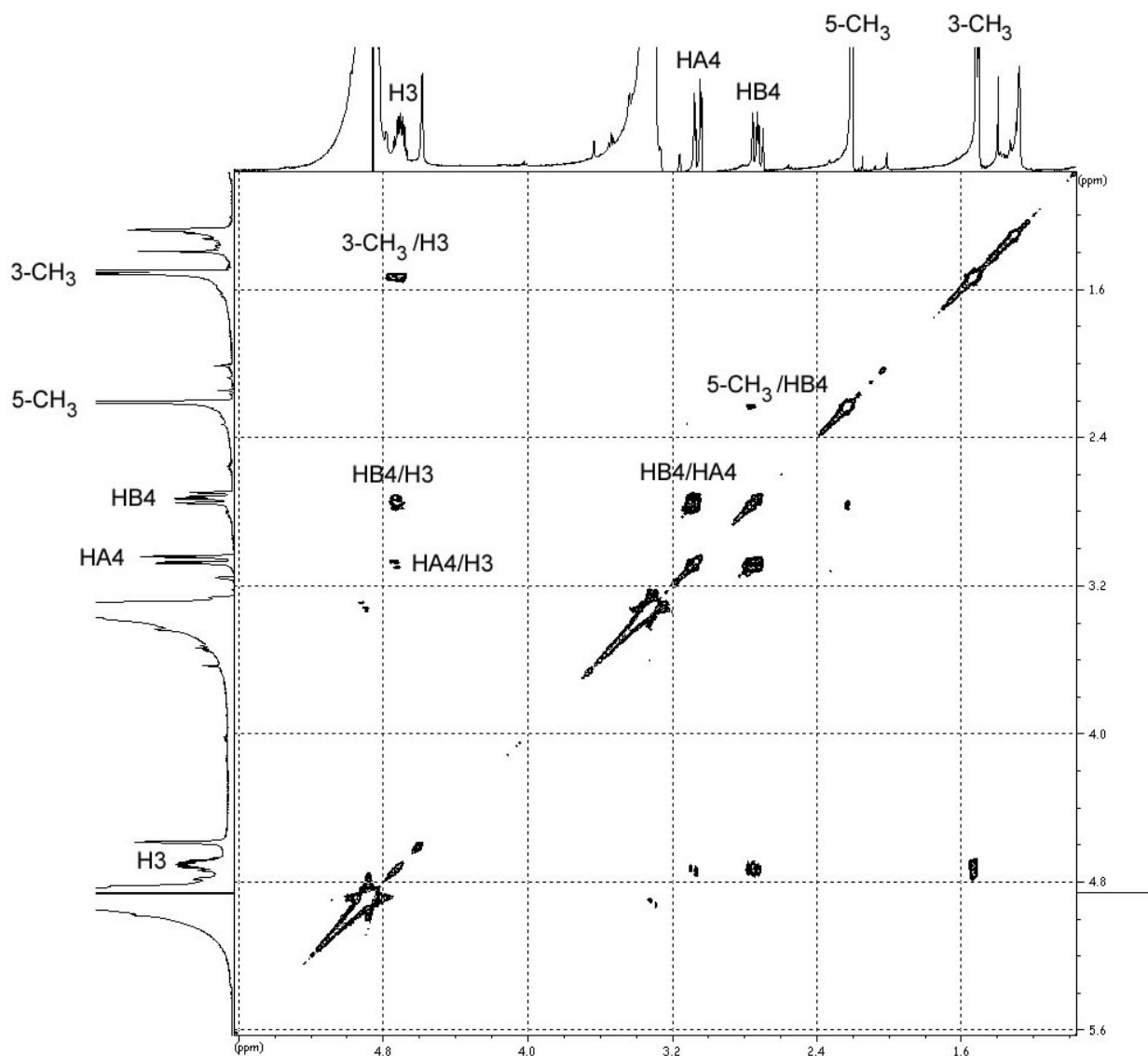


**Abb. 3.26:** HMBC-Spektrum von NV2K8SP1/3 in DMSO-d<sub>6</sub> (600 MHz)  
Korrelationen der aliphatischen Protonen



**Abb. 3.27:** HMBC-Spektrum von NV2K8SP1/3 in DMSO-d<sub>6</sub> (600 MHz)  
 Korrelationen der aromatischen Protonen

Das HMBC ermöglichte die Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den jeweiligen Kohlenstoffatomen durch Interpretation einiger Korrelationen und teilweise durch graphische Extrapolation der Direktkorrelationen. Signale für direkte Korrelationen zeigten die Protonen der beiden Methylgruppen, die beiden Protonen der diastereotopen Methylengruppe und die beiden aromatischen Protonen. Hieraus ergaben sich die Werte für die chemischen Verschiebungen des C4 ( $\delta_C$  31.5 ppm), der aromatischen Kohlenstoffatome C6 ( $\delta_C$  138.1 ppm) und C7 ( $\delta_C$  115.0 ppm), des aliphatischen 3-Methylkohlenstoffs ( $\delta_C$  20.9 ppm) und des aromatischen Methylkohlenstoffatoms ( $\delta_C$  18.0 ppm). In Bezug auf den Carbonylkohlenstoff wurden aus dem HMBC nur zwei Fernkorrelationen über vier Bindungen entnommen. Diese gingen von den Protonen der aliphatischen Methylgruppe und dem aromatischen H7 aus. Zwei Korrelationen über jeweils zwei Bindungen zum chiralen Kohlenstoff C3 wurden für die Protonen der 3-Methylgruppe und der 4-Methylengruppe beobachtet. Korrelationen zum quartären Kohlenstoff C4a zeigten sich ausgehend von den 4-Methylenprotonen über zwei Bindungen, sowie über drei Bindungen ausgehend von der 5-Methylgruppe und dem aromatischen H6. Eine Fernkorrelation zum C4a wurde für die aliphatische 3-Methylgruppe beobachtet. Korrelationen zum aromatischen Kohlenstoff an Position 5 waren ersichtlich über zwei Bindungen vom H6 und der 5-Methylgruppe ausgehend, über drei Bindungen vom H7 und von den beiden 4-Methylenprotonen ausgehend. Nur die beiden aromatischen Protonen zeigten Korrelationen zum hydroxyliertem Kohlenstoff an Position 8, über zwei (H7) und drei (H8) Bindungen. Von den beiden aromatischen Protonen zeigte nur das H7 eine Korrelation über drei Bindungen zum quartären C8a. Eine weitere dreibindige Kopplung zum C8a ging von den 4-Methylenprotonen aus. Die 3-Methylgruppe am Stereozentrum zeigte zum C8a eine Fernkopplung, ebenso wie die 5-Methylprotonen. Über drei Bindungen korrelierten 3-Methylprotonen mit dem Methylenkohlenstoffatom C4 und die Protonen der diastereotopen Methylengruppe mit dem 3-Methylkohlenstoff. Fernkopplungen der 4-Methylenprotonen zum aromatischen C6 und vom aromatischen H6 zum 4-Methylenkohlenstoffatom wurden beobachtet.



**Abb. 3.28:** H,H-COSY von NV2K8SP1/3 in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz)

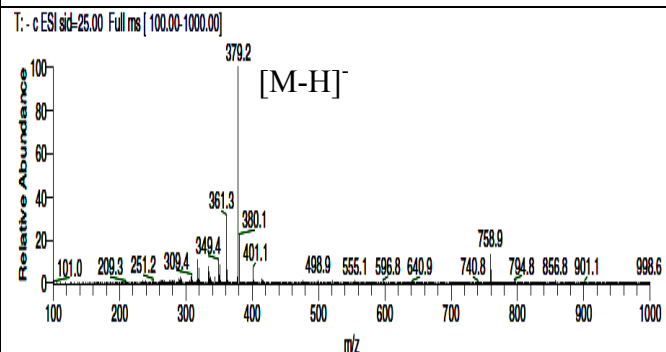
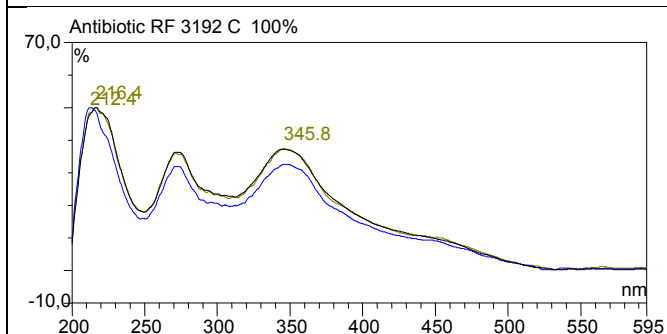
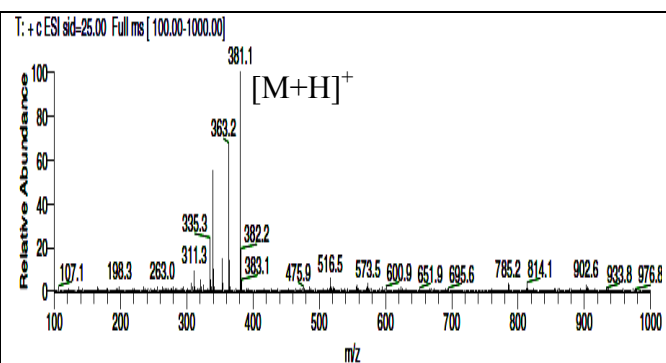
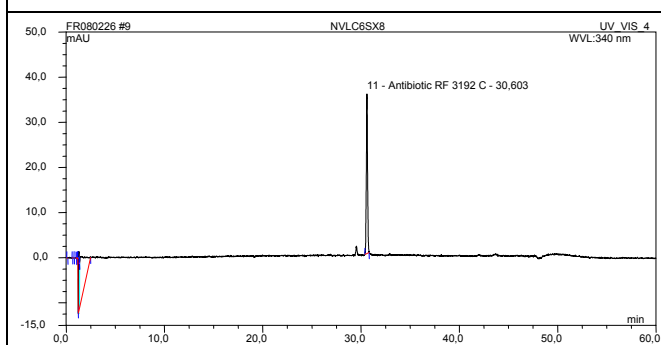
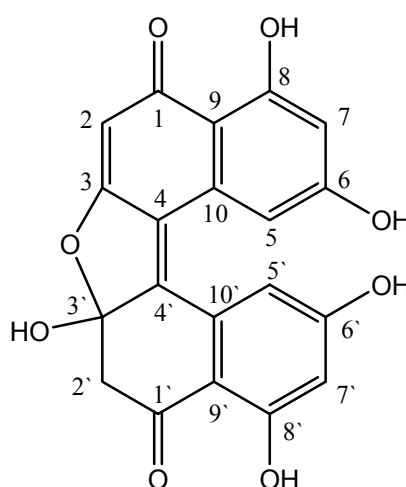
Das COSY zeigte die vicinalen Kopplungen am Chiralitätszentrum zwischen dem H3 und den 3-Methylprotonen sowie zwischen dem H3 und den beiden diastereotopen Methylenprotonen an Position 4. Eine Fernkopplung zwischen den 5-Methylprotonen und dem H4B war ebenfalls im COSY verzeichnet.

## 3.4.2. Antibiotic RF-3192C

## Analytische Daten von Antibiotic RF-3192C

Systematischer Name	2',3'-Dihydro-6,8,3',6',8'-pentahydroxydinaphto [2,1-b:1',2'-d]furan-1,1'-dion
Beschreibung	weißes Pulver
Biologische Quelle	9149 DiGe <i>Nodulisporium</i> sp. aus <i>Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	NVLC6SX8(43-49)
Substanzmenge	6 mg
Molekulargewicht	380 g/mol
Summenformel	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>
HPLC-Retentionszeit	30,604 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> +68° (c=1, MeOH)

Strukturformel



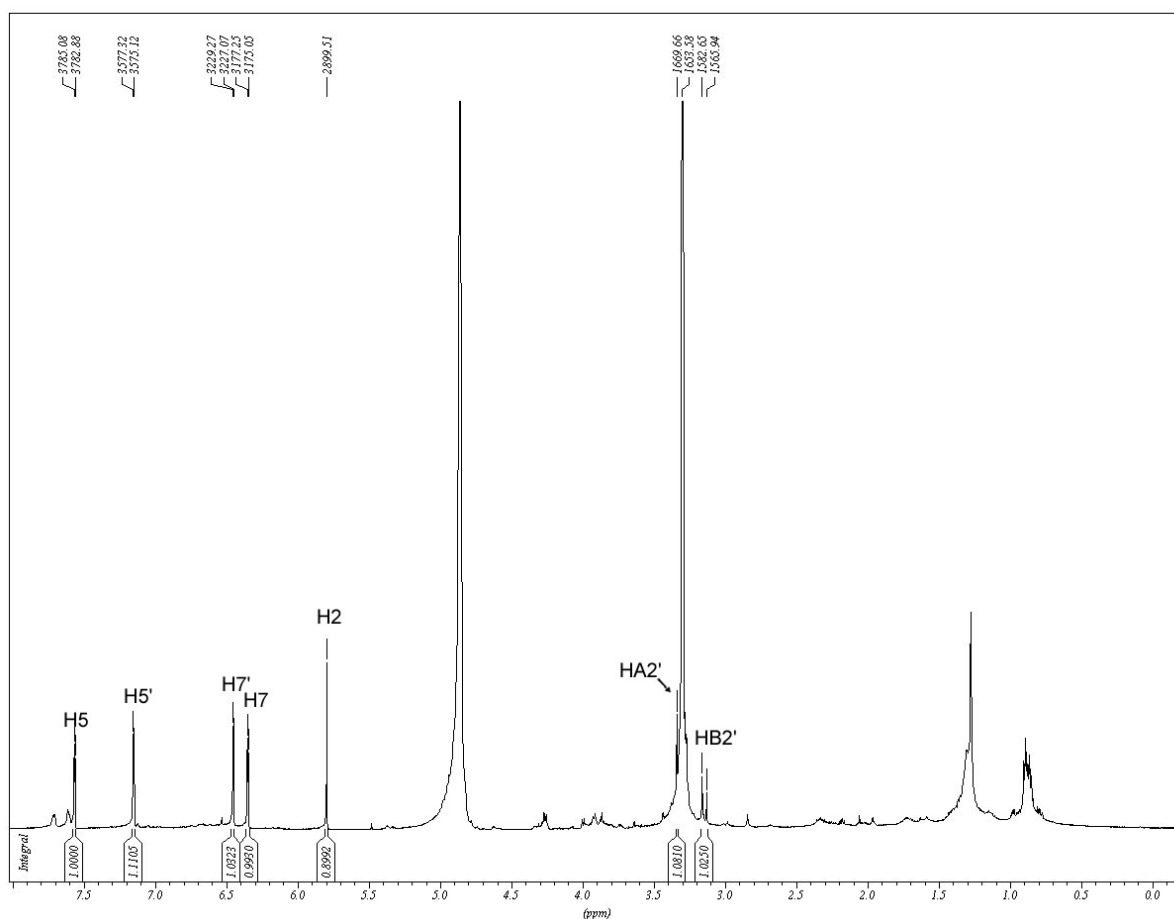
Als weiterer Sekundärmetabolit wurde die Verbindung mit der Trivialbezeichnung Antibiotic RF-3192C aus dem Kulturextrakt Nr. 9149DiGe von *Nodulisporium sp.* isoliert. Chemisch handelt es sich bei diesem Naturstoff um ein chinoides Bisnaphthalinsystem, das über einen Furanring verknüpft ist. Der Grundkörper ist ein Dihydro-dinaphthofuran-dion. Die Namensgebung beruht auf der Stammbezeichnung (RF-3192C) des Pilzes *Chaetomella circinoceta*, woraus diese Substanz erstmals isoliert wurde [Yoshida *et al.*, 1993]. Der Ethylacetat-Extrakt Nr. 9149DiGe wurde zur primären Auftrennung über eine Vakuum-Flüssigchromatographie (vgl. 2.4.1.) mit Kieselgel fraktioniert. In einer Gradientenelution unter Anwendung neun verschiedener Fließmittelsysteme aufsteigender Polarität wurde der Extrakt in neun Fraktionen aufgespalten. Die hieraus resultierende Fraktion Nr. 6 (NVLC6) wurde anschließend einer weiteren säulenchromatographischen Trennung unterzogen. Als stationäre Phase diente hierbei Sephadex LH-20 und als Elutionsmittel ein Gemisch zu gleichen Teilen aus Dichlormethan und Methanol. Von den erhaltenen 13 Fraktionen wurde Antibiotic RF-3192C als Reinsubstanz (6 mg) in Fraktion Nr. 8 aus vorab sieben identischen Fraktionen (43-49) unter Vereinigung angereichert. Die Fraktion NVLC6SX8(43-49) ergab beim Chromatographielauf auf der analytischen HPLC eine Retentionszeit von 30,6 min. Die UV-Absorptionsmaxima lagen bei 242,4 nm und 345,8 nm und waren charakteristisch für ein solches Bisnaphthalin-Grundgerüst. Im Massenspektrometer wurde das positive Ion bei 381,1 für  $[M+H]^+$  und das negative Ion bei 379,2 für  $[M-H]^-$  sowie bei 758,9 für das Dimer  $2[M-H]^-$  detektiert und damit ein Molekulargewicht von 380 g/mol angezeigt. Zur Strukturaufklärung wurde die Reinsubstanz zunächst in deuteriertem Methanol für die Aufnahme eines Protonenspektrums und eines COSY gelöst. Im Verlauf der Strukturaufklärung wurde von der Substanz ein weiteres Protonenspektrum in deuteriertem DMSO aufgezeichnet, um die in der Literatur erfassten Resonanzen für die Hydroxylgruppen ebenfalls eigenen Daten gegenüberstellen zu können.



Tab. 3.15: NMR-Daten für Antibiotic RF-3192 C in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz)

Position	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (Mult.,J [Hz]) CD <sub>3</sub> OD	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (mult.,J [Hz]) <sup>1</sup> DMSO
H2'	B 3.16 (d, 16.7) A 3.35 (d, 16.7)	B 3.231 (d, 16.8) A 3.408 (d, 16.8)
H2	5.80 (s)	5.839 (s)
H7	6.35 (d, 2.2)	6.364 (d, 2.2)
H7'	6.46 (d, 2.2)	6.459 (d, 2.2)
H5'	7.13 (d, 2.2)	7.099 (d, 2.0)
H5	7.55 (d, 2.2)	7.506 (d, 2.0)
6,6'-OH		10.712 (s)
6-6'-OH		11.339 (s)
8,8'-OH		12.568 (s)
8,8'-OH		13.857 (s)

<sup>1</sup>Yoshida *et al.*, 1983

Abb. 3.30: <sup>1</sup>H-NMR von NVLC6SX8(43-49) in CD<sub>3</sub>OD

Die in deuteriertem Methanol zunächst aufgezeichneten Daten aus dem Protonenspektrum zeigten trotz unterschiedlicher Lösungsmittel eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Im aliphatischem Bereich des Protonenspektrums lagen die Resonanzen der beiden diastereotopen Methylenprotonen als Dublettsignale bei  $\delta_{\text{H}}$  3.16 ppm für  $\text{H}_{\text{B}2'}$  sowie bei  $\delta_{\text{H}}$  3.35 ppm für das tieffeldverschobene  $\text{H}_{\text{A}2'}$ . Als gemeinsame Kopplungskonstante für die geminale Kopplung wurden 16,7 Hz berechnet. Weiter tieffeld bei  $\delta_{\text{H}}$  5.80 ppm trat das olefinische Proton H2 als Singulettsignal in Resonanz. Hinsichtlich der Multiplizität ergaben alle weiteren Methinprotonen Dubletts. Die chemischen Verschiebungen betragen  $\delta_{\text{H}}$  6.35 ppm für H7,  $\delta_{\text{H}}$  6.46 ppm für  $\text{H}7'$ ,  $\delta_{\text{H}}$  7.13 ppm für  $\text{H}5'$  und  $\delta_{\text{H}}$  7.55 ppm für H5. Aus den jeweiligen Dubletts ergab sich für alle diese aromatischen Methinprotonen die gleiche Kopplungskonstante von  ${}^4J_{\text{meta}} = 2.2$  Hz. Diese symbolisiert paarweise die meta-Kopplung zwischen den jeweiligen Protonenpaaren H5 und H7 bzw.  $\text{H}5'$  und  $\text{H}7'$ . Diese beiden meta-Kopplungen waren auch im COSY-Spektrum als Kreuzsignale verzeichnet. Die chemischen Verschiebungen der vier Hydroxylgruppen wurden bei einem späteren  ${}^1\text{H}$ -NMR-Experiment noch nachträglich ermittelt und zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten. In der herangezogenen Publikation, bei der es sich um eine Patentschrift handelte, wurde keine positionelle Zuordnung dieser vier Hydroxylgruppen getroffen.

