



# **Bioaktive Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen**

**– Isolierung, Strukturaufklärung und Charakterisierung  
der biologischen Aktivität –**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Clécia Maria Freitas Richard**

aus Salvador da Bahia - Brasilien

Düsseldorf, November 2011

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

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch  
Koreferent: Dr. Rainer Ebel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2011

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von  
**Herrn Prof. Dr. P. Proksch**  
am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Proksch möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Besonderen Dank auch für die wissenschaftliche Betreuung, sowie die sehr guten Arbeitsbedingungen.

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

***Deficit omne, natus sum!***

M. FABIVS QVINTILIANVS  
(c. 35 – c. 100 A.D.)

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Rolle von Naturstoffen bei der Wirkstoffentwicklung	1
1.2.	Biologie der Pilze	2
1.3.	Klassifizierung der Pilze	3
1.4.	Endophytische Pilze	6
1.5.	Naturstoffe aus Pilzen	8
1.6.	Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1.</b>	<b>Biologisches Material</b>	<b>21</b>
2.1.1.	Sammlung des endophytischen Wirtes	21
2.1.2.	Isolierung der endophytischen Pilze aus den Wirtspflanzen	21
2.1.3.	Identifizierung der isolierten Pilzstämmen	23
2.1.4.	Beschreibung der bearbeiteten Endophyten	24
2.1.4.1.	Stamm SL-5: <i>Pleurophoma cava</i> (Schulzer) Boerema, Loer. & Hamers (1996)	24
2.1.4.2.	Stamm HN-B2: <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom (1910)	24
2.1.4.3.	Stamm BT-3: <i>Botryosphaeria rhodina</i> (Berk. & M. A. Curtis) Arx (1970)	25
2.1.4.4.	Stamm NE-8: <i>Neurospora discreta</i> D.D. Perkins & N.B. Raju (1986)	25
2.1.4.5.	Stamm MGC-1.3: <i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Sacc. (1886)	25
2.1.4.6.	Stamm MGC-5.1: <i>Neurospora terricola</i> Goch. & Backus (1962)	26
2.1.4.7.	Stamm MGC-12.3: <i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank (1789)	26
2.1.4.8.	Stamm BT-III.1: <i>Hypoxylon fragiforme</i> (Pers.) J. Kickx f.(1835)	26
2.1.4.9.	Stamm BT-1: <i>Eurotium rubrum</i> W. Bremer (1901)	27
<b>2.2.</b>	<b>Kultivierungsmethoden und verwendete Nährmedien</b>	<b>27</b>
2.2.1.	Anlage von Flüssigkulturen	27
2.2.2.	Anlage von Festkulturen	28
2.2.3.	Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	28
<b>2.3.</b>	<b>Extraktion der Standkulturen</b>	<b>29</b>

2.3.1.	Extraktion der Small-Scale-Kulturen	29
2.3.2.	Extraktion der Large-Scale-Kulturen	30
<b>2.4.</b>	<b>Isolierung biologisch aktiver Verbindungen aus endophytischen Pilzen</b>	<b>31</b>
<b>2.5.</b>	<b>Strukturaufklärung der biologisch aktiven Verbindungen</b>	<b>31</b>
<b>2.6.</b>	<b>Primärscreening zur Ermittlung biologisch bzw. chemisch interessanter Extrakte</b>	<b>32</b>
<b>2.7.</b>	<b>Biologische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanze</b>	<b>32</b>
<b>2.8.</b>	<b>Beschreibung der Tests auf biologische Aktivität</b>	<b>33</b>
2.8.1.	Antibiotische und fungizide Aktivität	33
2.8.1.1.	Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	34
2.8.2.	Zytotoxizität	36
2.8.3.	Proteinkinase Assays	37
<b>2.9.</b>	<b>Allgemein verwendete Analysen- und Meßmethoden</b>	<b>38</b>
2.9.1.	Chromatographische Methoden	38
2.9.1.1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	38
2.9.1.2.	Säulenchromatographie (SC)	38
2.9.1.3.	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography)	39
2.9.2.	UV-Vis-Spektroskopie	43
2.9.3.	Massenspektrometrie (MS)	43
2.9.4.	Kernresonanzspektroskopie (NMR - Nuclear Magnetic Resonance)	44
2.9.5.	Optische Drehung	45
<b>2.10.</b>	<b>Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien</b>	<b>46</b>
2.10.1.	Geräte	46
2.10.2.	Chemikalien	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>3.1.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Pleurophoma cava</i> (SL-5)</b>	<b>48</b>
3.1.1.	Aposphaerin A	49

---

<b>3.2.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium chrysogenum</i> (HN-B2)</b>	<b>54</b>
3.2.1.	Terrestrinsäure	55
3.2.2.	Viridicatol	61
3.2.3.	Viridicatin	64
3.2.4.	Roquefortin	67
<b>3.3.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Botryosphaeria rhodina</i> (BT-3)</b>	<b>71</b>
3.3.1.	Griseofulvin	73
3.3.2.	Dechlorgriseofulvin	76
3.3.3.	Cycloaspeptid A	79
3.3.4.	Sclerotigenin	83
<b>3.4.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Neurospora discreta</i> (NE-8)</b>	<b>88</b>
3.4.1.	Kojisäure	89
<b>3.5.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Fusarium incarnatum</i> (MGC-1.3)</b>	<b>92</b>
3.5.1.	Fusapyron	93
3.5.2.	Desoxyfusapyron	97
3.5.3.	Equisetin	100
<b>3.6.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Neurospora terricola</i> (MGC-5.1)</b>	<b>103</b>
3.6.1.	Diaportinol	104
3.6.2.	Diaportinsäure	107
3.6.3.	8-Hydroxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-6-methoxyisochromen-1-on (neuer Naturstoff)	109
<b>3.7.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Xylaria</i> sp. (MGC-12.3)</b>	<b>115</b>
3.7.1.	( <i>E</i> )- Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat	116
3.7.2.	Cytochalasin E	120
3.7.3.	5-Carboxymellein	124
3.7.4.	1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure (neuer Naturstoff)	127
<b>3.8.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Hypoxylon fragiforme</i> (BT-III.1)</b>	<b>132</b>
3.8.1.	Orsellinsäure	133
3.8.2.	3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on (neuer Naturstoff)	136