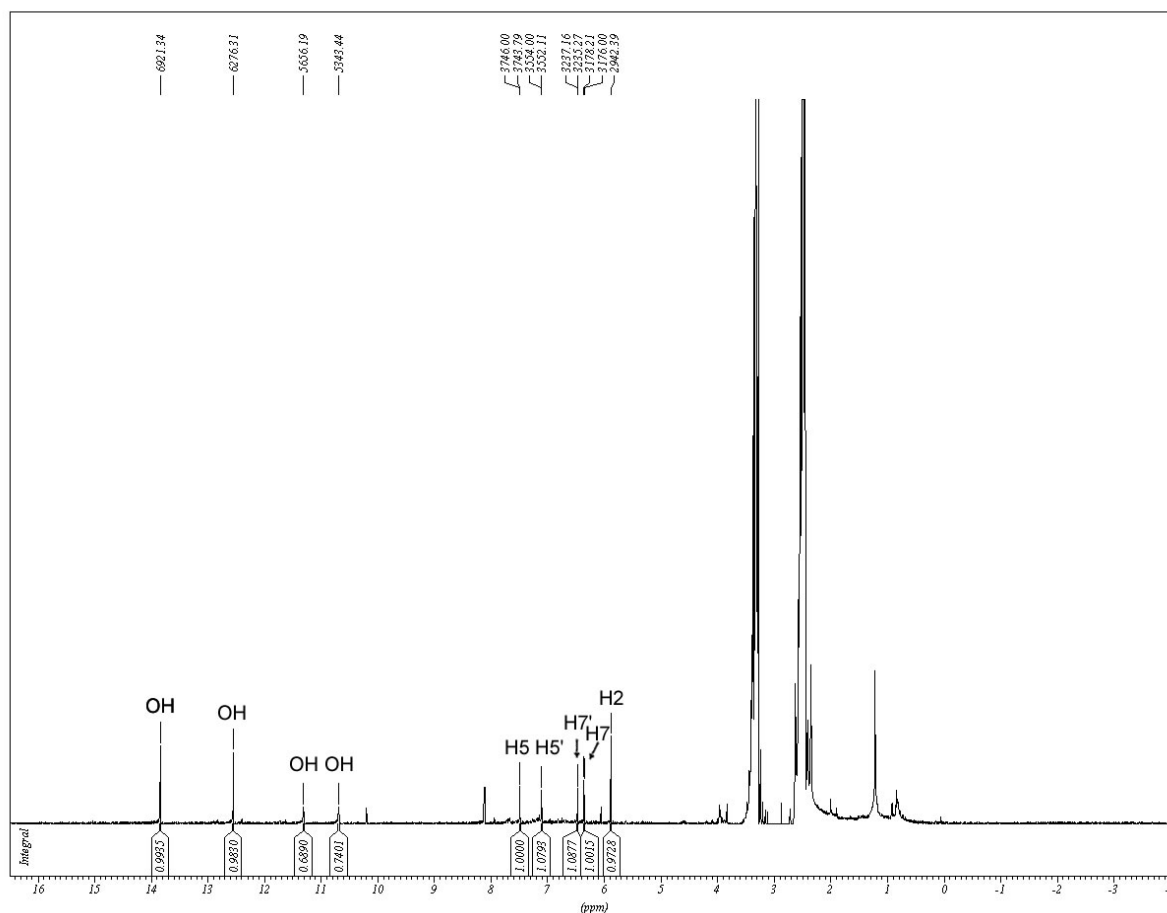


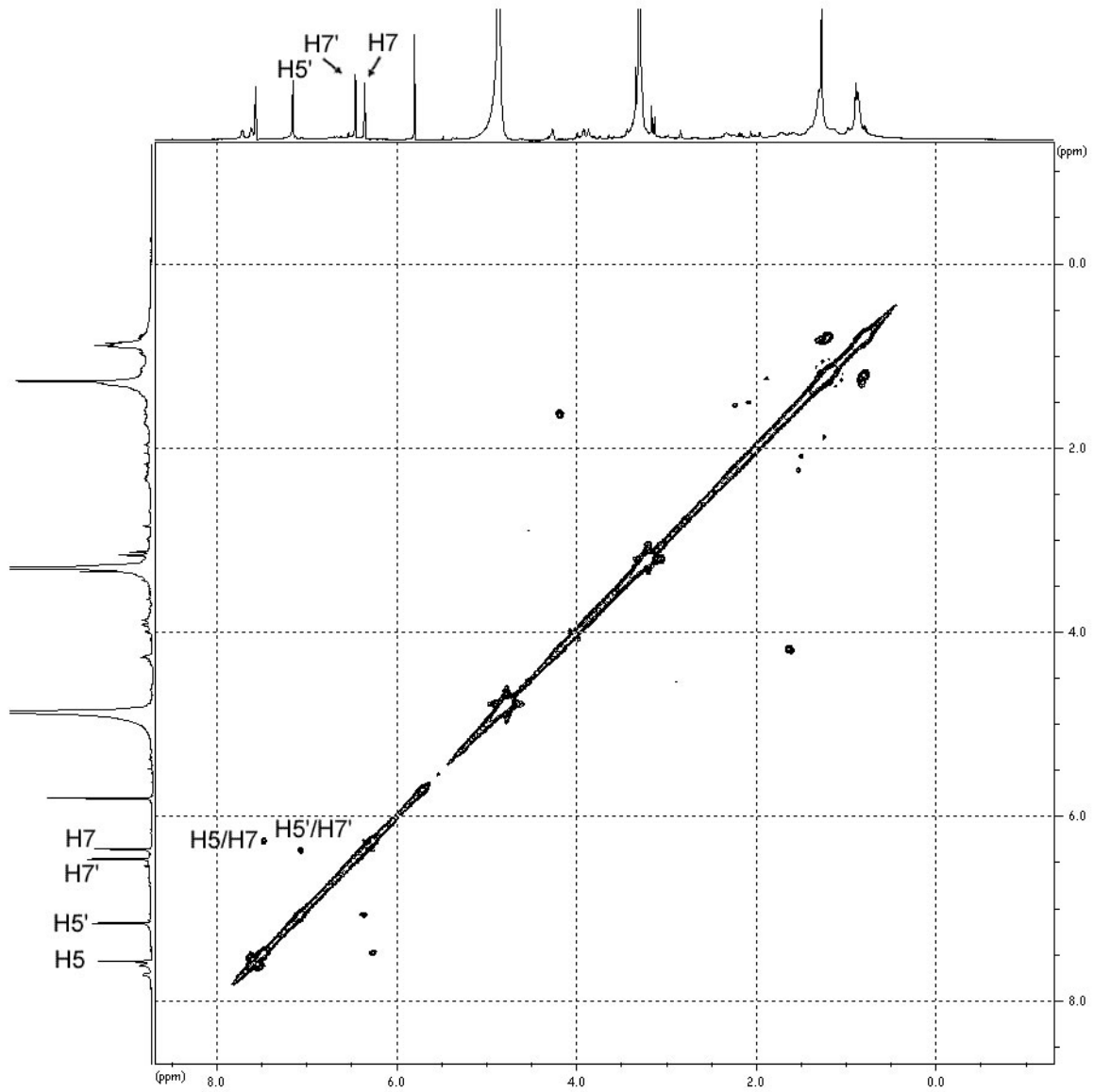
Abb. 3.31:  $^1\text{H}$ -NMR von NVLC6SX8(43-49) in  $\text{DMSO-d}_6$

Tab. 3.16: NMR-Daten für Antibiotic RF-3192 C in DMSO (500 MHz)

Position	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (Mult.,J [Hz])	$\delta_{\text{H}}$ [ppm] (mult.,J [Hz]) <sup>1</sup>
H2'	<sup>2</sup>	B 3.231 (d, 16.8) A 3.408 (d, 16.8)
H2	5.883 (s)	5.839 (s)
H7	6.352 (d, 2.2)	6.364 (d, 2.2)
H7'	6.471 (d, 2.2)	6.459 (d, 2.2)
H5'	7.104 (d, 2.2)	7.099 (d, 2.0)
H5	7.488 (d, 2.2)	7.506 (d, 2.0)
OH	10.684 (s)	10.712 (s)
OH	11.309 (s)	11.339 (s)
OH	12.549 (s)	12.568 (s)
OH	13.839 (s)	13.857 (s)

<sup>1</sup>Yoshida *et al.*, 1993

<sup>2</sup>Signale sind von Lösungsmittelsignalen überlappt



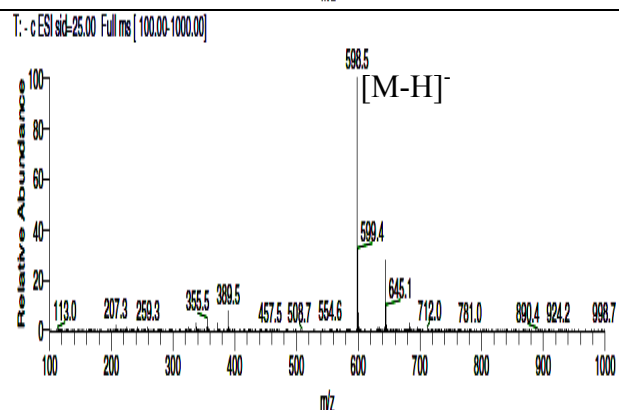
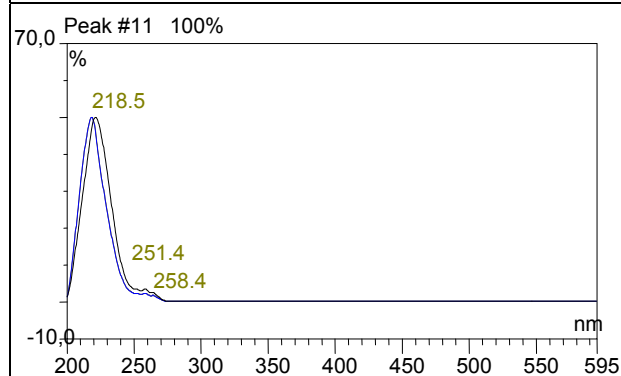
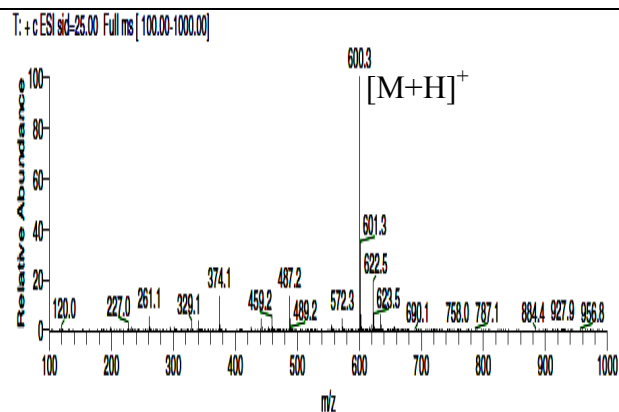
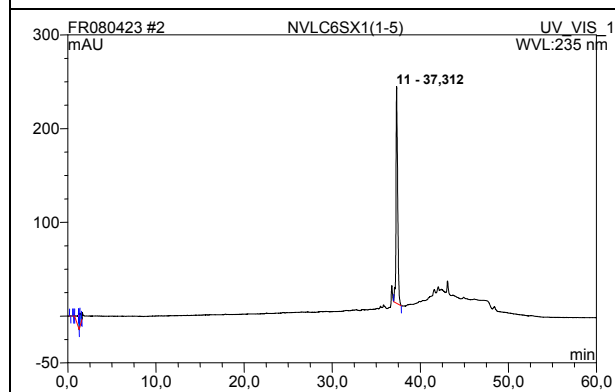
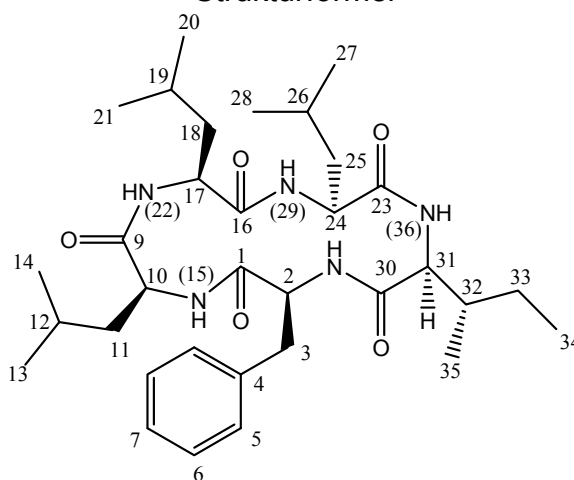
**Abb. 3.32:** H,H-COSY von NVLC6SX8(43-49) in CD<sub>3</sub>OD

### 3.4.3. Cyclo(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile)

#### Analytische Daten von Cyclo(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile)

Beschreibung	farbloses Pulver
Biologische Quelle	9149 DiGe <i>Nodulisporium sp. aus Suberites domuncula</i>
Fraktionsbezeichnung	NVLC6SX1(1-5)SP
Substanzmenge	12 mg
Molekulargewicht	599 g/mol
Summenformel	C <sub>33</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>
HPLC-Retentionszeit	37,312 min
gemessener Drehwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> -22° (c=0,1, MeOH)
Literaturwert	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> -56° (c=0,13, MeOH) [Li <i>et al.</i> , 2004]

#### Strukturformel

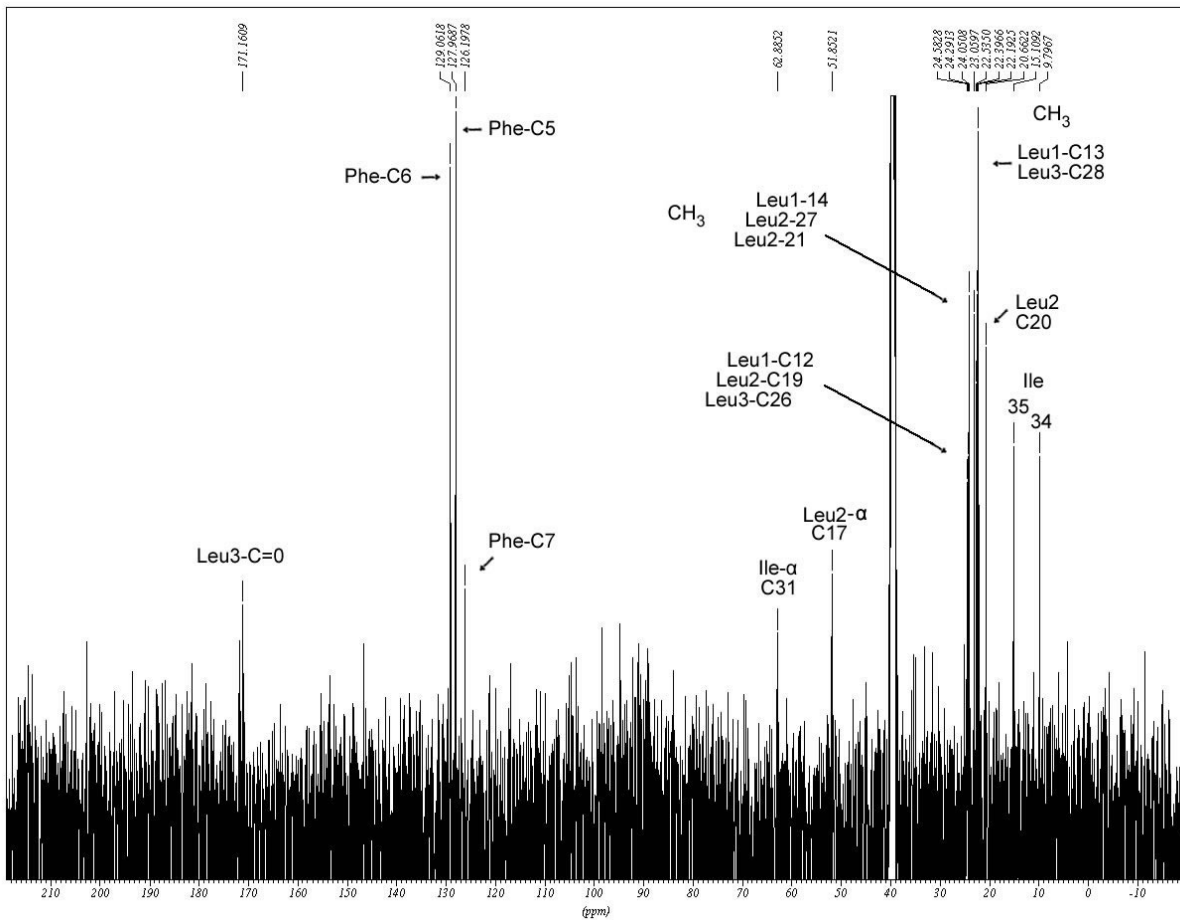


Bei der Auftrennung des Kulturextraktes Nr. 9149DiGe aus *Nodulisporium* sp. wurde Cyclo(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile) als farbloses Pulver isoliert. Chemisch handelt es sich bei diesem Naturstoff um ein zyklisches Pentapeptid, das aus drei verschiedenen proteinogenen Aminosäuren aufgebaut ist. Die Sequenz beginnt mit L-Phenylalanin, gefolgt von drei Einheiten L-Leucin und anschließend L-Isoleucin. Diese fünf Aminosäuren bilden ein zentrales 15gliedriges Ringsystem aus. Der Rohextrakt Nr.9149DiGe wurde primär unter Anwendung der Vakuum-Flüssigchromatographie (vgl. 2.4.1.) mit Kieselgel in einer Gradientenelution aufgetrennt. Hergestellt aus den vier Lösungsmitteln Hexan, Ethylacetat, Dichlormethan und Methanol wurden neun verschiedene Fließmittelgemische nach aufsteigender Polarität verwendet. Die aus diesem Verfahren gewonnene Fraktion Nr. 6, eluiert mit reinem Dichlormethan, wurde anschließend in einer Folgetrennung einer Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 und DCM/MeOH zu gleichen Teilen unterzogen. Bei dieser Größenausschlusschromatographie wurde das Pentapeptid als erstes eluiert und durch Vereinigung der ersten fünf identischen Fraktionen angereichert (213 mg). Ein Teil dieser Fraktion (ca. 60 mg) wurde abschließend nochmals mit Hilfe der semipräparativen HPLC aufgereinigt. Die letztendlich erhaltene Fraktion NVLC6SX1(1-5)SP erwies sich schließlich als die peptidische Reinsubstanz, die in einer Ausbeute von 12 mg isoliert wurde. Beim chromatographischen Lauf auf der analytischen HPLC ergab sich eine Retentionszeit von 37,3 min und das UV-Spektrum zeigte ein hohes Absorptionsmaximum bei 218,5 nm, gefolgt von einem sehr schwachen bei 258,4 nm. Im Massenspektrometer ionisierte die Reinsubstanz als positives Ion mit 600,3 amu für  $[M+H]^+$  und als negatives Ion mit 598,5 amu für  $[M-H]^-$  und zeigte somit ein Molekulargewicht von 599 g/mol.

Zur Strukturaufklärung wurden von der isolierten Reinsubstanz ein Protonenspektrum, ein <sup>13</sup>C-NMR und ein COSY aufgenommen. In Einklang mit der Literatur erfolgten die Messungen in deuteriertem DMSO.

**Tab. :** NMR-Daten von **Cyclo(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile)** in DMSO-d<sub>6</sub>  
(500 bzw. 125 MHz)

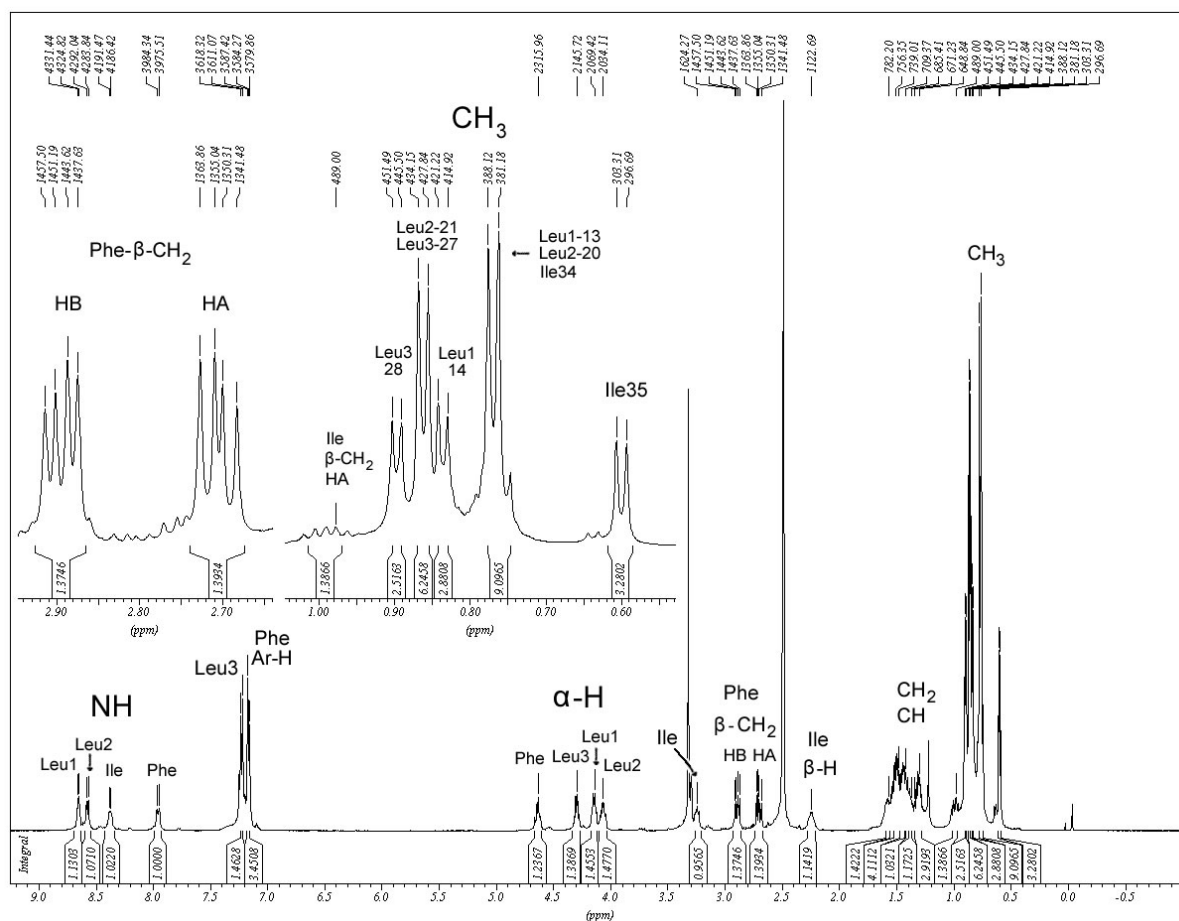
Position	$\delta_c$ [ppm] NVLC6SX1(1-5)SP	$\delta_c$ [ppm] [Li <i>et al.</i> , 2004]	$\delta_H$ [ppm] (Mult., J [Hz]) NVLC6SX1(1-5)SP	$\delta_H$ [ppm] (Mult., J [Hz]) [Li <i>et al.</i> , 2004]
<b>Phe</b>				
1		171.6		
2- $\alpha$ H		52.7	4.65 (m)	4.64 (ddd, 9.0, 8.5, 7.0)
3-CH <sub>2</sub>		38.4	A 2.73 (dd, 13.6, 8.5) B 2.91 (dd, 13.4, 7.1)	A 2.73 (dd, 13.5, 9.0) B 2.91 (dd, 15.5, 7.0)
4		137.3		
5	128.0	127.9	7.19-7.22	7.18-7.23
6	129.1	129.0	7.19-7.22	7.18-7.23
7	126.2	126.1	7.19-7.22	7.18-7.23
8-NH			7.98	7.95 (d, 8.5)
<b>Leu<sup>1</sup></b>				
9 C=O		171.4		
10- $\alpha$		51.8	4.17 (m)	4.17 (ddd, 7.5, 7.5, 6.5)
11- CH <sub>2</sub>		38.6	1.38 (m)	1.38 (m)
12	24.1	24.0	1.33 (m)	1.33 (m)
13- CH <sub>3</sub>	22.2	22.2	0.78 (d, 6.6)	0.77 (d, 6.0)
14- CH <sub>3</sub>	22.4	22.3	0.86 (d, 6.3)	0.84 (d, 6.0)
15-NH			8.68 (d,	8.58 (d, 6.5)
<b>Leu<sup>2</sup></b>				
16 C=O		171.5		
17- $\alpha$	51.9	51.9	4.08 (m)	4.08 (ddd, 9.5, 8.0, 5.5)
18- CH <sub>2</sub>	39.9	39.9	1.51 (m)	1.51 (m)
19	24.3	24.3	1.60 (m)	1.60 (m)
20- CH <sub>3</sub>	20.7	20.7	0.81 (d, 6.3)	0.79 (d, 6.0)
21- CH <sub>3</sub>	23.1	23.0	0.89 (d, 6.3)	0.88 (d, 6.0)
22-NH			8.60 (d,	8.46 (d, 8.0)
<b>Leu<sup>3</sup></b>				
23 C=O	171.2	171.1		
24- $\alpha$		52.1	4.30 (m)	4.30 (ddd, 7.5, 7.5, 7.5)
25- CH <sub>2</sub>	40.2	40.2	1.55 (m)	1.55 (m)
26	24.6	24.5	1.46 (m)	1.46 (m)
27- CH <sub>3</sub>	22.5	22.5	0.89 (d, 6.3)	0.88 (d, 6.0)
28- CH <sub>3</sub>	22.2	22.2	0.93 (d, 6.3)	0.91 (d, 6.0)
29-NH			7.26 (d, 7.9)	7.23 (d, 7.5)
<b>Ile</b>				
30 C=O		171.0		
31- $\alpha$	62.9	62.8	3.28	3.28 (dd, 2.0, 3.5)
32		33.0	2.28 (m)	2.23 (m)
33- CH <sub>2</sub>	25.0	25.0	A 1.03 (m) B 1.42 (m)	A 1.01 (m) B 1.41 (m)
34- CH <sub>3</sub>	9.8	9.8	0.80 (t, 7.6)	0.78 (t, 7.5)
35- CH <sub>3</sub>	15.1	15.1	0.63 (d, 6.9)	0.63 (d, 6.5)
36-NH			8.41 (d,	8.33 (d, 8.0)



**Abb. 3.33:**  $^{13}\text{C}$ -NMR von NVLC6SX1(1-5)SP in  $\text{DMSO-d}_6$

Im Kohlenstoffspektrum wurden lediglich 20 der insgesamt 33 Kohlenstoffatome detektiert.

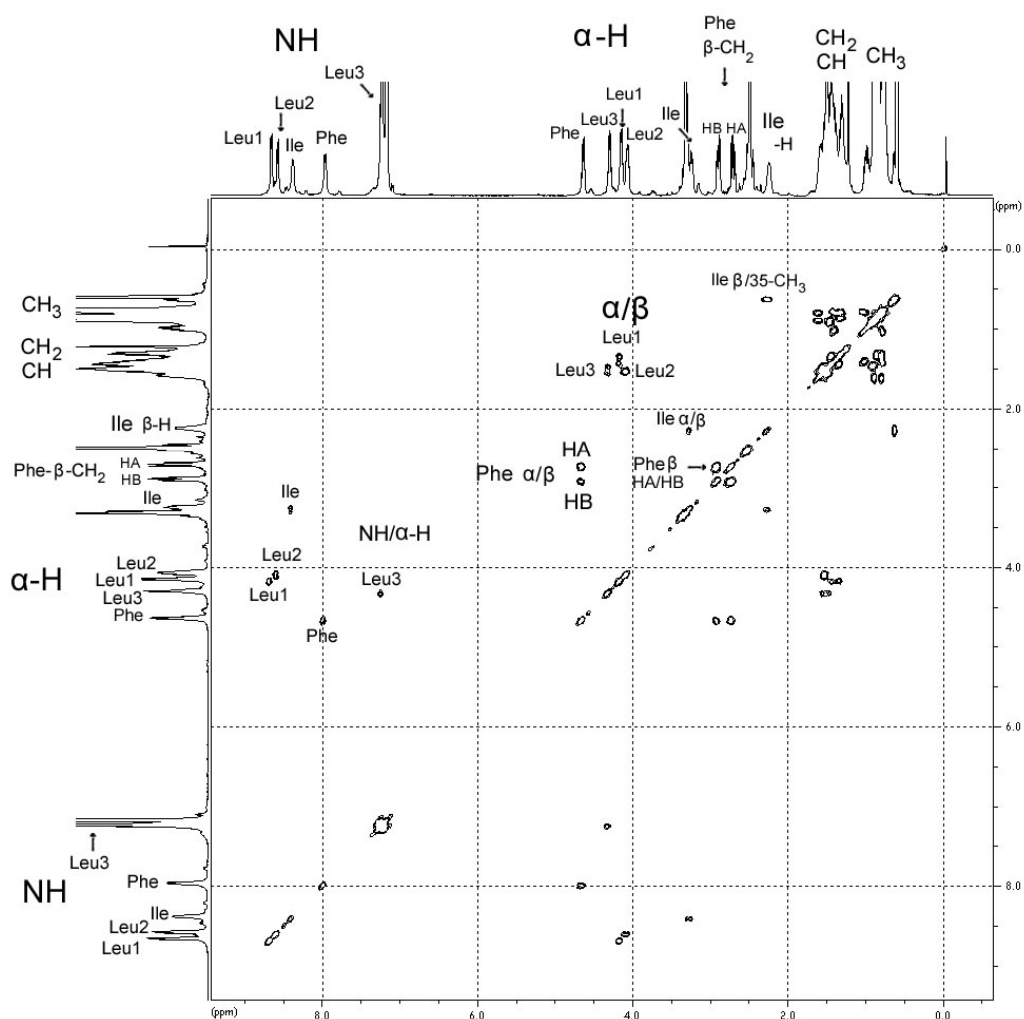




**Abb. 3.34:**  $^1\text{H-NMR}$  von NVLC6SX1(1-5)SP in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)

Im Protonenspektrum konnten vier verschiedene Bereiche unterschieden werden: Der sehr komplex strukturierte aliphatische Bereich von  $\delta_{\text{H}}$  0.63-2.91 ppm, gefolgt in Richtung Tieffeld von der Region für die  $\alpha$ -Protonen der fünf Aminosäuren bei  $\delta_{\text{H}}$  3.28-4.65 ppm, anschließend der Bereich der aromatischen Protonen des Phenylalanins bei  $\delta_{\text{H}}$  7.19-7.22 ppm und zuletzt im tiefsten Feld die Resonanzsignale der fünf amidischen Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  7.26-8.68 ppm. Insgesamt befanden sich im aliphatischen Bereich die Resonanzen von 38 Protonen. Acht Methylgruppen zeigten sich bis auf eine Ausnahme als Dubletts im Intervall von  $\delta_{\text{H}}$  0.63-0.93 ppm. Beginnend im höchsten Feld befand sich die Resonanz der Methylgruppe an Position 35 des Isoleucins bei  $\delta_{\text{H}}$  0.63 ppm. Etwas weiter in Richtung Tieffeld befand sich ein Resonanzsignal mit einem Integral von 9H, das drei Methylgruppen stark überlappend zeigte. Hierbei handelte es sich um zwei Methylgruppen des ersten ( $\text{Leu}^1\text{-13-CH}_3$ :  $\delta_{\text{H}}$  0.78 ppm) und des zweiten Leucins ( $\text{Leu}^2\text{-20-CH}_3$ :  $\delta_{\text{H}}$  0.81 ppm) und um das einzige Triplettsignal einer Methylgruppe des Isoleucins ( $\text{Ile 34-CH}_3$ :  $\delta_{\text{H}}$  0.80 ppm).

Weitere Methylresonanzsignale folgten bei  $\delta_{\text{H}}$  0.86 ppm (Leu<sup>1</sup>-14-CH<sub>3</sub>), bei  $\delta_{\text{H}}$  0.89 ppm für zwei sich überlagernde Signale (Integral 6H) für zwei Methylgruppen des zweiten (Leu<sup>2</sup>-21-CH<sub>3</sub>) und des dritten Leucins (Leu<sup>3</sup>-27-CH<sub>3</sub>) und zuletzt noch eine Resonanz bei  $\delta_{\text{H}}$  0.93 ppm für die Methylgruppe an Position 28 des dritten Leucins. Weiter in Richtung Tieffeld folgten die Resonanzen sämtlicher Methylenprotonen, die alle als Teil in einem sehr komplexen Multiplettsignal befanden. Die Resonanzen der beiden Protonen der  $\gamma$ -Methylengruppe an Position 33 des Isoleucins zeigten aufgrund der Diastereotopie unterschiedliche chemische Verschiebungen (Ile-HB33 bei  $\delta_{\text{H}}$  1.03 ppm und Ile-HA33 bei  $\delta_{\text{H}}$  1.42 ppm). Die drei  $\gamma$ -Protonen der Leucine befanden sich bei  $\delta_{\text{H}}$  1.33 ppm (Leu<sup>1</sup>-H12), bei  $\delta_{\text{H}}$  1.60 ppm (Leu<sup>2</sup>-H19) und bei  $\delta_{\text{H}}$  1.46 ppm (Leu<sup>3</sup>-H26). Die entsprechenden Resonanzen der drei  $\beta$ -Methylengruppen der Leucine lagen bei  $\delta_{\text{H}}$  1.38 ppm (Leu<sup>1</sup>-11-CH<sub>2</sub>), bei  $\delta_{\text{H}}$  1.51 ppm (Leu<sup>2</sup>-18-CH<sub>2</sub>) und bei  $\delta_{\text{H}}$  1.55 ppm (Leu<sup>3</sup>-25-CH<sub>2</sub>). In Richtung Tieffeld folgte für den aliphatischen Bereich noch das  $\beta$ -Proton an Position 32 des Isoleucins bei  $\delta_{\text{H}}$  2.28 ppm und zuletzt noch die beiden Protonen der diastereotopen Methylengruppe des Phenylalanins als jeweils doppelte Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  2.73 ppm und bei  $\delta_{\text{H}}$  2.91 ppm. Die Resonanzen für die fünf  $\alpha$ -Protonen lagen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.28 ppm für das des Isoleucins in Form eines doppelten Dubletts, dann gefolgt in Richtung Tieffeld die  $\alpha$ -Protonen der drei Leucine als dreifache Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  4.08 ppm (Leu<sup>2</sup>-17 $\alpha$ ), bei  $\delta_{\text{H}}$  4.17 ppm (Leu<sup>1</sup>-10 $\alpha$ ) sowie bei  $\delta_{\text{H}}$  4.30 ppm (Leu<sup>3</sup>-24 $\alpha$ ) und im tiefsten Feld die Resonanz des  $\alpha$ -Protons des Phenylalanins bei  $\delta_{\text{H}}$  4.65 ppm ebenfalls in Form eines dreifachen Dubletts. Der aromatische Teil des Protonenspektrums zeigte die Resonanzen der fünf benzoiden Protonen des Phenylalanins in einem Intervall von  $\delta_{\text{H}}$  7.18-7.23 ppm. Am weitesten im Tieffeld fanden sich die Resonanzsignale der fünf amidischen Protonen, die alle als Dubletts erschienen. Die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen betragen von Hoch- nach Tieffeld:  $\delta_{\text{H}}$  7.26 ppm (Leu<sup>3</sup>-29-NH),  $\delta_{\text{H}}$  7.98 ppm (Phe-8-NH),  $\delta_{\text{H}}$  8.41 ppm (Ile-36-NH),  $\delta_{\text{H}}$  8.60 ppm (Leu<sup>2</sup>-22-NH) und  $\delta_{\text{H}}$  8.68 ppm (Leu<sup>1</sup>-15-NH). Die Messwerte standen im guten Einklang mit den Werten aus der Literatur.



**Abb. 3.35:** H,H-COSY von NVLC6SX1(1-5)SP in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz)

Im COSY konnten alle vicinalen Kopplungen der jeweiligen  $\alpha$ -Protonen mit den jeweiligen  $\beta$ -Protonen beobachtet werden. Für das Phenylalanin wurden die beiden Kreuzsignale für die vicinalen Kopplungen des  $\alpha$ -Protons mit den jeweiligen diastereotropen  $\beta$ -Methylenprotonen gefunden. Ferner fand sich für Phenylalanin das Signal für die geminale Kpplung dieser beiden unterschiedlichen Methylenprotonen an  $\beta$ -Position. Für das Isoleucin konnte das Kreuzsignal für die vicinale Kopplung des  $\beta$ -Protons mit den Protonen der Methylgruppe an Position 35 identifiziert werden. Für jede der fünf Aminosäuren zeigte das COSY die vicinalen Kopplungen der Amidprotonen zu den jeweiligen  $\alpha$ -Protonen.

## 4. Diskussion

Die im Rahmen dieser Forschungsarbeit erzielten Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Beantwortung einiger Fragen leisten, mit denen die marine Naturstoffforschung häufig konfrontiert wird.

1. Sind künstlich gehaltene Schwämme von *Suberites domuncula* ein geeignetes Modell zur Gewinnung neuer Erkenntnisse darüber, warum sich Pilze in Schwämmen ansiedeln und in welcher Art von Wechselbeziehung beide Organismengruppen zueinander stehen?
2. Sind marine Schwämme die am besten geeignetste Quelle zur Isolierung Naturstoff-produzierender Pilze? Wie ist die mikrobiologische Diversität im Vergleich zu anderen Invertebraten zu beurteilen?
3. Stellen marine Pilze auf der Suche nach neuen Arzneistoffen eine geeignete Quelle dar?  
Wie erfolgreich ist die gezielte Suche nach zytotoxisch aktiven Substanzen in marinen schwammassoziierten Pilzen?
4. Können sich Naturstoffe aus marinen Pilzen als neue Arzneistoffe durchsetzen?  
Wie ist deren Potential zu beurteilen?  
Welche Faktoren sind limitierend für derartige Stoffe auf dem Weg zum Arzneimittel?

## 4.1. Akkumulierung von Pilzen in Schwämmen

Aus Untersuchungen an Schwämmen ist bereits bekannt, dass deren Biomasse zu 40 % aus Mikroorganismen besteht [Wilkinson, 1978]. Das Phänomen, das in Schwämmen eine Vielzahl verschiedener Pilze zu finden sind, konfrontiert die marine mikrobiologische Forschung mit zahlreichen Fragen. Warum assoziieren Pilze mit Schwämmen und in welcher Art von Wechselbeziehung stehen beide Organismen zueinander? Fungieren Pilze als Symbionten oder Parasiten von Schwämmen? Erkenntnisse darüber sollen in einer groß angelegten laufenden Studie unseres Arbeitskreises gewonnen werden. Hierzu musste im Rahmen dieses Großprojektes zunächst ein geeigneter Schwamm als biologisches Forschungsobjekt ausgewählt werden. Hierbei gaben zwei wesentliche Argumente den Ausschlag für die Wahl der mediterranen Schwammspezies *Suberites domuncula* als Modellorganismus: Diese Art verfügt über Rezeptoren für bestimmte Bestandteile aus den Zellwänden von Pilzen wie z.B. für das 1,3- $\beta$ -D-Glucan. Dieser interessante Befund beweist, dass dieser Schwamm irgendwann während seines Lebenszyklus oder in seiner Evolutionsgeschichte von Pilzen besiedelt war oder in irgendeiner Form mit ihnen in Kontakt getreten ist [Perovic-Ottstadt *et al.*, 2004]. Neben der Präsenz dieses Rezeptors war das zweite Argument die Tatsache, dass Schwämme dieser Art leicht über mehrere Monate bis hin zu einem Jahr in Aquarien künstlich gehalten werden können. Um Antworten auf die eingangs gestellten Fragen zu finden, sollte im Rahmen dieses Forschungsprojektes zunächst das gesamte Spektrum an Pilzen, die mit *Suberites domuncula* vergesellschaftet sind, isoliert, taxonomisch identifiziert und auf bioaktive Inhaltsstoffe hin untersucht werden. Welche Gattungen bzw. Arten von Pilzen kommen in *Suberites domuncula* vor und welche Stoffe mit welchen Aktivitäten produzieren sie? Diese Arbeit trägt somit als Teil dieser laufenden Studie zur Klärung der eingangs gestellten Fragen wesentlich bei, denn die Sekundärmetabolite, die diese assoziierten Pilze bilden, haben mit Sicherheit große Bedeutung *in situ*. Die Pilzbesiedlung könnte den Schwämmen als wichtiger Schutz vor wiederum anderen Organismen dienen. Hierzu Auskunft geben könnten die Bioaktivitäten der Pilzmetabolite, denn z.B. antibiotisch aktive Stoffe könnten den Schwamm vor der Besiedlung mit pathogenen Bakterien schützen. Andererseits gibt es bestimmte Pilze, die auch in der terrestrischen Umgebung vorkommen und dort als Pflanzenpathogene gelten wie z.B. die ubiquitären Gattungen *Penicillium* und *Cladosporium*, die sich auch unter den zahlreichen Isolaten aus *Suberites domuncula* befanden (vgl. 4.2.).

Schwämme selbst produzieren für gewöhnlich auch Naturstoffe [Blunt *et al.*, 2007], die in Abhängigkeit von deren Bioaktivität die Ansiedlung bestimmter Mikroorganismen verhindern oder erschweren könnten. Vielleicht werden Schwamminhaltsstoffe auch von Mikroorganismen verwertet und stellen Vorstufen oder Ausgangsstoffe ihrer Pilzmetaboliten dar. Aus *Suberites domuncula* allerdings sind bisher nur drei bekannte Sekundärmetabolite isoliert worden [MarinLit, 2006]. Dieser Schwamm gilt als „chemisch arm“, produziert z.B. keine antimykotischen Substanzen und wird daher vermutlich besonders von Pilzen heimgesucht [Proksch *et al.*, 2008]. Der folgende Abschnitt verdeutlicht, dass die Art *Suberites domuncula* sich als Forschungsmodell bestens eignet, um künftig viele der eingangs gestellten Fragen zu beantworten.