3.8.3.	Scytalon	141
3.8.4.	4-Hydroxyscytalon	146
3.8.5.	RF-3192-C	149
3.8.6.	(+)-Mitorubrinsäure	152
3.8.7.	(-)-Mitorubrinol	157
3.8.8.	Cytochalasin H	160
<b>3.9.</b>	<b>Inhaltsstoffe aus <i>Eurotium rubrum</i> (BT-1)</b>	<b>164</b>
3.9.1.	Cochliodinol	165
3.9.2.	Chaetomin	169
<b>3.10.</b>	<b>Untersuchung auf Biologische Aktivitäten der aus Endophytischen Pilze erhaltenen Inhaltsstoffe</b>	<b>173</b>
3.10.1.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Pleurophoma cava</i> (SL-5)	173
3.10.2.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium chrysogenum</i> (HN-B2)	173
3.10.3.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Botryosphaeria rhodina</i> (BT-3)	174
3.10.4.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Neurospora discreta</i> (NE-8)	175
3.10.5.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Fusarium incarnatum</i> (MGC-1.3)	175
3.10.6.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Neurospora terricola</i> (MGC-5.1)	176
3.10.7.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Xylaria</i> sp. (MGC-12.3)	177
3.10.8.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Hypoxylon fragiforme</i> (BT-III.1)	178
3.10.9.	Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus <i>Eurotium rubrum</i> (BT-1)	179
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>183</b>
<b>4.1.</b>	<b>Der Pilz <i>Pleurophoma cava</i> (SL-5) und seine Naturstoffe</b>	<b>185</b>
<b>4.2.</b>	<b>Der Pilz <i>Penicillium chrysogenum</i> (HN-B2) und seine Naturstoffe</b>	<b>186</b>
<b>4.3.</b>	<b>Der Pilz <i>Botryosphaeria rhodina</i> (BT-3) und seine Naturstoffe</b>	<b>190</b>
<b>4.4.</b>	<b>Der Pilz <i>Neurospora discreta</i> (NE-8) und seine Naturstoffe</b>	<b>192</b>
<b>4.5.</b>	<b>Der Pilz <i>Fusarium incarnatum</i> (MGC-1.3) und seine Naturstoffe</b>	<b>194</b>
<b>4.6.</b>	<b>Der Pilz <i>Neurospora terricola</i> (MGC-5.1) und seine Naturstoffe</b>	<b>198</b>
<b>4.7.</b>	<b>Die Xylariaceae spp. und ihre Naturstoffe</b>	<b>199</b>

4.7.1.	Der Pilz <i>Xylaria</i> sp. (MGC-12.3) und seine Naturstoffe	200
4.7.2.	Der Pilz <i>Hypoxylon fragiforme</i> (BT-III.1) und seine Naturstoffe	206
<b>4.8.</b>	<b>Der Pilz <i>Eurotium rubrum</i> (BT-1) und seine Naturstoffe</b>	<b>209</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>213</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>219</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>243</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>246</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>254</b>
<b>10.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>256</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>257</b>

---

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Rolle von Naturstoffen bei der Wirkstoffentwicklung**

Die zunehmende Entwicklung von Resistenzen bei humanpathogenen Bakterien gegen bereits angewandte Wirkstoffe, das Wiederaufleben und die weitere Ausbreitung bereits ausgerottet geglaubter Krankheiten, die Resistenzbildung bei Schädlingen gegenüber Pestiziden, dies alles nicht zuletzt auch durch das kontinuierliche Wachstum der Weltbevölkerung und die zunehmende Schädigung der Umwelt verursacht, lassen die große Notwendigkeit der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Methoden zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen erkennen (Strobel, 2002; Vieira *et al.*, 2001).

Seit Jahrhunderten werden Naturstoffe, vor allem pflanzlicher Herkunft, erfolgreich zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt. Und bis in die heutige Zeit sind sowohl Naturstoffe aus Pflanzen, aus Mikroorganismen, marinen Organismen, Insekten sowie aus Tieren aus unserem gegenwärtigen Arzneimittelrepertoire sowie bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe nicht wegzudenken (Scheuer, 1978; Natori *et al.*, 1981).

Bisher wurden schon mehr als 100.000 Sekundärstoffe mit einem Molekulargewicht von unter 2.500 Dalton (im englischen Sprachgebrauch auch als „small molecules“ bezeichnet) isoliert und identifiziert, zumeist aus Pflanzen und Mikroorganismen. Davon wurden ca. 50.000 von Mikroorganismen produziert, und von den 12.000 Antibiotika, die bis 1995 entdeckt wurden, stammen 22% aus filamentösen Pilzen. Die Biodiversität von Mikroorganismen ist enorm, und nur ein geringer Teil davon wurde bisher überhaupt auf Sekundärmetabolite untersucht. Im Bereich der Pilze geht man davon aus, dass bislang lediglich 5% der Artenvielfalt entdeckt sowie beschrieben wurde, wovon wiederum maximal 16% chemischen Studien unterzogen wurden (Demain, 1999; Pearce, 1997).

In den letzten Jahren ist ein erneutes Interesse am Entdecken von biologisch aktiven Verbindungen ausgehend von natürlichen Quellen zu beobachten, unabhängig von den beeindruckenden Fortschritten neuer konkurrierender Methoden wie der kombinatorischen Chemie, „high throughput screening“ (vollautomatischen Screening- und Analysemethoden) oder der Gentechnik. Es ist somit unbestritten, dass naturstoff-basierte Wirkstoffe einen signifikanten Beitrag zu modernen Therapiemethoden leisten. Beispielsweise basieren ca. 40% der verschriebenen Medikamente auf diesen Naturstoffen. Darüber hinaus waren über

50% der neuen Arzneimittel, d.h. die bei der FDA (Food and Drug Administration) im Zeitraum von 1981-2002 als Antikrebs-, Antimigräne- und Antihypertonika registrierten Wirkstoffe, Naturstoffe und von ihnen abgeleitete Derivate oder Analoga (Newman *et al.*, 2003). Zwischen 1983 bis 1994 waren über 60% aller zugelassenen sowie in der pre-NDA Phase („New Drug Application“) befindlichen Antikrebsmittel von Naturstoffen abgeleitet, während dies zusätzlich für 78% aller neu zugelassenen antibakteriellen Antibiotika zutrifft (Concepcion *et al.*, 2001). Im Zeitraum von 1989 bis 1995 beruhten 60% der zugelassenen Arzneimittel und Anträge auf Neuzulassung von Arzneimitteln auf Substanzen natürlichen Ursprungs (Grabley *et al.*, 1999). Seit 1998 wurden mindestens 21 naturstoff-basierte Wirkstoffe in den Markt der Vereinigten Staaten, Europa sowie Japan eingeführt, und viele andere aus Naturstoffen abgeleitete Wirkstoffe fanden sich im Jahre 2005 in Phase III der klinischen Prüfung oder in den Registrierungsphase (Butler, 2005).

Zu der weltweiten Aufmerksamkeit von naturstoff-basierten Arzneimitteln tragen im Vergleich zu Substanzen synthetischen Ursprungs, die meist durch Totalsynthese gewonnen werden, in vielen Fällen ihre niedrige oder fehlende Giftigkeit, ihre meist vollständige biologische Abbaubarkeit, ihre Gewinnung aus erneuerbaren Quellen, und oft auch die geringeren Kosten zu ihrer Gewinnung bei (Tringali, 2001).