## 4.2. Schwämme als ergiebige Quelle zur Gewinnung mariner Pilze

Generell gelten Schwämme als die wichtigste Quelle zur Isolierung von Metabolitenproduzierenden marinen Pilzen [Höller *et al.*, 2000; Jensen and Fenical 2002; Bugni and Ireland 2004; Ebel 2006]. Aus acht Schwammproben von *Suberites domuncula* wurden 81 Pilzstämme, die 20 verschiedenen Gattungen angehören, isoliert (vgl. Tab. 2.1). Es ergab sich eine relativ hohe Diversität an marinen Pilzen mit vielen ubiquitären Taxa wie *Aspergillus*, *Penicillium* und *Cladosporium*, die häufig bereits in der Vergangenheit aus Schwämmen isoliert wurden [Höller *et al.*, 2000; Ebel 2006]. Gleichzeitig wurden aber auch Pilze wie *Engyodontium album* und *Petriella sp.* isoliert, über die in der Vergangenheit noch nicht berichtet wurde. Zu den häufigsten Isolate aus *Suberites domuncula* zählten *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Petriella sp.*, *Phialophora spp.* und *Engyodontium album*. Vier der gesamten Isolate erwiesen sich nach einem ersten chemischen Screening als interessant und wurden in unserem Arbeitskreis hinsichtlich bioaktiver Naturstoffe detaillierter analysiert. Bei den vier Stämmen handelte es sich um 8009 *Aspergillus ustus*, 7979 *Penicillium frei*, *Petriella sordida* und 8017 *Scopulariopsis sp.*. Die Analyse von *Petriella sp.* erfolgte im Rahmen dieser Arbeit und führte zu neuen interessanten Ergebnissen. Die Diversität an marinen Pilzen aus ein und derselben Schwammespezies wird durch gewisse Faktoren beeinflusst. Diese ist abhängig vom Ort der Probensammlung innerhalb des Mittelmeeres, von der Jahreszeit und dem Einfluss, den die kontrollierten Haltungsbedingungen (Aquarium vs. Wild) ausüben [Proksch *et al.*, 2008]. Viele der gewonnenen Pilzstämme gehören Gattungen an, die bereits aus dem terrestrischen Habitat bekannt sind, wie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma* und *Fusarium*, so dass eine wahre marine Herkunft dieser Stämme vielfach noch angezweifelt wird [Höller *et al.*, 2000; Kohlmeyer und Volkmann-Kohlmeyer, 2003]. Es wird für möglich gehalten, dass mehrere der bisher untersuchten marinen Pilze ihren Ursprung im terrestrischen Lebensraum, z.B. im Boden haben, wo sie irgendwann vom Meer rausgespült wurden und als Sporen überlebt haben. Andererseits wurden in den letzten Jahren zunehmend Beweise angesammelt, die auf eine Anpassung dieser ubiquitären Pilze an den marinen Lebensraum hindeuten [Geiser *et al.*, 1998; Alker *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 2002; Zuccaro *et al.*, 2004].

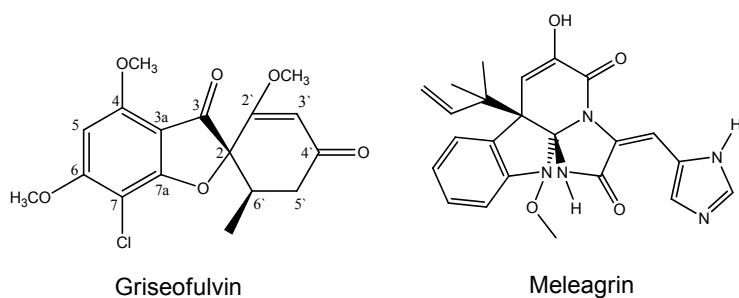
### **4.3. Marine Pilze als Arzneistoffproduzenten**

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollen dazu beitragen, den Stellenwert mariner Pilze für die Arzneistoffforschung zu beurteilen. Im Vergleich zu terrestrischen Arten sind an marine Pilze weitaus höhere Erwartungen bezüglich chemischer und funktioneller Diversität der Inhaltsstoffe geknüpft, bedingt durch die eingangs bereits dargestellten Anpassungsmechanismen mariner Organismen an die extremen Umgebungsbedingungen des marinen Lebensraumes. Die Tatsache, dass die marine Naturstoffforschung erst in jüngster Zeit eingesetzt hat und der marine Lebensraum mehr als 70% der Erdkugel ausmacht, weckt umso mehr die Forschungsambitionen, hier nach neuen pharmazeutisch nützlichen Leitstrukturen zu suchen. Da sich marine Naturstoffe besonders auf dem Gebiet der Zytostatikaforschung als nützlich erwiesen, soll hier auch die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methodik der gezielten Isolierung zytotoxischer Naturstoffe im bioassay-begleitendem Monitoring anhand der erzielten Ergebnisse bewertet werden. Aus vier verschiedenen Pilzstämmen wurden im Rahmen dieser Arbeit 12 Naturstoffe, darunter auch drei neue Substanzen, isoliert. Unter den Aspekten der chemischen und funktionellen Diversität sollen alle isolierten Pilzverbindungen diskutiert werden, um die Produktivität der untersuchten marinen Pilze aufzuzeigen.



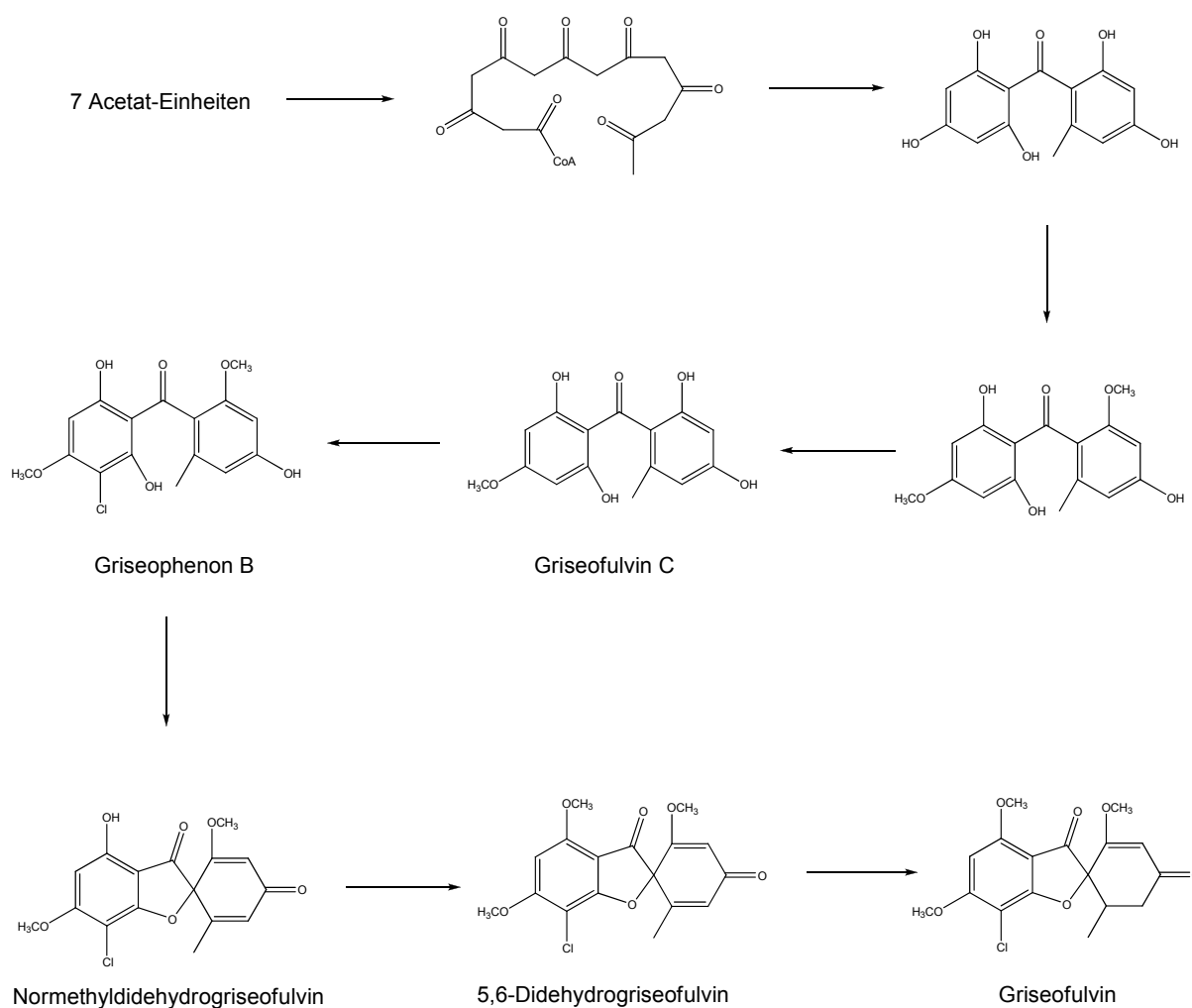
### 4.3.1. Inhaltsstoffe aus *Penicillium* spp.

Unter den 82 Isolaten aus *Suberites domuncula* befanden sich auch 10 verschiedene Stämme der Gattung *Penicillium*. Aus dem zytotoxisch aktivsten Kulturextrakt des Stammes 7980Bio wurden zwei bereits bekannte und für diese Gattung typische Naturstoffe isoliert. Hierbei handelte es sich um das Polyketid Griseofulvin und um das Alkaloid Meleagrinen.



Die Gattung *Penicillium* ist ubiquitär und zählt zu einer der größten im Reich der Pilze. Die Biodiversität ist sehr hoch und wird mit etwa 225 verschiedenen Arten taxonomisch beschrieben. Arten von *Penicillium* sind bereits bekannt als Produzenten von Polyketiden, Alkaloiden, Terpenoiden und Peptiden. Besonders marine *Penicillium*-Stämme erwiesen sich hinsichtlich zytotoxischer Naturstoffe als sehr produktiv, denn von den bisher isolierten 180 Verbindungen zeigten 81 zytotoxische Eigenschaften [Grovel *et al.*, 2008].

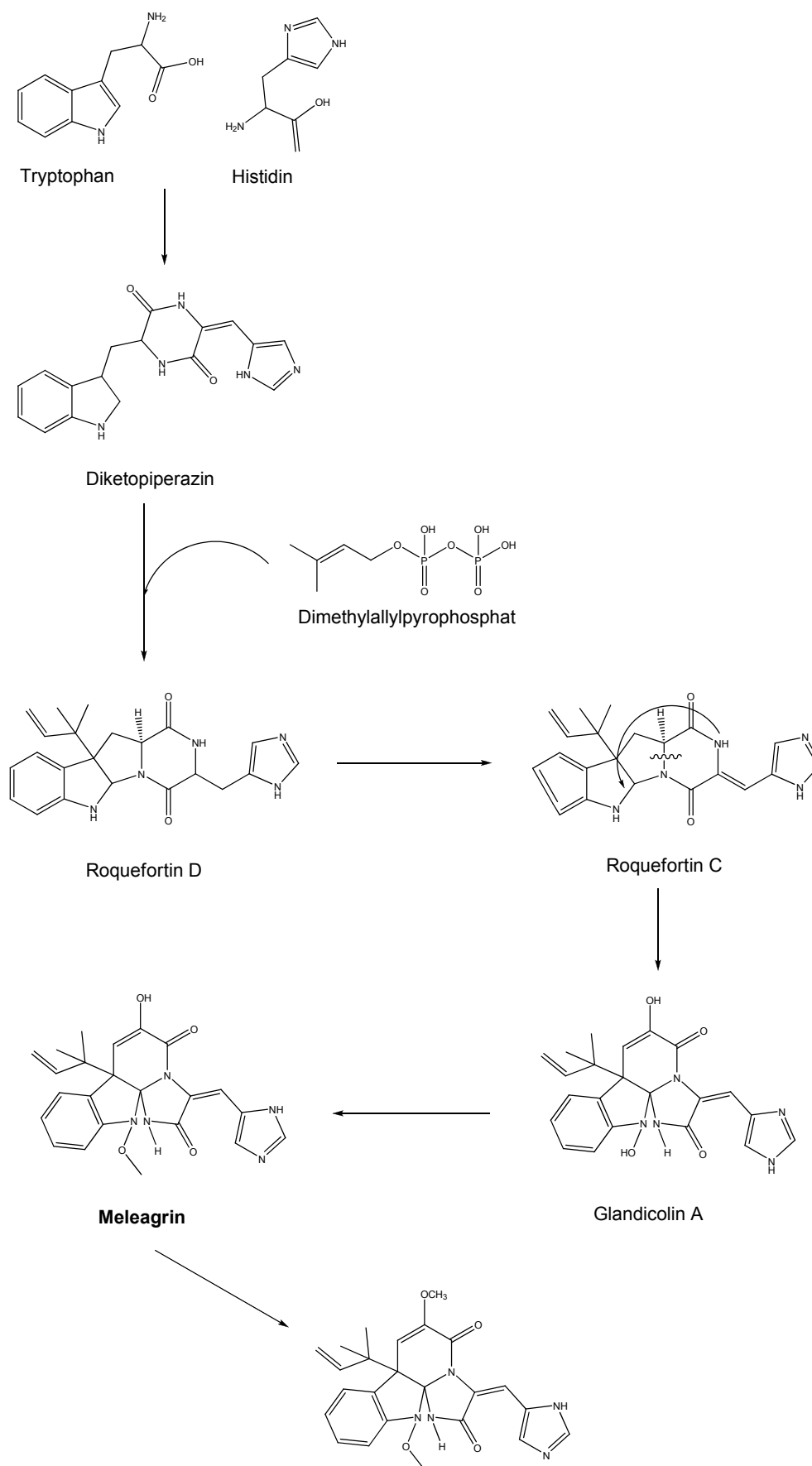
**Griseofulvin** (7980Bio11/12): Griseofulvin wurde erstmals bereits im Jahre 1939 aus Kulturlösungen von *Penicillium griseofulvum* isoliert und später auch in anderen Arten der Gattung *Penicillium* entdeckt. Andere Gattungen erwiesen sich ebenfalls als Produzenten von Griseofulvin, wie z.B. ein Pilz mit der taxonomischen Bezeichnung *Memnoniella echinata* [Jarvis *et al.*, 1996]. Ebenso zeigten Arbeiten unseres Arbeitskreises, dass auch *Suberites domuncula* mit *Botryosphaeria stevensii* noch einen weiteren Produzenten von Griseofulvin beherbergt [Indriani, 2007]. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein Benzofuran-Derivat, das über eine Spirobrücke mit einem Cyclohexenon-Ringsystem verknüpft ist. Charakteristisch sind zwei besondere Strukturmerkmale: Zum einen die zwei Ketonringe, die zusammen ein Spiroringssystem ausbilden und andererseits der Enolether eines unsymmetrisch gebauten  $\beta$ -Diketons [Stork and Tomasz, 1964]. Griseofulvin gehört biogenetisch zur großen Verbindungsklasse der Polyketide, denn es ist ein Heptaketid, das aus sieben Acetat-Einheiten gebildet wird. Die Biosynthese verläuft über eine Claisen- und eine Aldolkondensation [Seigler, 1995].



**Abb. 4.1:** Biosynthese von Griseofulvin [Seigler, 1995]

Als orales Antimykotikum zur Behandlung von Haar-, Nagel- und Hautmykosen wird Griseofulvin als Arzneimittel heutzutage nur noch selten bei therapierefraktären Formen eingesetzt und wird weitestgehend durch Azole wie Itraconazol und Terbinafin ersetzt. Die fungistatische Wirkung wird durch spezifische Bindung zum Pilztubulin erklärt [Pirung *et al.*, 1991]. Griseofulvin beeinträchtigt als Spindelgift die Funktion der Mikrotubuli und erwirkt dadurch eine Mitosehemmung. Dem Griseofulvin wurden leichte zytotoxische Eigenschaften nachgewiesen: In einer Konzentration von 10µg/ml reduzierte die Substanz die Proliferation von L5178Y-Zellen auf 44,6% [Indriani, 2007].

**Meleagrín** (7980Bio25-28): Meleagrín ist ein strukturell sehr komplex aufgebautes Alkaloid, das erstmals im Jahre 1979 aus Kulturlösungen des gleichnamig benannten Pilzes von *Penicillium meleagrinum* isoliert wurde [Nozawa and Nakajima, 1979]. Als ursprüngliche natürliche Quelle wurde die Art *Penicillium meleagrinum* gemäß diesem Hauptmetaboliten benannt [Kawai *et al.*, 1984]. Wie für Alkaloide typisch wird auch das Meleagrín biogenetisch von Aminosäuren abgeleitet. Die Bildung erfolgt auf dem sogenannten Roquefortin/Oxalin-Biosyntheseweg [Reshetilova *et al.*, 1995] (vgl. Abb. 4.2). Ausgehend von den beiden Aminosäuren Tryptophan und Histidin, ist der erste Schritt die Bildung des Diketopiperazin-Systems [Nozawa and Nakajima, 1979]. Dieses Diketopiperazin wird anschließend an einer Dimethylallylphosphat-Einheit gekoppelt, woraus das Roquefortin C und D hervorgehen. Aus diesen entsteht dann durch N-Methylierung und darauffolgende O-Methylierung zunächst das Glandicolin A als die Vorstufe des Meleagríns. Aus Meleagrín entsteht das Oxalin als Endprodukt dieser Biosynthese. Unterarten der Gattung *Penicillium* sind bereits als Produzenten solcher Alkaloide, die aus diesem Roquefortin/Oxalin-Biosyntheseweg hervorgehen, bekannt. Der Roquefortin/Oxalin-Biosyntheseweg wird in allen Arten von *Penicillium ser. Corymbifera* besprochen [Overy *et al.*, 2005]. Meleagrín besitzt antimikrobielle Eigenschaften und gehört einer besonderen Toxinklasse an, den sogenannten tremorgenen Mykotoxinen. Diese sind von Pilzen produzierte Toxine, welche Tremor verursachen [Walter, 2002]. Meleagrín wurde in unserem Arbeitskreis aus algenassoziierten *Penicillium citrinum* isoliert und auch positiv auf zytotoxische Eigenschaften hin getestet: Dabei zeigte Meleagrín in einer Konzentration von 10 µg/ml eine Reduktion des Wachstums von L5178Y-Tumorzellen auf 1,6 % [Indriani, 2007].



**Abb. 4.2:** Roquefortin/Oxalin Biosyntheseweg in *Penicillium ser. Corymbifera* [Overy *et al.*, 2005]

#### **4.3.2. Inhaltsstoffe aus *Chaetomium* sp.**

Arten der ubiquitären Gattung *Chaetomium* wurden bereits mehrfach aus verschiedenen marinen Quellen in unserem Arbeitskreis isoliert. Aus *Chaetomium* sp., die mit dem Schwamm *Tethya* sp. assoziiert sind, wurden die drei verwandten Alkaloide Chaetomin, Cochliodinol und Semicochliodinol erhalten [Indriani, 2007]. Alle drei Alkaloide erwiesen sich zudem als stark zytotoxisch in Tests an L5178Y-Zellen. Erst kürzlich wurde über zytotoxische Metaboliten aus *Chaetomium globosum* berichtet, der als endophytischer Pilz aus Blättern von Ginkgo-biloba isoliert wurde [Qin *et al.*, 2009]. Bei den Metaboliten handelt es sich um ein neues chloriertes Azaphilon-Derivat mit dem Trivialnamen Chaetomugilin D und um drei bereits bekannte namens Chaetomugilin A und Chaetoglobosin der Reihe A und C. Diese vier zytotoxischen Naturstoffe wurden gezielt in eine bioassay-begleitende Fraktionierung des Extrakts aus Kulturen von *Chaetomium globosum* aufgespürt und isoliert. Alle vier Verbindungen zeigten signifikante Antitumorwirkung im sogenannten „brine shrimp-Assay“ mit *Artemia salina* als Testsystem. Auch in unserem Arbeitskreis wurde *Chaetomium globosum* als Endophyt aus verschiedenen Rotalgen des Pazifischen Ozeans isoliert [Teuscher, 2005]. Als Metaboliten wurden hieraus Alkaloide, wie das Neoechimulin A, Cladosporine und auch ein Furanderivat, das Aureonitol, isoliert.

**Chaetochromin A** (ChaetoSX51-55IX)

Als Produzenten des Chaetochromin A wurden bereits im Jahre 1963 *Chaetomium spp.* beschrieben [Shibata and Ogihara, 1963]. Die Ursprungsquelle, woraus dieser Naturstoff später erstmals isoliert wurde, war die Art *Chaetomium thielavioideum* [Sekita *et al.*, 1980]. Die grosse Familie der Chaetochromine und Ustilaginoidine gehört zur Stoffklasse der Bis-(naphtho- $\gamma$ -pyrone), wobei das Chaetochromin A ein Tetrahydrohexahydroxy-Analogon eines solchen Grundkörpers darstellt. Einige chemisch verwandte Verbindungen, die Ustilaginoidine der Reihen A-C, wurden als die roten Pigmentfarbstoffe des *Claviceps virens* (*Ustilagoidea virens*) identifiziert [Koyama *et al.*, 1988]. Die schmutzig-roten Kugeln auf „infiziertem“ Reis bestehen aus diesen Pigmenten, die im Zuge der Besiedlung der Pflanze durch den Pilz abgesondert werden. Weitere Metaboliten des *Claviceps virens* sind die Ustilaginoidine D-J. Chaetochromin A ist mit dem Ustilaginoidin D am meisten chemisch verwandt, da diese Stereoisomere sind. Hinsichtlich der biologischen Aktivitäten erwies sich Chaetochromin A als ein Mykotoxin, denn es verhielt sich toxisch in Tests an Versuchstieren [Ito and Ohtsubo, 1987]. Antitumorale Eigenschaften des Chaetochromin A wurden am National Cancer Institute aufgedeckt [Koyama *et al.*, 1988; Ito and Ohtsubo, 1987]. Bis-(naphtho- $\gamma$ -pyrone) wurden auch aus anderen Quellen isoliert. Berichtet wurde über vier neue Naturstoffe aus dieser Verbindungsklasse, die aus Pilzextrakten von *Fusarium sp.* isoliert wurden. Es handelt sich hierbei um die vier unsymmetrischen Bis-(naphtho- $\gamma$ -pyrone) mit den Namen Isochaetochromine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>) und das Oxychaetochromin B. Diese vier Stoffe wurden bei einem gezielten Screening von Pilzextrakten im Rahmen der Forschung auf dem Gebiet der Anti-HIV-Therapeutika entdeckt. Alle vier Naturstoffe erwiesen sich hierbei als Inhibitoren der HIV-1 Integrase [Singh *et al.*, 2003]. Dahingehende Untersuchungen sind für die Entwicklung in der Anti-HIV-Therapie von besonderer Bedeutung, denn die HIV-1 Integrase wäre ein sehr sicheres Target, da dieses virale Enzym nicht in Zellen von Säugetieren vorkommt. Außerdem wird der gesamte Vorgang der Integration der viralen DNA in jene der Wirtszelle lediglich von diesem einen Enzym katalysiert. Der Integrationsprozess läuft in drei Schritten ab [Craigie, 2001; Esposito and Craigie, 1999] und stellt einen wesentlichen Vorgang im Lebenszyklus des HIV-1 Virus dar.

### 4.3.3. Inhaltsstoffe aus *Petriella* sp.

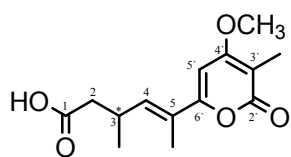
Von Pilzen dieser Gattung sind nur wenige Arten bekannt und auch in Bezug auf Inhaltsstoffe ist bisher erst wenig berichtet worden. Bekannt sind *Petriella*-Arten jedoch für die Produktion peptidischer Verbindungen. Das Petriellin A ist ein höhermolekulares zyklisches Peptid aus 13 Aminosäuren, das aus *Petriella sordida* isoliert wurde und antimykotische Eigenschaften besitzt [Lee and Gloer, 1995]. Ein weiteres zyklisches Tetrapeptid wurde unter dem Patentnamen WF-3161 als Metabolit von *Petriella guttulata* beschrieben [Kawai *et al.*, 1986] und wurde im Rahmen dieser Arbeit durch bioassay-begleitende Fraktionierung des large-scale Extraktes aus einem marinen *Petriella*-Stamm isoliert.

#### Antibiotic WF-3161

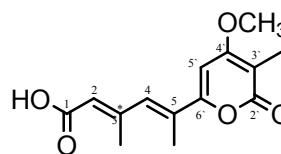
Das zyklische Tetrapeptid wird trivial auch als Antibiotic WF-3161 bezeichnet [Kawai *et al.*, 1986]. Im Trivialnamen steht 3161 für die Stamm-Nr. der terrestrischen Species *Petriella guttulata*, woraus dieses Tetrapeptid ursprünglich erstmals isoliert wurde. Der Präfix Antibiotic beschreibt ein Teil der bioaktiven Eigenschaften dieser Substanz, die sowohl hinsichtlich antimikrobieller als auch zytotoxischer Effekte positiv getestet wurde [Umehara *et al.*, 1983]. Die antibiotische Wirkung wurde in einem Standard Agar-Diffusionstest mit *Trichophyton asteroides* als Testorganismus nachgewiesen. Bioassays mit anderen Mikroorganismen zeigten aber keine signifikanten Hemmwirkungen. Von erheblich höherer Relevanz war jedoch die erwiesene starke Hemmwirkung auf Tumorzellen, die in Einklang mit den Testergebnissen dieser Arbeit gebracht werden konnte, denn in beiden Fällen dienten, wenn auch unterschiedliche Typen, maligne murine Lymphozyten als Testsystem. Umehara *et al.* zeigten durch in vivo-Tests, daß die mittlere Überlebensrate von Mäusen, denen Lymphomazellen vom Typ P-388 implantiert wurden, durch Verabreichung von WF-3161 signifikant höher ist als bei der Kontrollgruppe. Diese Resultate konnten im Rahmen dieser Arbeit durch *in vitro*-Tests an L5178Y-Zellen bezüglich der isolierten Reinsubstanz PLS5/6DCM bekräftigt werden. Die Reinsubstanz PLS5/6DCM zeigte bei einer Konzentration von 3 µg/ml eine vollständige Wachstumshemmung an L5178Y-Zellen. Erstmals wurde hiermit dieser hochaktive Naturstoff aus einer marinen Quelle isoliert.



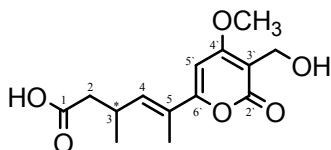
## Infectopyron-Analoga (neue Naturstoffe)



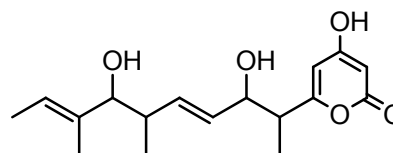
Dihydroinfectopyron



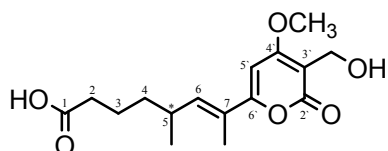
Infectopyron



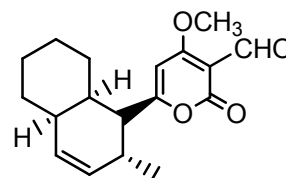
3'-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron



ACRL Toxin II



Dihomo-3'-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron



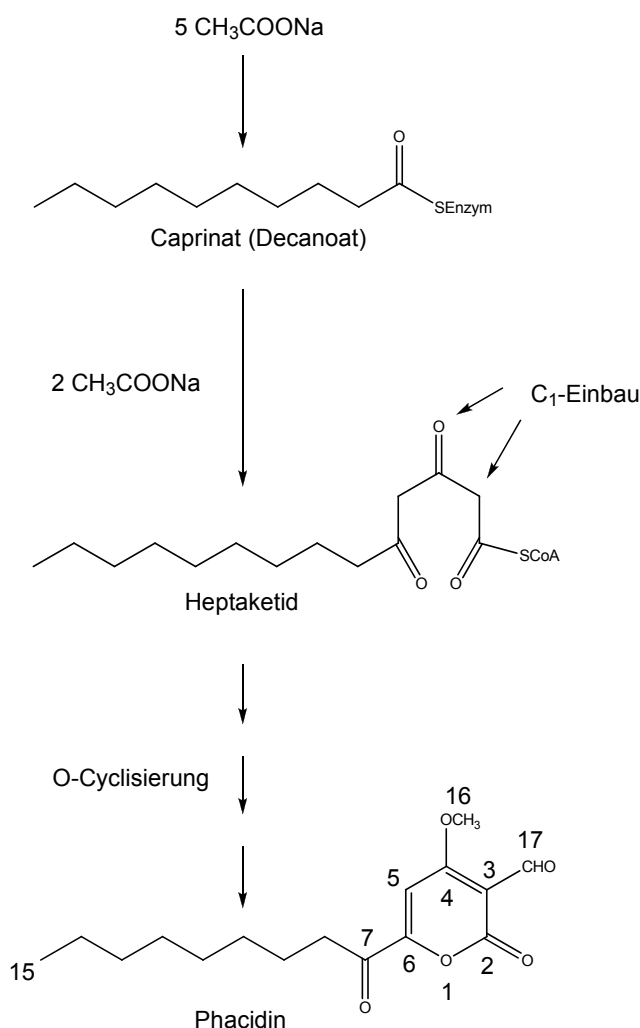
Solanopyron A

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei neue Naturstoffe aus *Petriella sp.* isoliert und damit auch gleichzeitig eine für diese Pilzart neue Stoffklasse definiert werden. Diese drei neuen Verbindungen gehören zur Klasse der  $\alpha$ -Pyrone und sind strukturell vom Infectopyron abgeleitet. Dieses wurde erstmals aus dem Pilz *Alternaria infectoria* isoliert und als potentielles Mykotoxin beschrieben, da es strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Toxinen aufwies [Larsen *et al.*, 2003]. Pilze der Gattung *Alternaria* infizieren Getreide und Nahrungsmittel und sind bekannt für die Produktion von  $\alpha$ -Pyrone, die als Toxine gelten. Alle diese Toxine besitzen den gleichen Pyrongrundkörper, können jedoch bezüglich ihrer Seitenkette stark variieren wie z.B. das Solanopyron A aus der gleichnamigen Species *Alternaria solani* [Ichihara *et al.*, 1985], das statt einer linearen Seitenkette einen einfach ungesättigten zehngliedrigen Bicyclus besitzt. Am Pyronsystem hingegen unterscheidet es sich vom Infectopyron lediglich durch den Substituent an Position 3', der statt einer Methylgruppe wie beim Infectopyron, eine Aldehydgruppe darstellt. Als weitere Produzenten des Infectopyrons wurden zwei *Stemphylium sp.* (*S. sarciniforme* und *S. vesicarium*) und *Ulocladium consortiale* beschrieben [Andersen and Thrane, 1996].

*Stemphylium eturmiunum* wurde später in kontaminierten Tomaten detektiert und erwies sich in Reinkultur als Produzent von Infectopyron [Andersen and Frisvad, 2004].

Im Zytotoxizitäts-Assay an murinen Leukämiezellen vom Typ P388 zeigte Infectopyron keine signifikanten Hemmwerte. Die ermittelte  $ID_{50}$  lag über 25  $\mu\text{g/ml}$ . Strukturell unterscheiden sich die neuen Naturstoffe im Vergleich zum Infectopyron in der Seitenkette und auch bezüglich der 3`-Substitution am Pyronring. Am nächsten verwandt mit dem Infectopyron ist das isolierte Dihydroinfectopyron, dem lediglich die Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3 in der Seitenkette fehlt. Dieses Dihydro-Analogon zeigte aber im Zytotoxizitäts-Assay beachtliche Hemmwerte an allen drei angewandten Testsysteme: Die  $ED_{50}$ -Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] betragen 0.17 an L5178Y-Zellen, 2.3 an menschlichen HeLa-Zellen und noch  $>10$  an PC12-Zellen. Die Substitution der Methylgruppe im Pyronring durch eine Hydroxymethylenfunktion zeigte beim 3`-Hydroxymethyl-Dihydroinfectopyron jedoch drastische Einbußen an zytotoxischer Hemmwirkung: Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  wurde noch ein Wachstum der L5178Y-Zellen von 84% ermittelt. Umgekehrt bedeutet dies nur noch eine Hemmung der murinen Lymphomazellen von 16%. Beim Dihomo-3`-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron handelt es sich um ein Homologes des vorangegangenen, das über eine um zwei Methylenheiten verlängerte Seitenkette verfügt. Auch bei diesem Analogon waren die Hemmwerte aus den Zytotoxizitätsteste nicht signifikant: Bei einer Substanzkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$  wurde noch ein Zellwachstum der murinen Lymphomazellen von 54,1% beobachtet. Basierend auf diesen Testergebnissen können nun Aussagen bezüglich einiger Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Infectopyron-Analoga gemacht werden. Offensichtlich ist das Substitutionsmuster am Pyronring, wie es beim Infectopyron und dem Dihydro-Analogon vorliegt, essentiell für die zytotoxischen Eigenschaften. Die Einführung eines größeren Substituenten, speziell einer Hydroxymethylengruppe, am Pyronring geht offensichtlich mit erheblichen Aktivitätseinbußen einher. Eine Verlängerung der Seitenkette scheint sich hier allerdings eher günstig auf die Hemmeigenschaften gegenüber proliferierenden Zellen auszuwirken. Der Biosyntheseweg den  $\alpha$ -Pyrone beschreiten wurde für das Phacidin untersucht. Das Phacidin ist ein Metabolit aus Pilzkulturen von *Potrebniomyces balsamicola* und besitzt antibiotische Eigenschaften. In Analogie zu den drei isolierten Infectopyron-Derivaten aus *Petriella sp.* ist der Pyronring des Phacidins an den gleichen Positionen substituiert, jedoch sind zwei von den drei Substituenten unterschiedlich.

Die Untersuchungen zum Ablauf der Biosynthese erfolgten durch Fütterungsexperimente mit heranreifenden Kulturen von *Potrebniomyces balsamicola*. Hierzu wurden die Kulturen mit  $^{13}\text{C}$  angereicherten Precursoren gefüttert und die Verteilung der  $^{13}\text{C}$ -Markierungen am resultierenden Phacidin beobachtet. Bei den Precursoren handelte es sich um Natriumacetat, das mit einfacher ( $\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ ) und auch doppelter ( $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ ) Markierung eingesetzt wurde. Diese beiden Markierungen zeigten, dass Phacidin aus einem Heptaketid als Vorstufe entsteht. Weitere Fütterungsexperimente mit markiertem Natriumformiat ( $\text{H}^{13}\text{COONa}$ ) verrieten, dass die Kohlenstoffatome der Methoxygruppe und der Aldehydfunktion einzeln eingebaut werden [Cyr and Poulton, 1982].

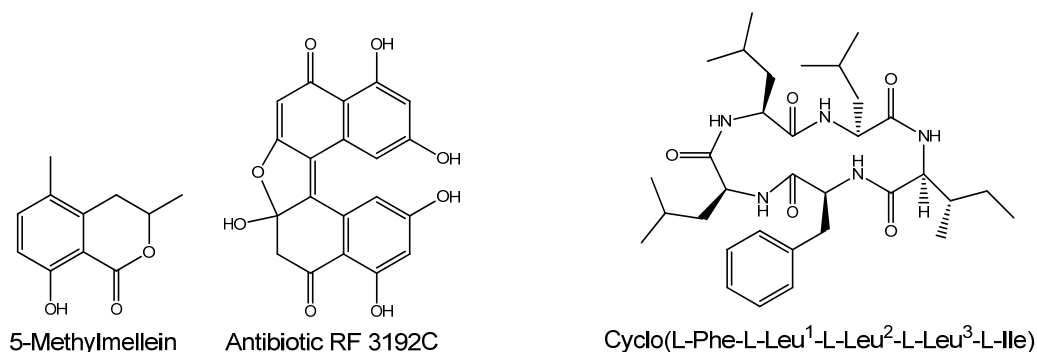


**Abb. 4.3:** Möglicher Biosyntheseweg der  $\alpha$ -Pyrone am Beispiel des Phacidins [Cyr and Poulton, 1982]

#### 4.3.4. Inhaltsstoffe aus *Nodulisporium sp.*

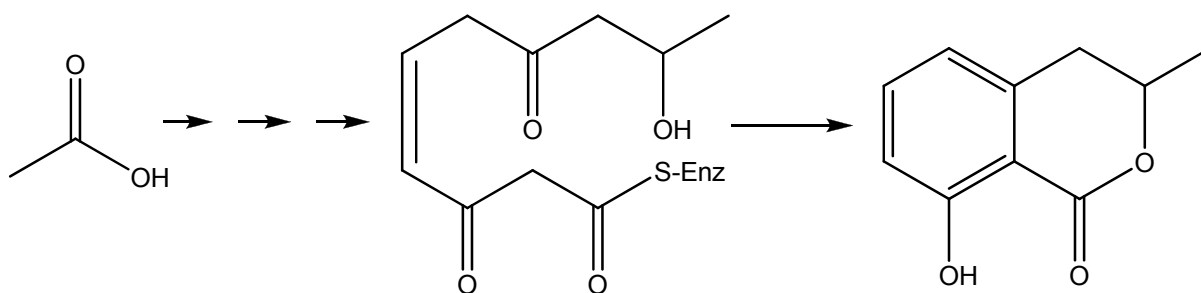
Neuste Untersuchungen an marinen *Nodulisporium sp.* ergaben, dass u.a. Pilze dieser Gattung die größte Anzahl an Metaboliten pro Isolat synthetisieren [Schulz *et al.*, 2008]. Charakteristisch für diese Pilzgattung ist die grosse Stoffklasse der Polyketide. Zahlreiche neue Naturstoffe, die aus dieser Gattung erstmals entdeckt und isoliert wurden, sind anhand ihres Trivialnamens als Metaboliten von *Nodulisporium* zu erkennen. Die Nodulisporine A-F sind mit Ausnahme des Nodulisporin C und F Derivate des Naphthalins. Die ersten beiden aus dieser Reihe sind dimere Naphthaline, das Nodulisporin C ist ein dimeres Indanon [Dai *et al.*, 2006], die der Reihe D und E sind Naphthalin-Chromane und das Nodulisporin F ist ein Benzochroman [Dai *et al.*, 2009]. Arten von *Nodulisporium* wurden im Rahmen dieser Arbeiten als Endophyten aus zwei unterschiedlichen Pflanzen isoliert. Aus Zweigen von *Juniperus cedre* stammen die Produzenten der Nodulisporine A-C. Eine Reihe weiterer Polyketide aus diesen Arten waren Derivate des Benzophenons, des Naphthalins und unterschiedliche vom Chromangrundkörper abgeleitete Stoffe, wie Chromanone, Chromenone und Chromene [Dai *et al.*, 2006]. *Nodulisporium*-Isolate aus *Erica arborea* waren die Produzenten der Nodulisporine der Reihe D-F. Auch dieses Isolat enthielt viele weitere Polyketide wie Benzophenone, disubstituierte Naphthaline, Chromenone und Chromene. In unterschiedlichen Bioassays konnten allen Nodulisporinen antimykotische, antibiotische und algizide Eigenschaften nachgewiesen werden [Dai *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2006]. Weitere Metaboliten aus *Nodulisporium sp.* sind die beiden Tetralole Nodulisporol und Nodulisporon, die sich zusammen mit einigen Dihydroisocumarinen als Inhibitoren der humanen DNA-Polymerase lambda (Pol  $\lambda$ ) erwiesen [Kamisuki *et al.*, 2007]. Diese DNA-Polymerasen, wovon das menschliche Genom insgesamt 14 codiert, sind für die DNA-Synthese notwendig. Das Nodulisporacid A ist ein Derivat der Tetransäure und moderat aktiv gegen Plasmodien. Dieser Metabolit stammt aus marinen Arten von *Nodulisporium*, die aus Weichkorallen isoliert wurden [Kasettrathat *et al.*, 2008]. Aus *Nodulisporium sp.* wurden auch Verbindungen isoliert, die nicht zur Klasse der Polyketide gehören: Bei der aus insgesamt neun Naturstoffen bestehenden Reihe der Nodulisporinsäuren handelt es sich chemisch um Diterpen-Indolalkaloide [Ondeyka *et al.*, 2003; Ondeyka *et al.*, 2002; Hensens *et al.*, 1999; Ondeyka *et al.*, 1997]. Die Nodulisporinsäuren der Serie A wurden als potentielle Insektizide beschrieben [Shoop *et al.*, 2001; Ostlind *et al.*, 1997].

Nodulisporinsäure A soll als systemisch eingesetztes Agens gegen Flöhe bei Hunden scheinbar keine toxischen Wirkungen besitzen, da es an ein Target angreift, das nur innerhalb Insekten vorkommt. Nodulisporin A moduliert glutamat-gesteuerte Chloridkanäle, die nur in Insekten und nicht im Säugetierorganismus zu finden sind [Shoop *et al.*, 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei aromatische Polyketide und ein cyclisches Pentapeptid aus *Nodulisporium sp.* isoliert.



### 5-Methylmellein (NV2K8SP1/3)

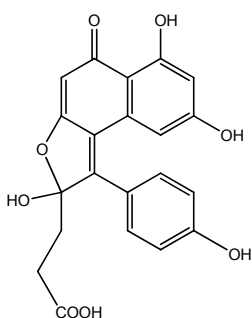
Das 5-Methylmellein ist chemisch betrachtet ein trisubstituiertes Dihydroisocumarin, das biogenetisch zur Klasse der aromatischen Polyketide gehört. Dieser Naturstoff wurde erstmals im Jahr 1966 aus dem Pilz *Fusicoccum amygdali* isoliert [Ballio *et al.*, 1966]. Als Pflanzenpathogen dringt dieser Pilz in Form von Sporen über Wundstellen in pflanzliche Abschlussgewebe oder über offene Stomata ins pflanzliche Gewebe ein und sezerniert ein Terpenoid, das Fusicoccin. Über die Erhöhung des Kaliumeinstroms in den Stomatazellen, wird deren permanente Öffnung induziert, so dass die Pflanze durch einen hohen Wasserverlust schließlich austrocknet ([www.biologie.uni-hamburg.de](http://www.biologie.uni-hamburg.de)). Als Welktoxin, produziert von *Fusicoccum amygdali* wird Fusicoccin bereits im Jahre 1964 beschrieben [Ballio *et al.*, 1964]. 5-Methylmellein wurde auch aus *Cephalosporium sp.* isoliert [Bi *et al.*, 2007].