## **1.2. Biologie der Pilze**

Als Pilze bezeichnet man eine polyphyletische Gruppe eukaryotischer, ein- oder mehrzelliger, chlorophyllfreier, heterotropher Organismen. Ihre heterotrophe Ernährung geschieht meist durch Absorption, wobei Enzyme ausgeschieden werden, die organische Substanzen in der Umgebung der Mycelien zersetzen, so dass die Nahrung in flüssiger Form durch die dünnen Zellwände aufgenommen werden kann (Weber und Arnold, 1993).

Die vielzelligen Pilze bestehen zumeist aus feinen, fädigen Zellaggregaten, den so genannten Hyphen. Diese Zellenaggregate sind durch Septen (Trennwände) voneinander getrennt. Die Septen enthalten Poren, die einen Austausch von Cytoplasma zwischen den Zellen ermöglichen. Die an den Spitzen gewachsenen Hyphen können sich verzweigen, und das so entstehende Geflecht wird als Myzel bezeichnet. Jede Zelle der Hyphen hat normalerweise entweder einen oder zwei Zellkerne. Manche Niederen Pilze haben

coenocytische Hyphen, bei denen zahlreiche Zellkerne auf das gesamte Zellplasma verteilt sind (Weber und Arnold, 1993; Strasburger, 2002).

Die Fortpflanzung sowie Ausbreitung der Pilze erfolgt geschlechtlich und ungeschlechtlich durch Sporen. Diese sind kleine zytoplasmahaltige Zellen, welche von einer festen Wand umschlossen sind. Die Sporen werden entweder geschlechtlich durch Verschmelzung von zwei oder mehr Zellkernen gebildet oder auf ungeschlechtliche Weise durch Abschnürung der Sporen an den Enden bestimmter Hyphen. Eine andere Möglichkeit besteht durch Ausbreitung (ggf. mit Fragmentierung) der Hyphen, die sich dann selbständig fortentwickeln (Schlegel und Schmidt, 1985; Munk, 2000).

Die Zellwände der Hyphen bestehen bei den meisten Pilzen überwiegend aus dem farblosen Chitin und enthalten daneben noch verschiedene andere Polysaccharide. Cellulose ist nur in wenigen Pilzgruppen enthalten, vorwiegend bei den Oomyceten, für die sie charakteristisch ist (Schwantes, 1996).

Einerseits sind Pilze in ihrer Rolle als Saprotrophe, d.h. Zersetzer toten organischen Materials, grundlegende Komponenten von Biocoenosen, andererseits sind sie auch als Parasiten lebender Organismen von gravierender ökologischer und ökonomischer Bedeutung. Vielfach bewirken sie auch als Symbionten positive Effekte, beispielsweise in Lebensgemeinschaft mit Algen in Flechten, oder in Form von Mykorrhizen mit Wurzeln von Kräutern, Sträuchern und Bäumen hervor. Sowohl in unserer Breitengraden als auch in den Tropen sind Mykorrhizapilze entscheidend für das Waldwachstum sowie für landwirtschaftliche Erträge (Agerer, 2006).

### **1.3. Klassifizierung der Pilze**

Pilze sind eine noch ziemlich unerforschte Organismengruppe. Hinsichtlich ihrer Anzahl und Artenvielfalt stellen die Pilze nach den Insekten die zweitgrößte taxonomische Gruppe von Organismen auf der Erde dar. Die bereits bekannten Arten von Pilzen werden mit 80.000 angegeben, jährlich werden dazu weltweit 1.800 neue Pilzarten erstmalig beschrieben. Nach Schätzungen der Deutschen Gesellschaft für Mykologie existiert heute eine tatsächliche Anzahl von ca. 1.500.000 Pilzarten wovon bisher weniger als 5% beschrieben worden sind (Hawksworth, 1991 und 2001; Agerer, 2006).

Die Pilze sind als polyphyletische Verwandtschaftsgruppe anzusehen. Die systematische Stellung der einzelnen Taxa ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Weber, 1993; Schwantes, 1996). Derzeit existieren rund 21 unterschiedliche Systeme zur Klassifikation der Pilze. Prinzipiell unterscheidet man unabhängig von allen Einteilungsunterschieden die Großgruppen Niedere und Höhere Pilze. Das Reich der Fungi wird von der Höheren Pilze repräsentiert und bildet eine stammesgeschichtlich geschlossene Gruppe. Im Gegensatz zu den Höheren Pilzen sind die Niederen Pilze eine vielfältigere Gruppe, deren Mitglieder während der Evolution höchstwahrscheinlich unabhängig voneinander entstanden sind und daher eine hohe Heterogenität aufweisen. Zu ihnen sind die Schleimpilze und andere kleinere Gruppen zu rechnen. Sie haben Ähnlichkeiten mit den Höheren Pilzen, im Gegensatz zu den Höheren Pilzen gibt es jedoch zumindest in bestimmten Lebensabschnitten begeißelte oder amöboid bewegliche Formen. Die Niederen Pilze werden normalerweise dem Reich der Protisten zugeordnet (Weber, 1993; Schwantes, 1996).

Die vier wichtigsten Abteilungen im System der Pilze sind Oomycota, Zygomycota, Ascomycota und Basidiomycota. Typische Sporenformen, wie Oosporen, Zygosporien, Ascosporen und Basidiosporen, charakterisieren die jeweiligen Abteilungen der Pilze. Diese Reihenfolge steht zugleich für die jeweilige Entwicklungsstufe der Pilze, an deren Spitze die Basidiomyceten stehen. Die Chytridiomyceten bilden eine fünfte Abteilung, die in der Regel den Niederen, manchmal aber auch unter Einschränkungen den Höheren Pilzen zugeordnet wird.

Die sechste Hauptabteilung stellt eine künstliche Gruppe dar und wird als Deuteromycota oder Fungi imperfecti bezeichnet, wohingegen die traditionelle Zuordnung der Schleimpilze zu den Pilzen überhaupt neuerdings stark in Zweifel gezogen wird (Dittrich *et al.*, 2007).

Im Folgenden sind die wichtigsten Gruppen innerhalb der Pilze sowie für sie charakteristische Merkmale dargestellt (Dittrich *et al.*, 2007):

- 1. Oomycota:** Charakteristisch für die Abteilung der Oomycota ist zusätzlich zu den Oosporen der relativ hohe Anteil von Cellulose in den Zellwänden, was eine Ausnahme unter den Pilzen darstellt. Weiterhin das Vorhandensein von Zoosporen, die über zwei ungleich lange Geißeln verfügen. Damit deutet sich eine Verwandtschaft zu Algengruppen mit ähnlicher Begeißelung (Gold- und Braunalgen). Oomycota sind entweder Einzeller oder haben einen komplexeren Bau mit Hyphen ohne Septen.