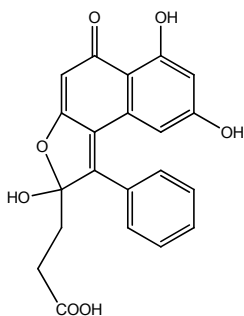
**Abb. 4.4:** Biosynthese von Mellein in *Aspergillus melleus* [Abell *et al.*, 1983]

**Antibiotic RF 3192C (NVLC6SX8(43-49))**

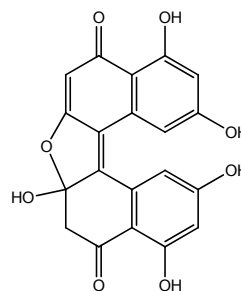
Die aus Kulturen von *Nodulisporium sp.* isolierte Verbindung mit dem Trivialnamen Antibiotic RF 3192C ist eine von drei patentgeschützten Substanzen, die als Therapeutika bei diabetischen Folgeerkrankungen vorgesehen sind. Die Patentierung umfasst die drei Naturstoffe, den Mikroorganismus und das Herstellungsverfahren. Bei dem Mikroorganismus, aus dem die drei Naturstoffe erstmals isoliert wurden, handelt es sich um den Pilz *Chaetomella circinosea*, der die Stammbezeichnung RF-3192 trägt. Das patentierte Herstellungsverfahren umfasst die Kultivierung von *Chaetomella circinosea* und die Isolierung der Substanzen, die als Fermentationsprodukte dieses Pilzes gelten, aus dem Kulturmedium. Die drei Naturstoffe Antibiotic RF-3192 A-C wurden patentiert als Aldose-Reduktase-Inhibitoren [Yoshida *et al.*, 1993].



Antibiotic RF 3192A

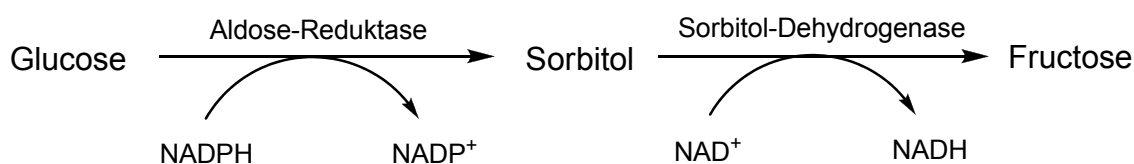


Antibiotic RF 3192B

**Antibiotic RF 3192C**

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus führt in den meisten Fällen zu einer Reihe weiterer Folgeerkrankungen, die als diabetische Spätkomplikationen bezeichnet werden. Diese beziehen sich auf Gefäßwandverletzungen der Blutgefäße in verschiedenen Organen als Konsequenz der diabetischen Stoffwechsellage. Je nach Art bzw. Weite der Blutgefäße wird hier zwischen Makro- und Mikroangiopathie differenziert. Mit Makroangiopathie ist die Entstehung der Artherosklerose gemeint, während die Mikroangiopathie organische Langzeitschäden meint, die durch Verletzung der feinsten Kapillargefäße verursacht werden. Die Mikroangiopathie manifestiert sich in diabetischer Neuropathie, Nephropathie, Retinopathie, Keratopathie und als diabetischer Katarakt. Als mögliche Mechanismen der Pathogenese werden die Glucosylierung von Proteinen an Stellen von Lysinresten, die Peroxidation freier Radikale und die Akkumulierung von Polyol (z.B. Sorbitol) im Zuge des Polyol-Metabolismus verstanden.

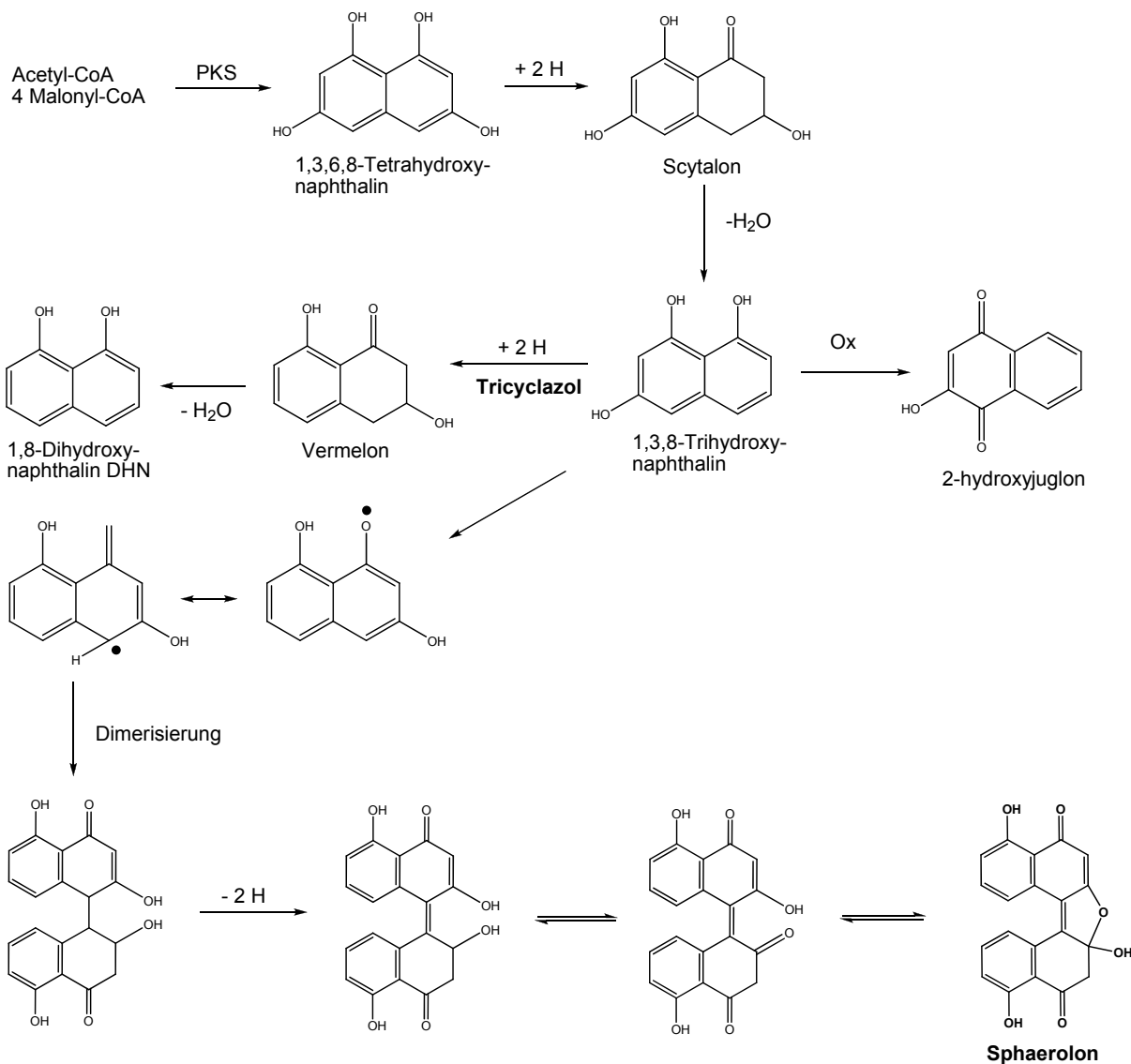
Im letztgenannten Polyol-Stoffwechselweg liegt das Target der drei patentierten Naturstoffe. Die Aldose-Reduktase ist eine Oxidoreduktase, deren Substrat die Glucose ist und das in Blutgefäßen, peripheren Nervenzellen, Retina und in der Augenlinse lokalisiert ist. Beim Diabetes kann die zu große Menge an Glucose in den Zellen nicht mehr allein durch die Glykolyse bewältigt bzw. metabolisiert werden, so dass dann der Abbau der Glucose über dem Polyol-Metabolismus gefördert wird. Das Produkt, das im Zuge dieses Stoffwechselweges aus Glucose entsteht und angereichert wird, ist der Zuckeralkohol Sorbitol. Dadurch kommt es zu einer vermehrten osmotischen Aufnahme von Wasser in die Zellen und zur Störung der normalen Zellfunktionen. Da die Aldose-Reduktase ein zentrales Enzym im Polyol-Metabolismus ist, kann durch Hemmung ihrer Aktivität die abnorme Akkumulierung von Sorbitol unterbunden und die normale Zellfunktion aufrechterhalten werden. Aldose-Reduktase-Inhibitoren scheinen die Möglichkeit zu bieten, diabetischen Langzeitkomplikationen vorzubeugen oder deren Progression trotz erhöhtem Blutzuckerspiegel aufzuhalten [Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003].



**Abb. 4.5:** Polyol-Metabolismus [Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003]

Chemisch betrachtet ist Antibiotic RF 3192C ein Bisnaphthalin-Derivat, das nahe verwandt ist mit dem Sphaerolon und dem Dihydrosphaerolon, die beide als Bisnaphthyl-Pigmente erstmals aus dem gleichnamigen Pilzstamm *Sphaeropsidales sp.* F-24`707 isoliert wurden [Bode and Zeeck, 2000]. Um jedoch diese beiden Metabolite zu erhalten, wurde durch Zusatz von Tricyclazol gezielt in die Biosynthese eingegriffen. Der Pilzstamm *Sphaeropsidales sp.* F-24`707 war nämlich für die Produktion von Spirobisnaphthaline, wie v.a. Cladospiron-bisepoxid als Hauptmetabolit, bekannt [Petersen *et al.*, 1994; Thiergardt *et al.*, 1994, 1995]. Spirobisnaphthaline entstehen aus zwei Einheiten des 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) [Bode *et al.*, 2000]. Um andere Metaboliten zu detektieren als Spirobisnaphthaline, wurde der Einfluß von Tricyclazol als Inhibitor dieses Biosyntheseschritts untersucht [Woloshuck *et al.*, 1980].

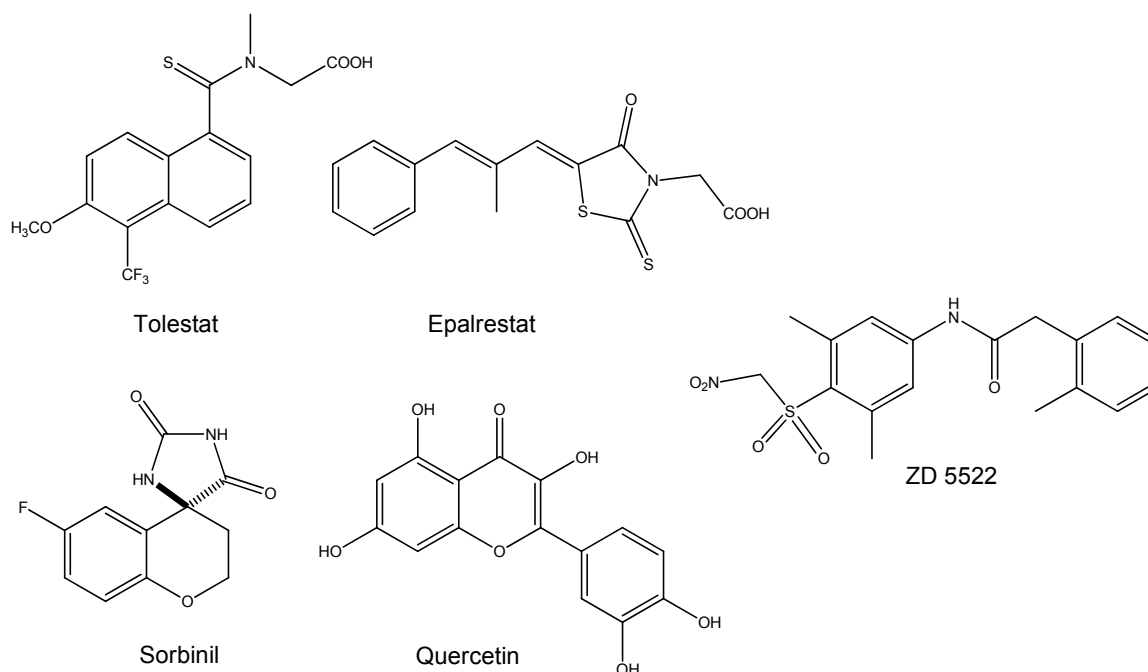
Die Biosynthese dieses DHN-Bausteins wurde gezielt mit Tricyclazol inhibiert und dadurch der Pilz zur Bildung der beiden Sphaerolone angeregt. Antibiotic RF 3192C ist die einzige in der Literatur beschriebene Verbindung, die Ähnlichkeiten mit den beiden Sphaerolonen besitzt. Diese chemische Analogie legt nahe, dass Antibiotic RF 3192C auf einem identischen Biosyntheseweg entsteht. Die Biosynthese des Sphaerolons läuft folgendermaßen ab:



**Abb. 4.6:** Gezielte Biosynthese des Sphaerolons in *Sphaeropsidales sp. F-24`707*  
[Bode and Zeeck, 2000]



Die Polyketid-Synthase (PKS) formt aus Acetyl-CoA und den vier Malonyl-CoA-Einheiten das 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin, das anschließend zum Scytalon reduziert wird. Aus dem Scytalon entsteht unter Dehydratisierung das 1,3,8-Trihydroxynaphthalin, als ein zentrales Intermediärprodukt, von dem aus die Biosynthese, je nach Bedingungen, unterschiedliche Wege einschlagen kann. Ohne äußeres Eingreifen, d.h. ohne Zusatz des Inhibitors Tricyclazol, erfolgt die Bildung des 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) über das Vermelon als Zwischenstufe. Dieses DHN fungiert dann als der Precursor für die Bildung der Spirobisnaphthaline, als den natürlichen Produkten des *Sphaeropsidates*-Stamms F-24'707 [Bode *et al.*, 2000]. Durch Zusatz niedriger Konzentrationen des Tricyclazols wird jedoch die Reduktionsreaktion des 1,3,8-Trihydroxynaphthalins zum Vermelon inhibiert [Woloshuk *et al.*, 1980], was die Akkumulation des 1,3,8-Trihydroxynaphthalins zur Folge hat. Unter aeroben Bedingungen kann dieses leicht zum 2-Hydroxyjuglon oder zum Radikal aufoxidiert werden. Über eine Dimerisierung des Radikals und anschließenden Oxidation entsteht ein tautomeres System. Die Umwandlung dieser tautomeren Form zum Sphaerolon unterliegt einem thermodynamisch kontrollierten Gleichgewicht und läuft wahrscheinlich nicht enzymatisch ab. Die Keto-Enol-Tautomerie und nicht stereospezifische Bildung des Hemiketals würde zu beiden Enantiomeren des Sphaerolons führen. In der Literatur sind bereits mehrere Bisnaphthaline aus Pilzen beschrieben [Bode *et al.*, 2000; Krohn *et al.*, 1994, 1999; Arnone *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1999] und alle können als Dimerisierungsprodukte auf diesem DHN-Weg charakterisiert werden. Für einen Aldose-Reduktase-Inhibitor ist das Antibiotic RF 3192C strukturell einzigartig. Andere Inhibitoren sind völlig anders strukturiert. Bis heute ist eine breite Vielfalt strukturell variabler Naturstoffe identifiziert worden, die *in vitro* als potente Aldose-Reduktase-Inhibitoren gelten [Constantino *et al.*, 1997]. Inhibitoren der Aldose-Reduktase wurden aus terrestrischen und marinen Quellen und aus Mikroorganismen isoliert [Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003]. Strukturell können Aldose-Reduktase-Inhibitoren in vier Stoffklassen eingeteilt werden: Essigsäure-Derivate sind Tolrestat und Epalrestat, das Sorbinil ist ein cyclisches Imid, das Quercetin ein Phenol-Derivat und beim ZD 5522 handelt es sich um ein Phenylsulfonylnitromethan-Derivat [Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003].



**Abb. 4.7** : Aldose-Reduktase-Inhibitoren aus verschiedenen Stoffklassen

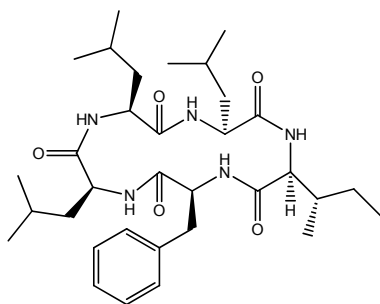
[Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003]

Als Testsystem für die Ermittlung der Bioaktivitäten der einzelnen Aldose-Reduktase-Inhibitoren wurden Homogenate aus Augenlinsen von Tieren, wie z.B. von Ratten oder Kaninchen, als Enzymquelle eingesetzt. Als Substrat wurde racemisches Glycerolaldehyd verwendet. Für das aus *Nodulisporium sp.* isolierte Antibiotic RF-3192C wurde im Vergleich zu den beiden anderen patentierten Naturstoffe aus *Chaetomella circinoseta* die schwächste inhibitorische Wirkung ermittelt. Das Epalrestat ist in Japan auf dem Markt und zur Zeit der einzige weltweit verfügbare Aldose-Reduktase-Inhibitor.

**Tab. 4.1:** Hemmwerte verschiedener Aldose-Reduktase-Inhibitoren

[Angel de la Fuente and Manzanaro, 2003]

Inhibitor	IC <sub>50</sub> [nM]	Testsystem
RF-3192A	8,2	Ratte
RF-3192B	4,2	Ratte
<b>RF-3192C</b>	<b>340</b>	Ratte
Tolrestat	7,5	Ratte
Epalrestat	38	Ratte
Quercetin	5600	Ratte
Sorbinil	420	Kaninchen

**Cyclo-(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile) (NVLC6SX1(1-5)SP)**Cyclo(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile)

Dieses cyclische Pentapeptid wurde ursprünglich erstmals aus dem Extrakt eines endophytischen, mangrovenassoziierten Pilz isoliert. Dieser Pilzstamm, Nr. 2524, war ein Isolat aus den Samen von *Avicennia marina* [Li *et al.*, 2004].

#### 4.4. Potential mariner Pilzmetaboliten als neue Arzneistoffe

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Einklang mit vielen Zitaten aus der Literatur und verdeutlichen, dass marine Pilze eine wertvolle Quelle für die pharmazeutisch orientierte Naturstoffforschung sind. Hierbei sind die multifunktionellen Eigenschaften der Pilzmetabolite für die Suche nach neuen pharmakologisch aktiven Leitstrukturen das wichtigste Kriterium. Ebenso bedeutend für die Arbeit mit Pilzkulturen ist die im Verlauf dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass ein und derselbe Pilzstamm beliebig oft und in unterschiedlich großen Ansätzen kultiviert, stets das gleiche Spektrum an Metaboliten ergab. Durch diese Möglichkeit der Reproduktion konnten nach einem ersten Screening aller 82 Isolate aus *Suberites domuncula*, die aktivsten für eine bioassay-gesteuerte Fraktionierung als Großkultur angesetzt werden. Die hohe funktionelle Diversität mariner Pilzmetabolite legt nahe, jeden Extrakt auf unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften hin zu testen. Bei einem gezielten Screening hinsichtlich zytotoxischer Eigenschaften zeigte der Kulturextrakt von *Petriella* sp. die höchste Hemmwirkung auf proliferierende Tumorzellen. Für die Antitumorwirkung waren zwei völlig unterschiedliche Stoffklassen verantwortlich, zum einen ein cyclisches Tetrapeptid und eins von insgesamt drei neuen  $\alpha$ -Pyrone. Dieses soll verdeutlichen, dass Pilzmetabolite mit den gleichen pharmakologischen Eigenschaften trotzdem chemisch völlig variabel sein können. In diesem Fall wäre es interessant, den Wirkungsmechanismus zu hinterfragen, denn es ist naheliegend, dass derartige strukturell völlig unterschiedliche Stoffe auch an verschiedenen Targets angreifen. Das aus einem marinen *Nodulisporium* sp. isolierte Antibiotic RF 3192C ist ein Musterbeispiel, das die Relevanz mariner Pilze für die pharmazeutische Forschung verdeutlicht. Dieser als Aldose-Reduktase-Inhibitor erkannte Naturstoff wurde sogar patentiert und mit diesem zusammen auch der produzierende Pilz sowie das gesamte Herstellungsverfahren zur Reproduktion dieses Naturstoffes. Marine Pilze verfügen also über ein sehr hohes Potential als chemische Fabrik im Dienste der pharmazeutischen Forschung.

## 5. Zusammenfassung

Marine Pilze, die insbesondere in Schwämmen angesiedelt sind, produzieren Naturstoffe, die hinsichtlich Chemie und biologischer Aktivitäten von hoher Vielfalt gekennzeichnet sind. Als Leitstrukturen könnten diese Naturstoffe für die pharmazeutische Forschung bei der Suche nach neuen Arzneistoffen von großem Nutzen sein. Gegenstand dieser Arbeit war der mediterrane Schwamm *Suberites domuncula*, aus welchem sämtliche assoziierte Pilze isoliert und auf Inhaltsstoffe untersucht wurden. Exemplare dieses Schwammes wurden in der nördlichen Adria Kroatiens gesammelt und in Aquarien unter künstlichen Bedingungen gehalten. Aus diesem Schwamm wurden 82 Pilzstämme aus 20 unterschiedlichen Gattungen isoliert und auf zwei verschiedenen Nährmedien kultiviert. Die taxonomische Bestimmung erfolgte nach morphologischen und molekularbiologischen Methoden in der Mehrheit der Fälle bis zur Stufe der Gattung. Die Kulturextrakte aller 82 Pilzstämme wurden chemisch und im Bezug auf zytotoxische Eigenschaften untersucht. Die wissenschaftlich interessantesten Pilzkulturextrakte wurden unter Anwendung säulenchromatographischer Isolierungstechniken aufgetrennt, um reine Naturstoffe daraus zu isolieren. Die Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen erfolgte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie. Im Rahmen des MTT-Tests wurden die isolierten Naturstoffe auf deren wachstumshemmende Eigenschaften auf Tumorzellen getestet. Als Testsysteme wurden drei Arten von Tumorzellen unterschiedlicher Empfindlichkeit eingesetzt: Die murinen Leukämiezellen vom Typ L5178Y, die humanen HeLa-Zellen und die aus Nebennierenkarzinomen von Ratten stammenden PC12. Als wissenschaftlich besonders interessant erwiesen sich vier Pilzstämme, aus denen 11 Naturstoffe, darunter auch 3 neue Verbindungen, gewonnen werden konnten.

### ***Penicillium spp.***

Aus einem Stamm der ubiquitären Gattung *Penicillium* wurden die beiden Naturstoffe Griseofulvin **1** und Meleagrין **2** isoliert. Diese beiden Metaboliten zeigten wie auch der Rohextrakt starke Hemmeigenschaften an L5178Y-Zellen. Beide Naturstoffe sind bereits als Hauptmetaboliten in Arten von *Penicillium* beschrieben worden und prägen seitdem auch deren taxonomische Namen. Griseofulvin wurde 1938 aus Kulturlösungen von *P. griseofulvum* isoliert. Meleagrין wurde in der gleichnamigen Art von *P. meleagrinum* beschrieben [Kawai *et al.*, 1984].

### ***Chaetomium sp.***

Aus *Chaetomium sp.* wurde durch Aufreinigung des recht einfach zusammengesetzten Extraktes das bekannte Bisnaphthopyron Chaetochromin A **3** isoliert. Dieser Naturstoff wurde bereits als Hauptmetabolit in *Chaetomium ssp.* beschrieben [Sekita *et al.*, 1980] und gilt auch als antitumoral [Koyama *et al.*, 1988].

### ***Petriella spp.***

Arten der bisher wenig beschriebenen Gattung *Petriella* zeigten im Bioassay die höchsten zytotoxischen Aktivitäten an allen drei Tumorzelllinien. Dieser hochaktive *Petriella*-Stamm wurde daraufhin als Großkultur herangezüchtet um ausreichend Extrakt für eine bioassay-begleitende Isolierung zu gewinnen. Durch dieses Monitoring, basierend auf dem zytotoxischen MTT-Assay, konnte der Träger dieser hohen Zytotoxizität aufgespürt und gezielt isoliert werden. Die Identifizierung dieser hochaktiven Komponente ergab das zyklische Tetapeptid Cyclo-(L-Leu-L-Pip-L-Aoe-D-Phe) **4**. Dieser Naturstoff war bereits unter dem Patentnamen Antibiotic WF-3161 für seine Antitumorwirkung bekannt und wurde ursprünglich aus der gleichen Pilzgattung, jedoch der terrestrischen Art *Petriella guttulata*, Stamm Nr. 3161, isoliert [Umehara *et al.*, 1983]. Abgesehen von der äußerst seltenen Aminosäure Aoe konnte die absolute Konfiguration der übrigen drei mit Hilfe der Marfey-Reaktion bestimmt werden. Hierzu wurde das Tetapeptid sauer hydrolysiert und die Aminosäuren anschließend mit dem diastereomeren Marfey-Reagenz umgesetzt. Hierbei entstanden aus den enantiomeren Aminosäuren diastereomeren Produkte, die dann über HPLC getrennt und detektiert werden konnten. Thymin **5** wurde als Nebenprodukt isoliert. Außerdem wurden drei neue Naturstoffe aus der Klasse der  $\alpha$ -Pyrone isoliert, die allesamt Derivate des ursprünglich in *Alternaria infectoria* entdeckten Infectopyrons sind [Larsen *et al.*, 2003]. Bei der ersten Verbindung handelt es sich um das 2,3-Dihydroinfectopyron **6**, das in Tests an allen drei Typen von Tumorzellen hohe wachstumshemmende Eigenschaften zeigte. Weitere Analoga waren das 3'-Hydroxymethyl-dihydroinfectopyron **7** und das Dihomo-3'-hydroxymethyl-dihydroinfectopyron **8**, deren Hemmwerte gegenüber Tumorzellen jedoch nicht signifikant waren.

***Nodulisporium sp.***

Durch Untersuchungen an Arten von *Nodulisporium* wurden drei strukturell völlig unterschiedliche Sekundärmetaboliten identifiziert und isoliert. Das 5-Methylmellein **9** ist ein aromatisches Polyketid aus der Klasse der Isocumarine, dessen Ursprungsquelle der pflanzenpathogene Pilz *Fusicoccum amygdali* ist [Ballio *et al.*, 1966]. Beispielhaft für das Potential mariner Pilze, Naturstoffe hoher funktioneller Diversität zu produzieren, ist das isolierte Antibiotic RF-3192C **10**. Dieses Bisnaphthalin-Derivat verfügt über eine ganz besondere pharmakologische Eigenschaft die zur Prophylaxe diabetischer Folgeerkrankungen, wie Makro- und Mikroangiopathie, von hohem Wert sein könnte. Antibiotic RF-3192C ist als eine von drei sehr ähnlichen Naturstoffen (Reihe A-C) patentiert als Aldose-Reduktase-Inhibitor. Die Patentschrift umfasst neben diesen drei Naturstoffen auch den produzierenden Pilzstamm RF-3192 *Chaetomella circinoseta* sowie das gesamte Herstellungsverfahren. Desweiteren wurde aus der Kultur von *Nodulisporium sp.* das bereits bekannte zyklische Pentapeptid Cyclo-(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile) **11** isoliert [Li *et al.*, 2004]. Alle drei Naturstoffe stammen ursprünglich aus völlig unterschiedlichen Quellen und sind im Rahmen dieser Arbeit erstmalig aus dem marinen Pilz der Gattung *Nodulisporium* isoliert worden. Am Beispiel dieses Organismus wurde die hohe chemische Diversität mariner schwammassoziiertes Pilze besonders deutlich.

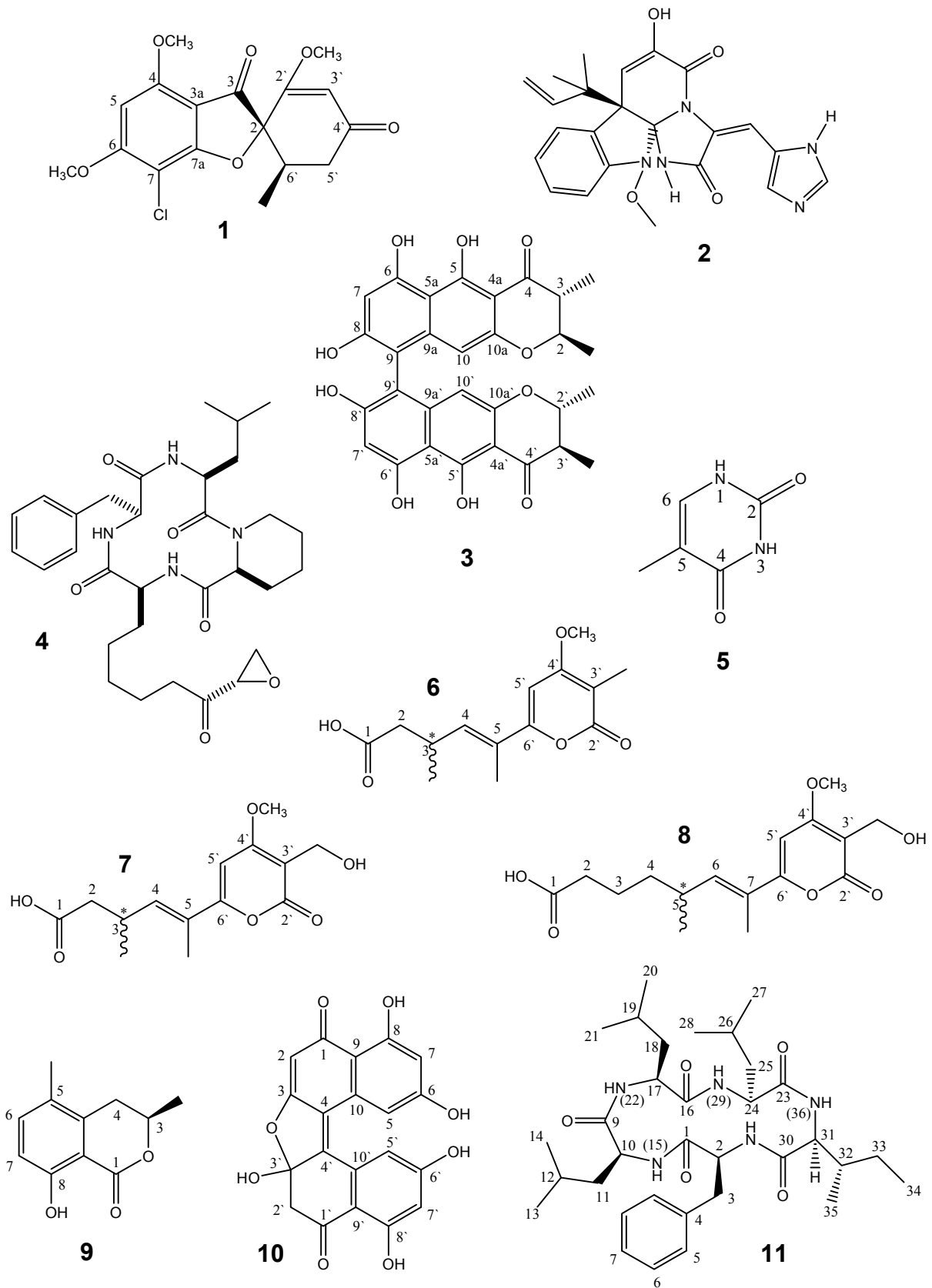


Abb. 5.1: Naturstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit aus marinen Pilzen isoliert wurden



## 5. Summary

Marine fungi, which are especially accumulated in sponges, produce natural products, which are characterized by a high diversity in chemistry and biological activity. As lead structures, these natural products could be very useful in pharmaceutical research in search of new active substances. Object of this study was the mediterranean sponge *Suberites domuncula*, from which had been isolated and chemically investigated all associated fungi. Samples of this sponge were collected in the northern adriatic sea and kept in aquaria under artificial conditions. 82 fungal strains belonging to 20 different genera had been isolated from this sponge and cultivated on two different media. The taxonomic determination was carried out by morphological and molecular methods up to the genus level in most of all cases. The culture extracts of all 82 fungal strains had been investigated chemically and in terms of cytotoxic properties. The scientific most interesting fungal extracts were fractionated by column chromatographic techniques to obtain pure natural products. The structure elucidation of the isolated pure substances was performed by NMR-spectroscopy and mass spectrometry. As part of the MTT-test, the isolated natural products were tested for growth-inhibitory properties towards cancer cells. As test system, three kinds of cancer cells with different sensitivity were applied: The murine leukemia cells L5178Y, the human HeLa-cells and the PC12 derived from kidney cancer of rats. Four fungal strains proved to be scientifically of special interest. 11 natural products, including three new compounds could be obtained from these.

### ***Penicillium spp.***

The two natural products griseofulvine and meleagrine were isolated from a strain of the ubiquitous genus *Penicillium*. Both metabolites exhibited strong inhibitory properties against L5178Y-cells like the crude extract. Both natural products had already been described as major metabolites for species of *Penicillium* and ever since characterising their scientific names. Griseofulvine was isolated in 1938 from culture filtrates of *Penicillium griseofulvum* and meleagrine was described in *Penicillium meleagrinum*, a specie of the same name [Kawai *et al.*, 1984].

***Chaetomium sp.***

The already known bisnaphthopyrone chaetochromine A was isolated from *Chaetomium sp.* by purification of the rather simple composed extract. This natural product had already been described as major metabolite of *Chaetomium spp.* [Sekita *et al.*, 1980] and is also known as antitumor active [Koyama *et al.*, 1988].

***Petriella ssp.***

Species of the genus *Petriella*, from which had been less reported so far, exhibited in the bioassay the highest cytotoxic activities against all of the three cancer cell-lines. As a result, this high-active *Petriella*-strain was cultivated as a large-scale-culture to obtain sufficient extract for a bioassay-guided isolation. By this monitoring based on the cytotoxic MTT-assay, the provider of this high activity could be traced and isolated. Identification of this high active component lead to the cyclic tetrapeptide cyclo-(L-Leu-L-Pip-L-Aoe-D-Phe). This natural product was already known for his strong antitumoral effects as part of a patent under the name Antibiotic WF-3161, originally isolated from the same fungal genus but from the terrestrial specie *Petriella guttulata*, strain no. 3161 [Umehara *et al.*, 1983]. Except for the very rare amino acid Aoe, the absolute configuration of the other three could be defined by the Marfey-reaction. For this, the tetrapeptide was acidic hydrolysed and the amino acids were then allowed to react with the diastereotope marfey-reagent. The enantiomeric amino acids were transformed into diastereomeric products, which could then be separated and detected by HPLC. Thymine was isolated as a side product. Besides, three new natural products belonging to the class of the  $\alpha$ -pyrones were isolated, all of them derivatives of the originally in *Alternaria infectoria* discovered infectopyrone [Larsen *et al.*, 2003]. The first compound is the 2,3-dihydroinfectopyrone, which exhibited in tests with all three types of cancer cells high growth-inhibitory properties. Further analogs were 3'-hydroxymethyl-dihydroinfectopyrone and dihydro-3'-hydroxymethyl-dihydroinfectopyrone, both without significant inhibition-values concerning cancer cells.

***Nodulisporium sp.***

By investigations of *Nodulisporium sp.*, three structurally total different secondary metabolites were identified and isolated. 5-methylmelleine is an aromatic polyketide belonging to the class of the isocoumarins. Its original source is the plant-pathogenic fungus *Fusicoccum amygdali* [Ballio *et al.*, 1996]. Exemplary for the potential of marine fungi to produce natural products of high functional diversity is the isolated Antibiotic RF-3192C. This bisnaphthalene derivative has a very special pharmacological feature, which could be of high value for the prevention of diabetic long-term diseases like macro- and microangiopathy. Antibiotic RF-3192C is one of three very similar natural products (series A-C), which are part of a patent as aldose-reductase-inhibitors. Besides of these three natural products, the patent contains also the producing fungal strain RF-3192 *Chaetomella circinoseta* as well as the complete manufacturing process. Furthermore isolated from the culture of *Nodulisporium sp.* was the already known cyclic pentapeptide Cyclo-(L-Phe-L-Leu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-L-Leu<sup>3</sup>-L-Ile) [Li *et al.*, 2004]. All of the three natural products are originally derived from total different sources and were, as part of this study, isolated for the first time from a marine fungus of the genus *Nodulisporium*. This organism as example emphasises the high chemical diversity of sponge derived fungi.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abell C, Doddrell DM, Garson MJ, Laue ED, and Staunton J (1983)  
Biosynthesis of the Polyketide Mellein from CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H and <sup>13</sup>CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in *Aspergillus melleus*: Detection of Deuterium by <sup>2</sup>H N.M.R. and Edited <sup>13</sup>C N.M.R. Spectra. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1983
- Abraham EP and Loder PB (1972) Cephalosporins and penicillins; chemistry and biology. *Academic Press* (New York), 1-26
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, *et al.* (1980) Mevinolin : A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** (7), 3957-3961
- Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spectra.* (1992). Sigma-Aldrich 2, 1315B
- Alker AP, Smith GW and Kim K (2001)  
Characterisation of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia*, **460**, 105-111
- Andersen B and Frisvad JC (2004)  
Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7507-7513
- Andersen B and Thrane U (1996)  
*Can. J. Microbiol.*, **42**, 685-689
- Angel de la Fuente J and Manzanaro S (2003)  
Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 243-251
- Anon, *Herbalgram* (1998) **33**

- Arnone A, Nasini G, Merlini L, Assante G (1986)  
Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphylltoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *Lactucum*.  
*J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 525-530
- Ballio A, Chain EB, De Leo P, Erlanger BF, Mauri M and Tonolo A (1964)  
*Nature*, **203**, 297
- Ballio A, Barcellona S and Santurbano B (1966)  
5-Methylmellein, a new natural Dihydroisocoumarin.  
*Tetrahedron Lett.*, **31**, 3723-3726
- Baker DD, Chu M, Oza U and Rajgarhia V (2007)  
The value of natural products to future pharmaceutical discovery.  
*Nat. Prod. Rep.*, **24**, 1225-1244
- Bergmann W and Burke DC (1955)  
Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and Spongouridine. *J. Org. Chem.*, **20**, (11), 1501-1507
- Bi Y-M, Bi X-B, A F, and Zhao Q-R (2007)  
Metabolites from the Fungus *Cephalosporium* sp. ALO31.  
*Arch. Pharm. Res.*, **30** (3), 267-269
- Blay JY, von Mehren M, Samuels BJ, Fanucchi MP, Ray-Coquard I, Buckley B, Gilles L, Lebedinsky C, Elsayed YA, and Le Cesne A (2008)  
Phase I Combination Study of Trabectedin and Doxorubicin in Patients with Soft-Tissue Sarcoma. *Clin Cancer Res*, **14** (20), 6656-6662
- Bode HB and Zeeck A (2000)  
Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24`707. *Phytochemistry*, **54**, 597-601

Bode HB, Walker M, Zeeck A (2000b)

Cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp. F-24`707 by variation of the culture conditions.

*Eur. J. Org. Chem.*, submitted

Bode HB, Wegner B, Zeeck A (2000c)

Biosynthesis of cladospirone bisepoxide, a member of the spirobisnaphthalene family

*J. Antibiotics*, **53**, 153-157

Bringmann G, Gulder TAM, Lang G, Schmitt S, Stöhr R, Wiese J, Nagel K and Imhoff JF (2007) Large-Scale Biotechnological Production of the Antileukemic Marine Natural Product Sorbicillactone A. *Mar. Drugs*, **5**, 23-30

Bugni TS and Ireland CM (2004) Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 143-163

Bull AT, Ward AC, and Goodfellow M (2000)

Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.

*Microbiol. Mol. Rev.*, **64** (3), 573-606

Butler MS (2004) The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery.

*J. Nat. Prod.*, **67** (12), 2141-2153

Butler MS (2008) Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 475-516

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, **47** (4), 936-942

Constantino L, Rastelli G, Cignarella G, Vianello P and Barlocco D (1997)

*Esp. Opin. Ther. Pat.*, **7**, 843

- Cragg GM, Newman DJ, and Snader KM (1997)  
Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, **60**, 52-60
- Craigie R (2001) HIV Integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics.  
*J. Biol. Chem.*, **276** (26), 23213-23216
- Cyr TD and Poulton GA (1982)  
Pyrones. VIII. Biosynthetic investigations of the fungal metabolite phacidin.  
*Can. J. Chem.*, **60**, 133
- Dai J, Krohn K, Flörke U, Draeger S, Schulz B, Kiss-Szikszai A, Antus S, Kurtan T and van Ree T (2006)  
Metabolites from the Endophytic Fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*.  
*Eur. J. Org. Chem.*, 3498-3506
- Dai J, Krohn K, Draeger S and Schulz B (2009)  
New Naphthalene-Chroman Coupling Products from the Endophytic Fungus,  
*Nodulisporium* sp. From *Erica arborea*. *Eur. J. Org. Chem.*, 1564-1569
- De Alvarenga MA, Fo BR, Gottlieb OR, Dias JP de P, Magalhaes AF *et al.* (1978)  
Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi.  
*Phytochemistry*, **17**, 511-516
- Duncan RA Jr., Sullivan R, Alderman SC, Spatafora JW and White JF Jr. (2002)  
*Claviceps purpurea* var. *Spartinae* var. *nov.*: an ergot adapted to the aquatic environment. *Mycotaxonomy*, **81**, 11-25
- Ebel R (2006) Secondary metabolites from marine-derived fungi.  
In: *Frontiers in marine biotechnology*, ed. by Proksch P, Müller WEG. Horizon Bioscience, Norfolk, 73-144
- Endo A, Kuroda M, and Tsujita Y (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, New inhibitors of Cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.*, **29** (12), 1346-1348

Esposito D and Craigie R (1999) HIV Integrase structure and function. *Adv. Virus Res.*, **52**, 319-333

Geiser DM, Taylor JW, Ritchie KB and Smith WG (1998)  
A cause of sea fan death in the West Indies. *Nature*, **394**, 137-138

Grabley S and Thiericke R, *Adv. Biochem. Eng./Biotech.*, (1999), **64**, 104

Greene LA, and Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth-factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73** (7), 2424-2428

Grovel O, Kerzaon I, Vansteelandt M, Petit KE, Biard JF and Pouchus YF (2008)  
Marine-derived *Penicillium* sp.: fungal diversity as a promising source of bioactive compounds. *Planta Medica*, **74** (9), 932

Hensens OD, Ondeyka JG, Dombrowski AW, Ostlind DA, Zink DL (1999)  
Isolation and structure of nodulisporic acid A(1) and A(2), novel insecticides from a *Nodulisporium* sp.. *Tetrahedron Lett.*, **40** (30), 5455-5458

Höller U, Wright AD, Matthee GF, König S, Draeger H, Aust J and Schulz B (2000)  
Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites.  
*Mycol. Soc. Phytochem.* , **104**, 1354-1365.