2. **Chytridiomycota:** Bei der Chytridiomyceten (Flagellatenpilzen) handelt es sich um i.d.R. einzellige Organismen, die häufig keine Hyphen ausbilden. Charakteristisch ist das Auftreten ungeschlechtlicher, beweglicher Fortpflanzungsstadien (Zoosporen), die eine Geißel (Flagellum) aufweisen. Ihre Zellwände enthalten Chitin. Diese Pilzgruppe haben teilweise Merkmale, welche Oomyceten gleichen. Anderer Eigenschaften führen dagegen zu einer Einordnung als primitivste Vorläufer der Höheren Pilze.
3. **Zygomycota:** Die Zygomyceten (Jochpilze) bilden geschlechtliche, dickwandige Zygosporen und ungeschlechtliche, unbegeißelte Sporangiosporen. Typisch für die überwiegende Zahl der Arten ist zudem ein weitgehendes Fehlen von Septen in den Hyphen. Diese sind daher mehrkernig. Allein die Fortpflanzungsorgane werden oft durch Septen vom Myzel abgeteilt. Während der sexuellen Fortpflanzung bilden sich die namensgebenden jochartigen Brücken zwischen den kompatiblen Hyphen. Das Verschmelzungsprodukt (Zygospore) ist dickwandig und von Auswüchsen der Hyphen umhüllt, so dass sie eine Art Frucht darstellt.
4. **Ascomycota:** Ascomyceten oder Schlauchpilze bilden ihre Sporen (Ascosporen) in einem schlauchartigen Gebilde, das man als *Ascus* (Plural *Asci*) bezeichnet. Kennzeichen dieser Pilze sind gut entwickelte Hyphen mit nur einem einzigen Zellkern pro Zelle. Ausschließlich die ascogenen Zellen besitzen zwei Kerne. Die Hefepilze und ähnliche Arten, die ebenfalls zu den Ascomyceten gehören, entwickeln ihre Asci direkt aus Zellen oder Hyphen und bringen diese nicht in einem fruchtkörperartigen Gebilde hervor. Ca. ein Drittel aller bekannten Pilze gehören zu den Ascomyceten. Gleichfalls zu dieser Abteilung gehört die überwiegende Mehrzahl der Flechten bildenden Pilze; vermutlich auch ein Großteil der Fungi imperfecti. Damit kommt die Artenzahl der Schlauchpilze auf einen Anteil von fast zwei Dritteln aller Pilze.
5. **Basidiomycota:** Die Abteilung Basidiomycota (Ständerpilze) repräsentiert etwa ein Drittel aller bekannten Pilze. Kennzeichnend für diese Abteilung sind die Basidiosporen, die von den *Basidien* genannten Sporangien gebildet werden. Neben

den Basidien existieren noch andere Charakteristika der Ständerpilze: u. a. ein oft sehr langlebiges Myzel, die Hyphen wachsen häufig unter Bildung spezifischer Schnallen und sind durch Septen mit typischen Poren unterteilt. Jede Zelle der Hyphen besitzt normalerweise wiederum zwei Kerne (dikaryotisches Myzel); ferner ist auch die Herausbildung oft großer, komplex gebauter Fruchtkörper typisch (außer bei den parasitischen Gruppen der Rost- und Brandpilze). Deshalb werden fast alle Speise- und Giftpilze zu den Basidiomyceten zugeordnet.

- 6. Deuteromycota:** Die Abteilung der Deuteromycota oder Fungi imperfecti (lateinisch *fungus*: Pilz, *imperfectus*: unvollkommen, unvollständig), stellt keine einheitliche Verwandtschaftsgruppe dar, sondern ist eine künstliche Einteilung. Diese Zusammenstellung umfasst alle Pilze, von denen bisher nur die vegetative Vermehrungsform bekannt ist. Eine sichere Zuordnung der einzelnen Arten ist nur selten realisierbar, weil für die Zuordnung der Pilzgruppen die Morphologie des jeweiligen sexuellen Fruchtkörpers entscheidend ist. Es ist jedoch aufgrund vegetativer Merkmale sehr wahrscheinlich, dass die Mehrzahl der Imperfekten Pilze Ascomyceten sind, seltener auch Zygomyceten oder Basidiomyceten. Medizinisch und wirtschaftlich hat diese Pilzgruppe jedoch eine hohe Bedeutung, da sie viele Krankheitserreger von Tieren und Pflanzen enthält.

#### **1.4. Endophytische Pilze**

Der Begriff "Endophyten" wurde von De Bary (1866) geprägt, um Pilze, die im Gewebe von Wirtspflanzen leben, gegenüber Epiphyten abzugrenzen, die auf der Oberfläche des Wirtes angesiedelt sind. In den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde dieser Begriff weiter präzisiert und umfaßt nach heutigem Verständnis nur noch Mikroorganismen, die asymptomatische Infektionen beim Wirt hervorrufen und schließt pathogene Pilze und Mutualisten, wie die Mykorrhizabildner, aus (Carroll, 1986). In den letzten Jahren ist der Begriff "Endophyten" um solche Organismen erweitert worden, bei denen einer internen Infektion des Wirtes eine epiphytische Phase des Wachstums vorausgeht; des weiteren eingeschlossen sind mutualistische Mikroben und latente oder opportunistische Pathogene,

die einige Zeit symptomfrei in ihren Wirtsorganismen leben, bevor es zur Ausbildung von Symptomen (Petrini 1991).

Einige Endophyten verursachen erst dann Krankheitssymptome, wenn der Wirt geschwächt ist (Viret und Petrini, 1994; Williamson, 1994), wohingegen andere eine symbiotische Wechselwirkung zu ihrem Wirt unterhalten und in keiner Phase ihres Lebenszyklus als Pathogene in Erscheinung treten (Lodge *et al.*, 1996).

Endophytische Mikroorganismen sind bereits aus den verschiedensten Wirtsorganismen wie Gräsern, Moosen, Farnen, Flechten bis hin zu Bäumen isoliert und beschrieben worden (Stone *et al.*, 2000), wo sie in den unterschiedlichen Pflanzenteilen, z. B. Blättern, Sprossen, Rinden, Wurzeln oder Samen vorkommen. Endophyten treten sowohl in terrestrischen als auch in Wasserpflanzen der gemäßigten Klimazonen (Bills und Polishook, 1992a/b; Fisher und Petrini, 1990; Fisher *et al.*, 1995; Carroll, 1988; Wilson und Carroll, 1994) sowie auch der Tropen auf (Dreyfuss und Petrini, 1984; Laessøe und Lodge, 1994; Rodrigues und Samuels, 1990; Rodrigues *et al.*, 1993; Rodrigues, 1994).

Von einigen Ausnahmen abgesehen ist die komplizierte Wechselwirkung von Endophyten zu ihren Wirtsorganismen bisher nur unzureichend erforscht worden (Belesky und Malinowski, 2000). Verschiedene Labor- wie auch Freilandversuche auf natürlichen Grasflächen wie auch auf landwirtschaftlich genutzten Flächen haben gezeigt, dass mit Endophyten infizierte Pflanzen fraßhemmend auf Herbivoren wirken können. So zeigten z.B. einige Gras- und Seggenarten aus der Familie der Clavicipitaceae nach Infektion mit Pilzendophyten eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Schädlingen (Clay, 1988a/b). Diese Resistenz kann auf von diesen Pilzen produzierte Alkaloide zurückgeführt werden (Lane, Christensen und Miles, 2000). Mit Endophyten infizierte Grassamen enthalten häufig höhere Alkaloidkonzentrationen als photosynthetisch aktive Gewebe derselben Pflanzen. So konnte auch in Fütterungsexperimenten gezeigt werden, dass nicht infizierte Samen sowohl von Insekten als auch von Vögeln den infizierten Samen deutlich vorgezogen wurden (Clay, 1991). Letztere zeigten außerdem eine erhöhte Keimungs- und Widerstandsfähigkeit (Clay 1991).

Zusätzlich zu ihrer ökologischen Bedeutung werden endophytische Pilze routinemäßig auf eine *in vitro*-Produktion bedeutsamer Naturstoffe gescreent (Polishook *et al.*, 1993). In den letzten Jahren ist das Interesse an ihnen auf der Suche nach umweltschonenden Herbiziden und neuen Wirkstoffen für pharmazeutische Anwendungen sowie die

Widerstandsfähigkeit von Nutzpflanzen erhöhender Substanzen weiter gestiegen (Sridhar und Raviraja, 1995), was auch ihre ökonomische Bedeutung deutlich macht.

### 1.5. Naturstoffe aus Pilzen

Sowohl bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe, z. B. Antibiotika, wie auch bei der Suche nach ökologisch verträglichen Herbiziden besitzen Naturstoffe aus Mikroorganismen ein vielversprechendes Potential.

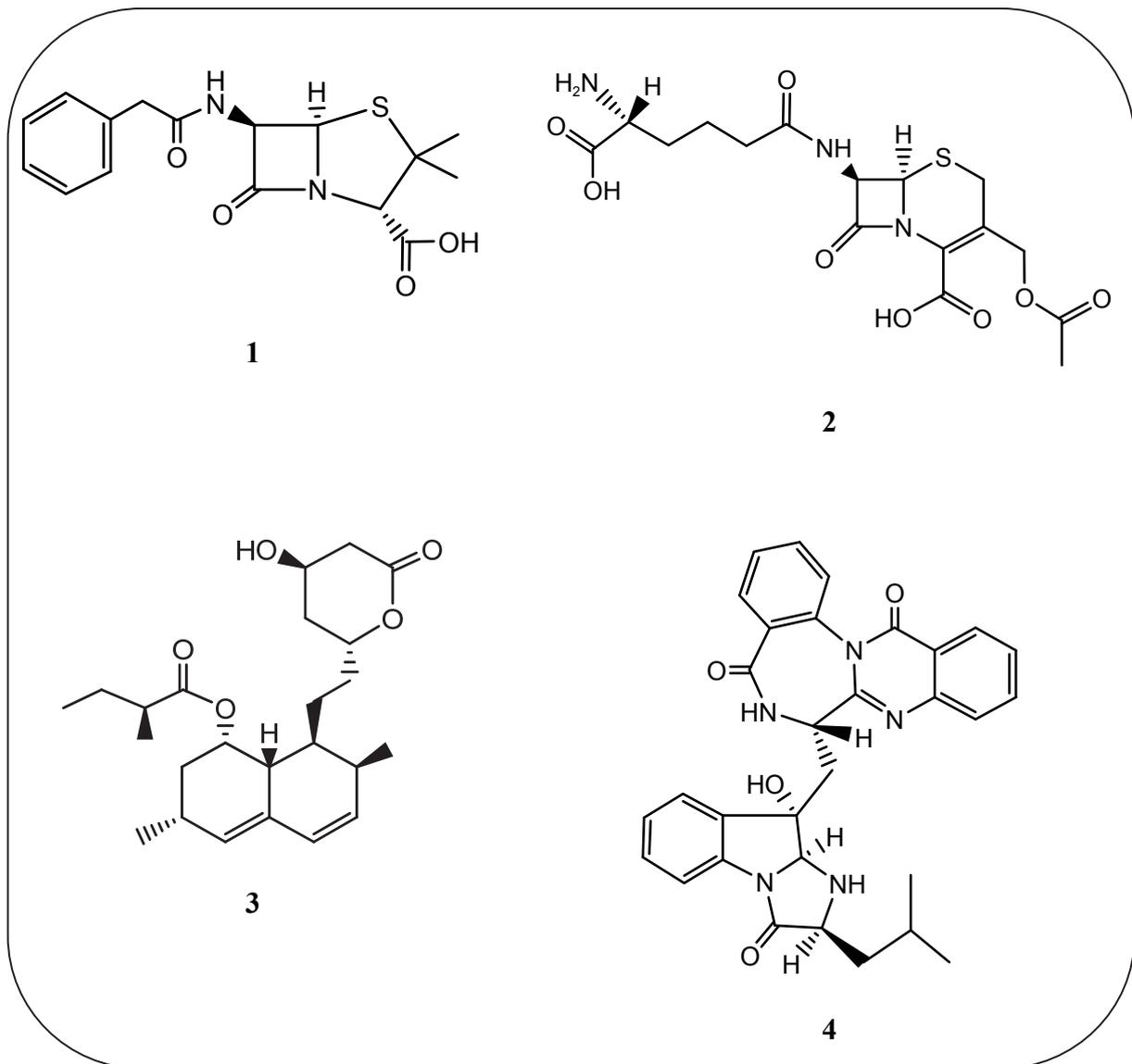
Die Industrienationen benötigen 60-70% der Weltjahresproduktion an Herbiziden zum Schutze ihrer Nutzpflanzen. Allein in den USA wird der Umsatz an Herbiziden auf 4 Milliarden US\$ jährlich geschätzt. (Ainsworth, 1996). Eine inzwischen erfolgte Sensibilisierung für die mögliche Umweltschädlichkeit moderner Agrochemikalien (chlorierte wie auch phosphorylierte Synthetika, z. B. DDT) lässt die Suche nach neuen Naturstoffen in Mikroorganismen wieder stark an Bedeutung gewinnen.

Von besonderem Nutzen ist die Fähigkeit der Mikroorganismen, besonders der Pilze, eine große Bandbreite an bioaktiven Sekundärstoffen zu produzieren. Wichtige Arzneistoffe zur Anwendung bei den verschiedensten Krankheiten wurden aus Pilzen gewonnen (Masurekar, 1992).