Huxtable RJ and Schwarz SK (2001)  
The isolation of morphine - first principles in science and ethics.  
*Mol. Interv.*, **1** (4), 189-191

Ichihara AM, Miki M, Sakamura S (1985)  
Absolute configuration of (-)-Solapyrone A.  
*Tetrahedron Lett.*, **26** (20), 2453-2454



Indriani ID (2007)

Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites. *Dissertation*.  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ito Y and Ohtsubo K (1987) Teratogenicity of oral Chaetochromin, a polyphenolic mycotoxin produced by *Chaetomium spp.*, to mice embryo.

*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**, 229-303

Jarvis BB, Zhou Y, Jiang J, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Parikka P, Etzel RA and Dearborn DG (1996) Toxigenic molds in water damaged buildings: dechlorogriseofulvins from *Memnoniella echinata*. *J. Nat. Prod.*, **59** (6), 553-554

Jensen PR and Fenical W (2002) Secondary metabolites from marine fungi. In: (Hyde KD, ed.) Fungi in marine environments. Fungal Diversity Research Series 7. *Fungal Diversity Press*, Hong Kong, 293-315

Jimeno J, Faircloth G, Fernandez Sousa-Faro JM, Scheuer P and Rinehart K (2004) New marine derived anticancer therapeutics-A journey from the sea to clinical trials  
*Mar. Drugs*, **2**, 14-29

Kamisuki S, Ishimaru C, Onoda K, Kuriyama I, Ida N, Sugawara F, Yoshida H and Mizushima Y (2007) Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase  $\lambda$  from a fungus, *Nodulisporium sp.*. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3109-3114

Kasetrathat C, Ngamrojanavanich N, Wiyakrutta S, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P (2008) Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium sp.* And CRI247-01. *Phytochemistry*, **69**, 2621-2626

Kawai K, Koehei N, Shoichi N and Yoichi I (1984) Studies on fungal products. VII. The structures of meleagrins and 9-O-p-bromobenzoylmeleagrins.

*Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 94-98

Kawai M, Pottorf RS and Rich DH (1986) Structure and solution conformation of the cytostatic cyclic tetrapeptide WF-3161, cyclo[L-Leucyl-L-pipecolyl-L-(2-amino-8-oxo-9,10-epoxydecanoyl)-D-phenylalanyl]. *J. Med. Chem.*, **29**, 2409-2411

Kelecom A (2002) Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **74** (1), 151-170

Knight V, Sanglier JJ, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, Hughes D, Zhang L (2003) Diversifying microbial natural products for drug discovery *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 446-458

Kohlmeyer J and Volkmann-Kohlmeyer B (2003) Fungi from coral reefs: A comentary. *Mycol. Res.*, **107**, 386-387

Koyama K and Natori S (1988) Further characterization of seven Bis(naphtho- $\gamma$ -pyrone). Congeners of Ustilaginoidins, coloring matters of *Claviceps virens* (*Ustilaginoidea virens*). *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (1), 146-152

Krohn K, John M, Aust H-J, Draeger S, Schulz B (1999) Biologically active metabolites from fungi 13. stemphytriol, a new perylene derivative from *Monodictys fluctuata*. *Nat. Prod. Lett.*, **14** (1), 31-34

Krohn K, Michel A, Flörke U, Aust H-J, Draeger S, Schulz B (1994) Palmarumycins C1-C16 from *Coniothyrium* sp.: isolation, structure elucidation, and biological activity. *Liebigs. Ann. Chem.*, 1099-1108

Larsen TO, Perry NB and Andersen B (2003) Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tet. Lett.*, **44** (24), 4511-4513

Lawrence RN (1999) Rediscovering natural product biodiversity. *Drug Discovery Today*, **4**, 449-451

Lee KK and Gloer JB (1995) Petriellin A: A novel antifungal depsipeptide from the coprophilous fungus *Petriella sordida*. *J. Org. Chem.*, **60**, 5384-5385

LePennec G, Perovic S, Ammar MSA, Grebenjuk VA, Steffen R and Müller WEG (2003) Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron. *J. Biotechnol.*, **100** (2), 93-108

Li H-J, Lin Y-C, Yao J-H, Vrijmoed LLP and Jones EBG (2004) Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus no. 2524 *Journal of Asian Nat. Prod. Res.*, **6** (3), 185-191

McDonald LA, Albanat DR, Barbieri LR, Bernan VS, Discafani CM, Greenstein M, Janotu K, Korshalla JD, Lassata P, Tischler M, Carter GT (1999) Spiroxins, DNA cleaving antitumor antibiotics from a marine-derived fungus. *Tetrahedron Lett.*, **40** (13), 2489-2492

Marfey P (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.*, **49** (6), 591-596

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65** (1-2), 55-63

Newman DJ, Cragg GM and Snader KM (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 215-234

Newton GGF and Abraham EP (1955) Cephalosporine-C, a new antibiotic containing sulphur and D- $\alpha$ -amino adipic acid. *Nature* (London) **175** (4456), 548

Nicolaou KC, Chen JS, Dalby SM (2009) From nature to the laboratory and into the clinic. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 2290-2303

Nozawa K and Nakajima S (1979) Isolation of radicicol from *Penicillium luteoaurantium* and meleagrins, a new metabolite from *Penicillium meleagrinum*.

*J. Nat. Prod.*, **42**, 374-377

Olivera BM (2000)

W-conotoxin MVIIA: From marine snail venom to analgesic drug

N. Fusetani, *Drugs from the sea* 74-85

Ondeyka JG, Helms GL, Hensens OD, Goetz MA, Zink DL, Tsipouras A, Shoop WL, Slayton L, Dmbrowski AW, Polishook JD, Ostlind DA, Tsou NN, Ball RG, Singh SB (1997) Nodulisporic Acid A, a Novel and Potent Insecticide from a *Nodulisporium* sp. Isolation, Structure Determination, and Chemical Transformations.

*J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8809-8816

Ondeyka JG, Dahl-Roshak AM, Tkacz JS, Zink DL, Zakson-Aiken M, Shoop WL, Goetz MA, Singh SB (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2941-2944

Ondeyka JG, Byrne K, Vesey D, Zink DL, Shoop WL, Goetz MA and Singh SB (2003) Nodulisporic Acids C, C<sub>1</sub>, and C<sub>2</sub>: A Series of D-Ring-Opened Nodulisporic Acids from the Fungus *Nodulisporium* sp.. *J. Nat. Prod.*, **66**, 121-124

Ostlind DA, Felcetto T, Misura A, Ondeyka JG, Smith S, Goetz M, Shoop W, Mickle W (1997) Discovery of a novel indole diterpene insecticide using first instars of *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.*, **11** (4), 407-408

Overy DP, Nielsen KF and Smedsgaard J (2005) Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium ser Corymbifera*: in plant production and implication for competitive fitness. *J. Chem. Ecol.*, **31**, 2373-2390

Perovic-Ottstadt S, Adell T, Proksch P, Wiens M, Korzhev M, Gamulin V, Müller IM and Müller WEG (2004) A (1-3)- $\beta$ -D glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1924-1937

- Petersen F, Moesker T, Vanzanella F, Peter HH (1994)  
Production of Cladosporone bisepoxide, a new fungal metabolite  
*J. Antibiotics*, **47**, 1098-1103
- Pirrung MC, Brown WL, Rege S and Laughton P (1991)  
Total synthesis of (+)-griseofulvin. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8561-8562
- Proksch P, Ebel R, Edrada RA, Riebe F, Liu Hongbing, Diesel A, Bayer M, Li X, Lin WH, Grebenyuk V, Müller WEG, Draeger S, Zuccaro A and Schulz B (2008)  
Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case.  
*Bot. Mar.*, **51**, 209-218
- Qin J-C, Zhang Y-M, Gao J-M, Bai M-S, Yang S-X, Laatsch H and Zhang A-L (2009)  
Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1572-1574
- Reshetilova TA, Vinokurova NG, Khmelenina VN and Kozlovsky AG (1995)  
The role of roquefortine in the synthesis of alkaloids meleagrins, glandicolines A and B, and oxaline in fungi *Penicillium glandicola* and *Penicillium atramentosum*.  
*Microbiology*, **64**, 27-29
- Rinehart KL, Holt TG, Fregeau NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH, and Martin DG (1990)  
Ecteinasidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: Potent Antitumor Agents from the Caribbean Tunicate *Ecteinscidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, **55**, 4512-4515
- Sashidhara KV, White KN and Crews P (2009)  
A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. *J. Nat. Prod.*, **72**, 588-603
- Schulz B, Draeger S, Edison dela Cruz T, Rheinheimer J, Siems K, Loesgen S, Bitzer J, Schloerke O, Zeeck A, Kock I, Hussain H, Dai J and Krohn K (2008)  
Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. *Botanica Marina*, **51**, 219-234

Seigler DS (1995) Plant secondary metabolism.

Kluwer Academic Publisher, London, 759

Sekita S, Yoshihira K and Natori S (1980)

Chaetochromin, a Bis(naphthodihydropyran-4-one) Mycotoxin from *Chaetomium thielavioideum*: Application of  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  long-range coupling to the structure elucidation.

*Chem. Pharm. Bull.*, **28** (8), 2428-2435

Shibata S and Ogiwara Y (1963) The absolute configurations of ustilaginoidins.

*Tetrahedron Lett.*, **26**, 1777-1780

Shoop WL, Gregory LM, Zakson-Aiken M, Michael BF, Haines HW, Ondeyka JG, Meinke PT, Schmatz DM (2001) Systemic efficacy of Nodulisporic acid against fleas on dogs. *J. Parasitol.*, **87** (2), 419-423

Singh SB, Zink DL, Bills GF, Teran A, Silverman KC, Lingham RB, Felock P and Hazuda DJ (2003) Four novel Bis-(naphtho- $\gamma$ -pyrones) isolated from *Fusarium* species as inhibitors of HIV-1 integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 713-717

Singh SS, Zink DL, Leisch JM, Bull RG, Goetz MA, Bolissa EA, Giacobbe RA, Silverman KC, Bills GF, Pelaez F, Cascales C, Gibbs JB, Lingham RB (1994)

Preussomerins and desoxypreussomerins: novel inhibitors of rasfarnesyl-protein transferase.

*J. Org. Chem.*, **59** (21), 6296-6302

Stork G and Tomasz M (1964) A new synthesis of cyclohexenones: the double Michael addition of vinyl ethynyl ketones to active methylene compounds. Application to the total synthesis of D/L- griseofulvin. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 471-478

Teuscher F (2005) Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans.

*Dissertation*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Thiergardt R, Hug P, Ribs G, Peter HH (1994)  
Cladospirone bisepoxide – a novel fungal metabolite: structure determination  
*Tetrahedron Lett.*, **35** (7), 1043-1046
- Thiergardt R, Ribs G, Hug P, Peter HH (1995)  
Cladospirone bisepoxide definite structure assignment including absolute configuration and selective chemical transformations  
*Tetrahedron*, **51** (3), 733-742
- Umehara K, Nakahara K, Kiyoto S, Iwami M, Okamoto M, Tanaka H, Kohsaka M, Aoki H and Imanaka H (1983)  
Studies on WF-3161, a new Antitumor Antibiotic. *J Antibiot.*, **36**, 487-483
- Walter SL (2002) Acute penitrem A and rocuefortine poisoning in a dog.  
*Can. Veter. J.*, **43** (5), 372-374
- Wilkinson CR (1978)  
Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.*, **49**, 169-176
- Woloshuk DP, Sisler HD, Tokousbalides MC, Dutky SR (1980)  
Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants.  
*Pest. Biochem. Physiol.*, **14**, 256-264
- Yoshida T, Kato T, Kawamura Y, Matsumoto K, Itazaki H (1993) Aldose reductase inhibitors manufacture with *Chaetomella*. Eur. Pat. Appl., EP 1993-102793
- Zuccaro A, Summerbell RC, Gams W, Schroers HJ and Mitchell JI (2004)  
A new *Acremonium* species associated with *Fucus spp.*, and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. *Stud. Mycol.*, **50**, 283-297

## 7. Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D^{20}$	optische Drehung (Na-D-Linie bei 20°C)
Aoe	2-Amino-8-oxo-9,10-epoxy-dekansäure
Bio	Biomalzmedium zur Kultivierung von Pilzen
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDCl <sub>3</sub>	deuteriertes Chloroform
CD <sub>3</sub> OD	deuteriertes Chloroform
cm	Zentimeter
<sup>13</sup> C-NMR	Kohlenstoff-Kernspinresonanz
COSY	Correlation Spectroscopy
d, dd, ddd	einfaches, doppeltes, dreifaches Dublett (Multiplizität)
D-	lat. Dexta = rechts, Präfix für eine rechtsdrehende Konfiguration
1D, 2D	Ein- und Zweidimensional
DAD	Diodenarray-Detektor
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DiGe	Dinkel-Gerste (Getreidemedium zur Pilzkultivierung)
DMSO-d <sub>6</sub>	deuteriertes Dimethylsulfoxid
dq	Dublett vom Quartett (Multiplizität)
δ	griech. Delta (chemische Verschiebung)
ED <sub>50</sub>	Effektive Dosis, bei der 50% des gewünschten Effekts eintritt
EI-MS	Electron Impact Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat
ESI-MS	Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie
ESI <sup>+</sup> und ESI <sup>-</sup>	positive und negative Elektrosprayionisierung
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (lat.) und andere
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
FDA	N-(2,4-Dinitro-5-Fluorphenyl)-L-Alaninamid
FDLA	N-(2,4-Dinitro-5-Fluorphenyl)-L-Leucinamid
ggf.	gegebenenfalls



---

g/mol	Gramm pro Mol (Einheit des Molekulargewicht)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeLa	humane Zellen aus Gebärmutterhalskrebs, ursprünglich aus der erkrankten Patientin namens Henriette Lacks isoliert
HHU	Heinrich-Heine Universität
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<sup>1</sup> H-NMR	Protonenspinresonanz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochleistungsflüssigchromatographie
HRESIMS	HighResolutionElectroSprayIonisationMassSpectrometry
Hz	Hertz (Frequenzeinheit)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante
kV	Kilovolt (Spannungseinheit)
L-	lat. laevis = links, Präfix für eine linksdrehende Konfiguration
L5178Y	lymphozytische Leukämiezellen von Mäusen
LC-MS	HPLC mit Massendetektor
m	Multipllett (Multiplizität)
M	Molar
[M+H] <sup>+</sup>	protoniertes Molekül
[M -H] <sup>-</sup>	deprotoniertes Molekül
MeOH	Methanol
mg	Milligramm (Masseneinheit)
ml/min	Milliliter pro Minute als Einheit der Flussrate
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
Mult.	Multiplizität
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
N	normal
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
p.a.	pro analysis
PC12	Zellen aus einem Phaeochromozytom von Ratten

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pip	Pipekolinsäure, eine seltene Aminosäure
PLS	<i>Petriella</i> Large-Scale (Bezeichnung des Großextraktes)
ppm	parts per million (Einheit der chemischen Verschiebung)
®	Eingetragenes Warenzeichen
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor als Maß für die Laufstrecke einer Substanz in der Dünnschichtchromatographie
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
s	Singulet (Multiplizität)
SC	Säulenchromatographie
<i>sp.</i>	Species (Arten)
<i>ssp.</i>	Subspecies (Unterarten)
SX	Sephadex
™	Trade Mark
u.a.	unter anderem
UV-VIS	Ultraviolett-Visible
VLC	Vacuum-Liquid-Chromatography Vakuumflüssigchromatographie
ZCL	Zentrales Chemikalienlager

## Curriculum vitae

Name	Frank Riebe
Anschrift	Schubertstrasse 14 44575 Castrop-Rauxel
Geburtsdatum	2. Mai 1969
Geburtsort	Herne
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
<b>Werdegang</b>	
Schulabschluß	Mai 1990 Allgemeine Hochschulreife Haranni-Gymnasium in Herne
Zivildienst	Juli 1990 – Juli 1991 kaufmännische Verwaltungstätigkeit Revierpark Gysenberg GmbH in Herne
Berufsausbildung	August 1991 – Mai 1994 Ausbildung zum Industriekaufmann Schwing GmbH in Herne
Studium	April 1995 – Mai 2001 Studium der Pharmazie Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Pharmaziepraktikum	Juni 2001 – Juni 2002 zwei öffentlichen Apotheken in Düsseldorf
Berufstätigkeit	April 2003 – Juli 2004 öffentliche Apotheke in Dinslaken
Promotionsstudium	Dezember 2004 – Dezember 2009 Anfertigung einer Dissertation am Institut für Pharmazeutische Biologie & Biotechnologie Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Sprachkenntnisse	Englisch verhandlungssicher in Wort und Schrift sehr gute Spanischkenntnisse

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Isolierung und Strukturaufklärung bioaktiver Naturstoffe aus marinen schwammassoziierten Pilzen" 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 11.11.2009

Frank Riebe

## Danksagungen

Ein großes Dankeschön an alle diejenigen, die irgendwie, ob in kleinen oder großen Anteilen, zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Peter Proksch**, der mir die Chance gab, an seinem international besetzten Institut diese Arbeit anzufertigen.

Herrn **Prof. Dr. Günther Schmahl** danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Rainer Ebel und seiner Frau Dr. RuAngelie Edrada-Ebel danke ich herzlich für den professionellen Beistand bei der Strukturaufklärung.

Einen besonderes Dankeschön richte ich an Herrn Prof. Dr. Wenhan Lin für den Einsatz seiner außergewöhnlichen Fähigkeiten auf dem Gebiet der NMR-Spektrenauswertung, bei der Aufklärung meines ersten neuen Naturstoffes.

Herrn Dr. W. Peters und seinen Mitarbeitern am Institut für Anorganische und Strukturchemie danke ich für die Durchführung meiner zahlreichen NMR-Experimente.

Bei Herrn Dr. Victor Wray vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig bedanke ich mich ebenfalls für einige NMR-Messungen, aber vor allem auch für seine professionelle außerordentliche Hilfestellung bei der Strukturaufklärung einiger meiner Reinsubstanzen.

Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller und seiner Mitarbeiterin Frau Renate Steffen vom Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz danke ich für die Durchführung zahlreicher Zytotoxizitätstests.

Ein ganz besonderer Dank für eine wunderschöne Zeit gilt meinen drei Laborkollegen, die ich durch die räumlich und fachlich enge Zusammenarbeit näher kennenlernen durfte. In chronologischer Reihenfolge einen herzlichen Dank an Dr. Yasman aus Indonesien, meiner Laborkollegin Clecia Maria de Jesus Freitas aus Brasilien und an Dr. Sabri Younes aus Ägypten. Meiner Kollegin Dr. Franka Teuscher aus meiner Anfangszeit, danke ich für die gute Einweisung und Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Betreuung des Mikroskopierpraktikums. Auch danke ich jeden einzelnen meines späteren "Dreamteams" bei der studentischen Praktikumsbetreuung: Herzlichen Dank an Dr. Sofia Ortlepp, Dr. Amal Hassan und dem Praktikumsleiter Prof. Dr. Claus Passreiter für all die unterhaltsamen Stunden. Der technischen Assistentin Katja Rätke danke ich herzlich für die nette Einweisung und Betreuung zu Beginn meiner Zeit am Institut. Einen herzlichen Dank auch an alle anderen Kollegen des technischen Personals wie Waltraud Schlag, Katrin Rohde, Dieter Jansen, Eva Müller und Sabine Borstel für die Bereitstellung sämtlicher Arbeitsmittel. Den beiden "Chefsekretärinnen" Mareike Thiel und ihrer Nachfolgerin Claudia Eckelskemper danke ich für die schnelle und unkomplizierte Lösung organisatorischer und administrativer Probleme. Bei meinem Kollegen Dr. Abdessamad Debbab aus Marokko bedanke ich mich herzlich für zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen. Für eine schöne gemeinsame Zeit am Institut danke ich herzlich meine Kollegen Dr. Mirko Bayer, Dr. Annika Putz, Julia Kjer, Arnulf Diesel, Dr. Nadine Weber, Sven Ruhl, Dr. Anke Suckow-Schnitker, Dr. Gero Eck, Dr. Bärbel Steffan und Dr. Jandirk Sendker. Besondere Danksagung an jeden einzelnen meines internationalen Kollegiums, die mir die Zeit am Institut sehr interessant gestalteten und denen ich allen versprochen habe sie irgendwann in deren Heimat zu besuchen: Herzlichen Dank an Dr. Yao Wang und Xu Jing aus China, Dr. Suwigarn Pedpradab aus Thailand, Dr. Tu Ngoc Duong aus Vietnam, Dr. Ine Dewi Indriani, Dr. Triana Hertiani, Edi Sri Mulonyo und Dr. Yudi Rusman aus Indonesien und Sherif Elsayed, Dr. Ehab Moustafa, Dr. Mohamed Ashour, Dr. Ashraf Hamed aus Ägypten. Meinem Bruder Günther Riebe sowie auch meine beiden Kollegen Sherif Elsayed und Dr. Amal Hassan danke ich ganz besonders für die sehr wertvollen Tipps und Hilfen bei der Gestaltung des Layouts an zahlreichen Stellen dieser Dissertation. Von dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön an meine Eltern Renate und Günther und an meine beiden Geschwister Simone und Günther, einfach nur dafür, dass es Euch gibt! Ein ganz besonderer Dank gilt meinen ganz besonderen Freunden wie Björn Klann, seinen Eltern Ulla und Günther, seinem Onkel Hartmut und Sven Lauer.