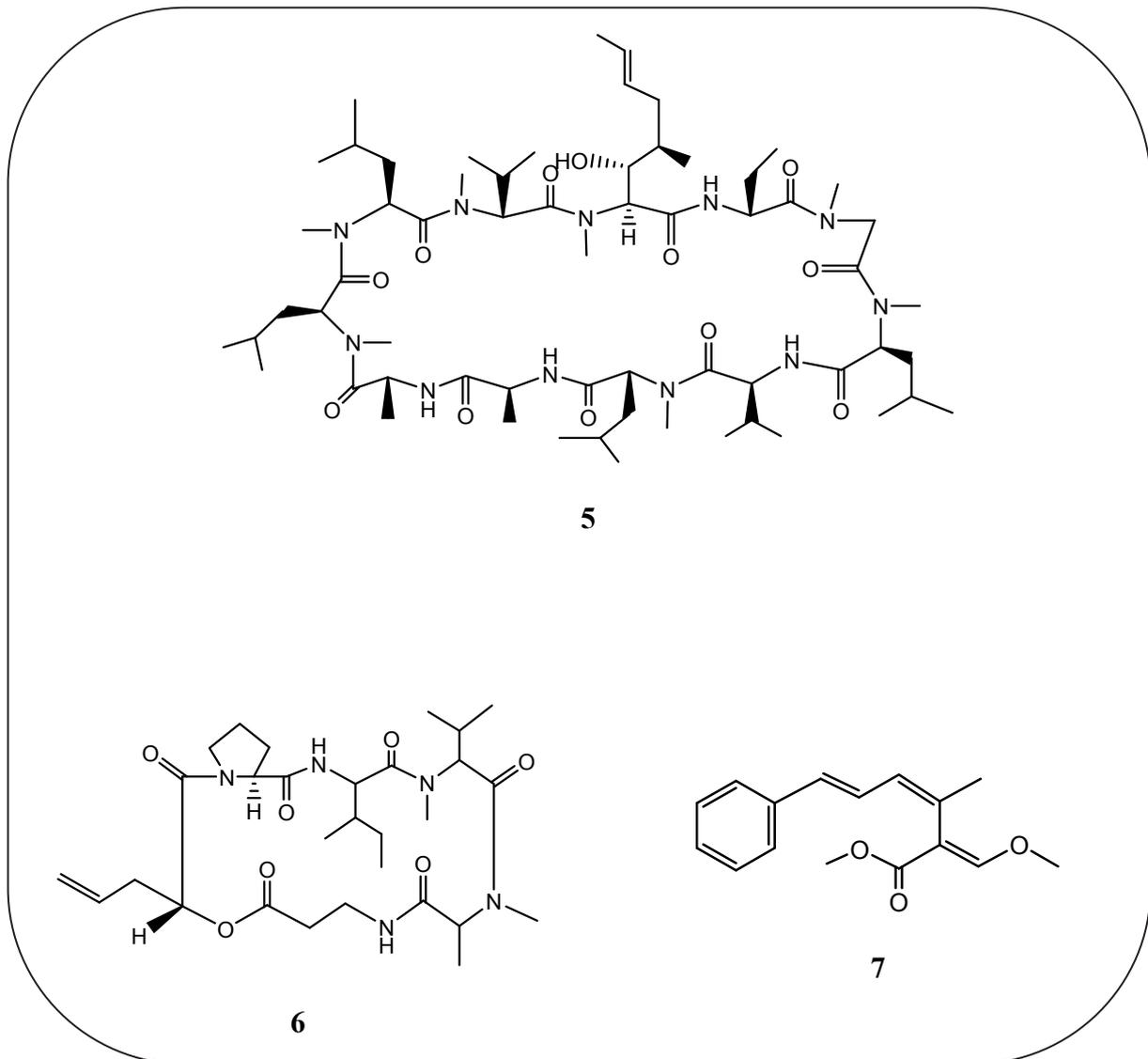
Bereits im Jahr 1994 betrug der Umsatz der 20 meistverkauften Arzneimittel in den USA ca. 6.7 Milliarden US\$, bei sechs von ihnen handelte es sich dabei um Naturstoffe aus Pilzen oder von diesen abgeleitete partialsynthetische Strukturen (Czarnik, 1996). Unter den Arzneistoffen mit herausragender Bedeutung bei der Behandlung von Infektionskrankheiten sind Penicillin (1) und Cephalosporin (2) zu nennen. Auch in neuester Zeit waren Pilzsubstanzen maßgeblich für die Entwicklung neuer Arzneimittel. Bedeutsame Beispiele hierfür sind Mevinolin (3), ein Cholesterinsenker, der einen weltweiten Umsatz von mehr als 1 Milliarde US\$ pro Jahr erzielt, sowie Taxol (51), ein bedeutender Antitumorwirkstoff mit einem Jahresumsatz von mehr als 1 Milliarde US\$. Für diese zunächst aus der pazifischen Eibe gewonnene Substanz konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie auch von endophytischen Pilzen produziert wird (Strobel, 2002). Weitere Beispiele für pharmazeutisch bedeutsame Arzneistoffe aus Pilzen sind Asperlicin (4) (zur Behandlung von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts) und das Immunsuppressivum Ciclosporin A (5), das routinemäßig

nach Organtransplantationen zum Einsatz kommt (Strobel, 2002; Masurekar, 1996; Czarnik, 1996; Caporale, 1995).

Bedeutende Sekundärstoffe aus Pilzen finden des Weiteren in der Landwirtschaft Anwendung (Gardner, 1992), z.B. Destruktine (6) als Insektizide, Strobilurine (7) als Fungizide sowie verschiedene Phytotoxine als Herbizide.



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



**Abb. 1 (Forts.). Biologisch aktive Naturstoffe aus Pilzen**

Auch bedingt durch das Bewusstsein, dass die Gefahr der Reduktion dieser Artenvielfalt sich erhöht hat, hat die Erforschung der Pilzinhaltsstoffe in letzter Zeit stark an Bedeutung gewonnen (Balandrin *et al.*, 1993). Viele vor dem Aussterben stehende Pflanzen beherbergen eine große Anzahl an Endophyten, womit demzufolge auch letztere vom Verschwinden bedroht sind. Das Interesse von pharmazeutischen und agrochemischen Unternehmen der Industrienationen an der Erforschung bioaktiver Naturstoffe aus Endophyten sowie die Investitionen in diesem Bereich ist nicht zuletzt auch aus diesem Grund gestiegen (Dreyfus und Chapela, 1994; Powell, 1993).

Wegen der großen Vielfalt an Gattungen und Arten, die in der Lage sind, bioaktive Leitstrukturen zu produzieren, und der großen Diversität der gebildeten Sekundärstoffe stellen

die Endophyten eine wertvolle Quelle zur Gewinnung neuer Wirkstoffe dar. Die in der folgenden Tabelle (Tab 1.) aufgeführten literaturbekannten Substanzen **8-59**, welche allesamt aus endophytischen Pilzen isoliert wurden, wurden ausgewählt, um einen Eindruck der metabolischen Vielfalt der von Endophyten produzierten Naturstoffe zu vermitteln. Darunter befinden sich Polyketide (**8 – 14**), Lactone (**15 – 22**), Chinone (**23 – 28**), Anthrachinone (**29 – 32**), Xanthone (**33 – 34**), Isocoumarine (**35 – 36**), Flavonoide (**37 – 40**), Phenylpropanoide (**41 – 42**), Peptide (**43 – 47**), Alkaloide (**48 – 50**), Diterpene (**51**), Sesquiterpene (**52 – 54**), Meroterpenoide (**55 – 56**) und Steroide (**57 – 59**), womit nur einige bedeutende Klassen von Naturstoffe abgedeckt sind, und sich diese Liste sicherlich ohne weiteres erheblich verlängern liesse. Die biologischen Aktivitäten der genannten Naturstoffe (Tab. 1) sind meistens im Bereich der Toxizität gegenüber anderen Organismen anzusiedeln. Dies deutet darauf hin, dass diese Wirkstoffe eine Rolle bei der chemischen Verteidigung in der symbiotischen Beziehung zu ihren jeweiligen Wirtspflanzen spielen könnten, was allerdings bisher nur in den wenigstens Fällen, beispielsweise für die weiter oben diskutierten Alkaloide von Endophyten aus Gräsern, experimentell belegt wurde.

**Tabelle 1 . Bioaktive Naturstoffe aus endophytischen Pilzen**

Naturstoffklasse	Trivialname	Produzent	Biologische Aktivität	Literatur
Polyketide	Cytosporone A-E ( <b>8 – 12</b> )	<i>Cytospora</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp.	antibiotisch	Brady <i>et al.</i> , 2000
	<b>13</b> <b>14</b>	<i>Penicillium</i> sp.	fungizid	Stierle <i>et al.</i> ,1999
Lactone	1893 A-B ( <b>15 - 16</b> )	Endophytischer Pilz no. 1893	zytotoxisch, insektizide	Chen <i>et al.</i> , 2003
	Fusidilactone A-C ( <b>17- 19</b> )	<i>Fusidium</i> sp. 2072	fungizid	Krohn <i>et al.</i> , 2002 Wang <i>et al.</i> , 2004
	Xestodecalactone A-C ( <b>20 - 22</b> )	<i>Penicillium</i> cf. <i>montanense</i>	fungizid	Edrada <i>et al.</i> , 2002
Chinone	Preussomerin G-L ( <b>23 - 28</b> )	<i>Mycelia sterila</i>	Ras-Farnesyltransferase-Inhibitor	Singh <i>et al.</i> , 1994 Krohn <i>et al.</i> , 2001
Anthrachinone	<b>29 - 31</b> Rheoemodin ( <b>32</b> )	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Proteinkinase-Inhibitor	Brauers <i>et al.</i> , 2000
Xanthonen	Phomoxanthere A-B ( <b>33 - 34</b> )	<i>Phomopsis</i> sp. BCC 1323	gegen Malaria, und Tuberkulose, zytotoxisch	Isaka <i>et al.</i> , 2001 Elssäser <i>et al.</i> , 2005

**Tabelle 1 (Forts.). Bioaktive Naturstoffe aus endophytischen Pilzen**

Isocoumarine	Reticulol A (35)	Marine Endophytischer Pilz #2533	cAMP- Phosphodiesterase- Inhibitor	Furutani <i>et al.</i> , 1975 Lin <i>et al.</i> , 2001
	Avicennin A-B (36 – 37)		-	
Flavonoide	Tricin (38) Glucotricin (39) Tricin 7-rutinosid (40) Isoorientin (41)	<i>Neotyphodium typhnium</i>	insektizid	Ju <i>et al.</i> ; 1998
Phenylpropanoide	Coniferin (42) Syringin (43)	Xylariaceae spp.	Signalsubstanzen für symbiotische Wechselwirkung	Chapela <i>et al.</i> , 1991
Peptide	PF 1022 A-E (44 - 48)	Agonomycete PF 1022 ( <i>Mycelia sterilia</i> )	anthelminthisch	Sasaki <i>et al.</i> , 1992 Jeschke <i>et al.</i> , 2005
Alkaloide	Cytochalasin F (49)	<i>Phoma exigua</i> var. <i>heteromorpha</i> , <i>Geniculosporium</i> sp.	algizid, Photosynthese- Inhibitor, fungizid	Evidente <i>et al.</i> , 1997 Koenig <i>et al.</i> , 1999
	Phomopsichalasin (50)	<i>Phomopsis</i> sp.	antimikrobiell	Horn <i>et al.</i> , 1995
	L 755807 (51)	<i>Microsphaeropsis</i> sp	Bradykinin- - Inhibitor	Stahl <i>et al.</i> , 1996 Lam <i>et al.</i> , 1996
Diterpene	Taxol A (52)	<i>Taxomyces andreae</i> , <i>Periconia</i> sp. <i>Pestalotiopsis microspora</i> , <i>Tubercularia</i> sp. TF5	antileukämisch, antineoplastisch	Stierle <i>et al.</i> , 1993 Li <i>et al.</i> , 1998 Strobel <i>et al.</i> , 1996 Wang <i>et al.</i> , 2000
Sesquiterpene	Pestalotiopsin A-C (53 - 55)	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	immunosuppressiv, zytotoxisch	Pulici <i>et al.</i> , 1996 Pulici <i>et al.</i> , 1997 Johnston <i>et al.</i> , 2001
Meroterpenoide	Citreonigrin B (56) Citreodrimen D (57)	<i>Penicillium citreonigrum</i>	Proteinkinase- Inhibitor	Rusman, 2006
Steroide	Ergosterol (58) Ergosterolperoxid (59)	<i>Colletotrichum</i> sp.	antimikrobiell	Lu <i>et al.</i> , 2000
	Herbarulid (60)	<i>Pleospora herbarum</i>	Algizide, antimikrobiell, herbizid	Krohn <i>et al.</i> , 1999

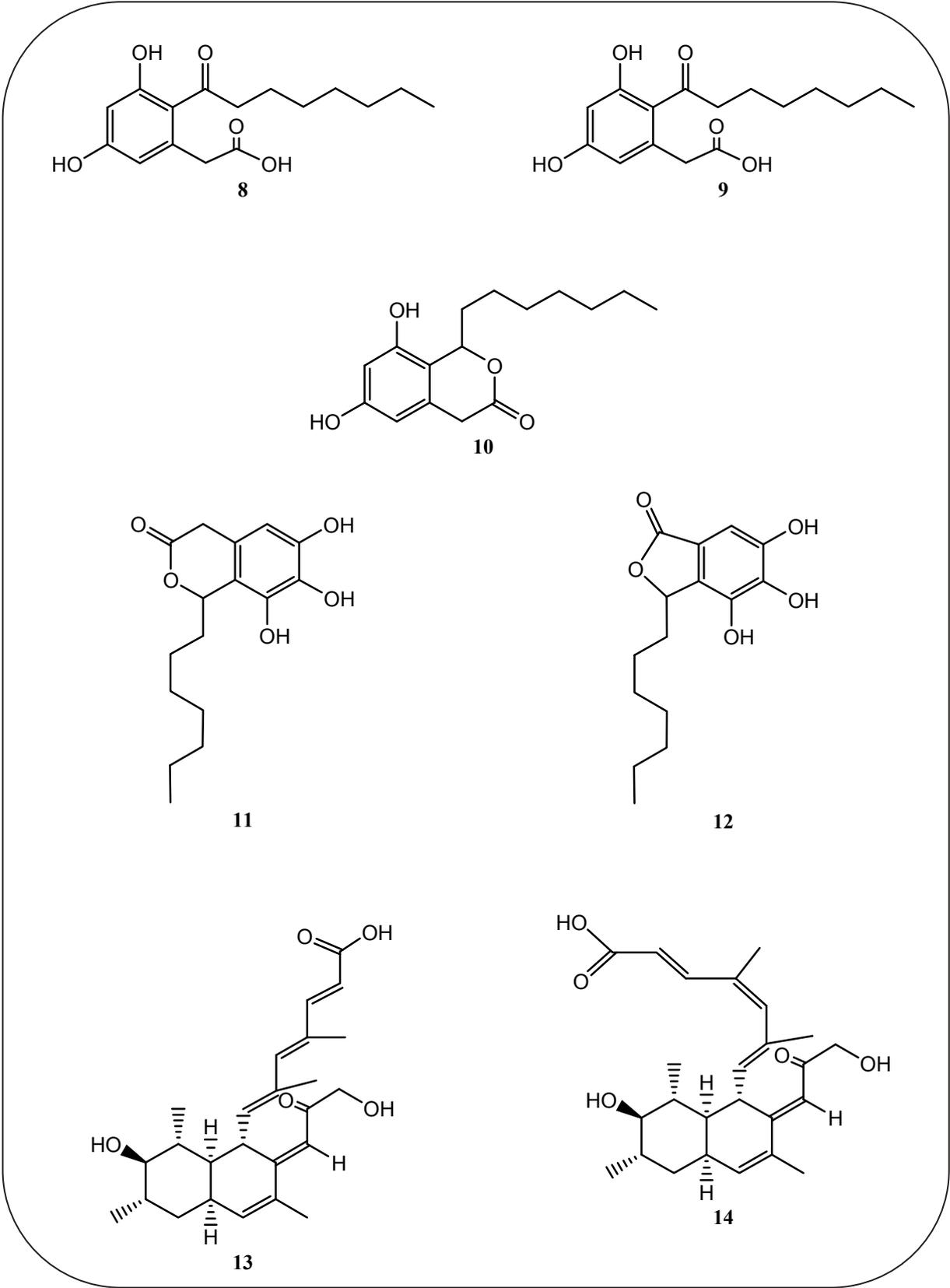
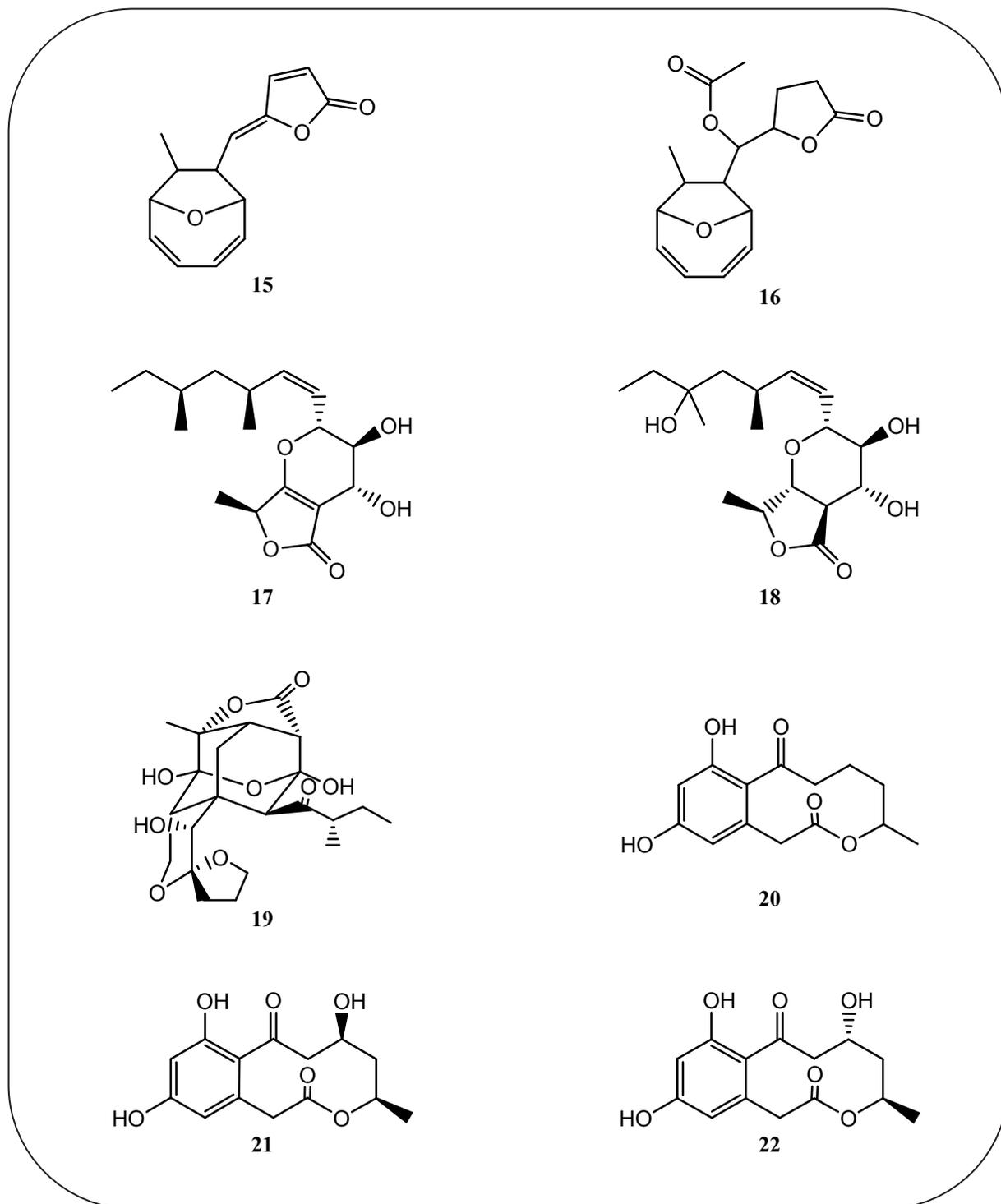


Abb. 2. Poliketide aus endophytischen Pilzen



**Abb. 3. Lactone aus endophytischen Pilzen**

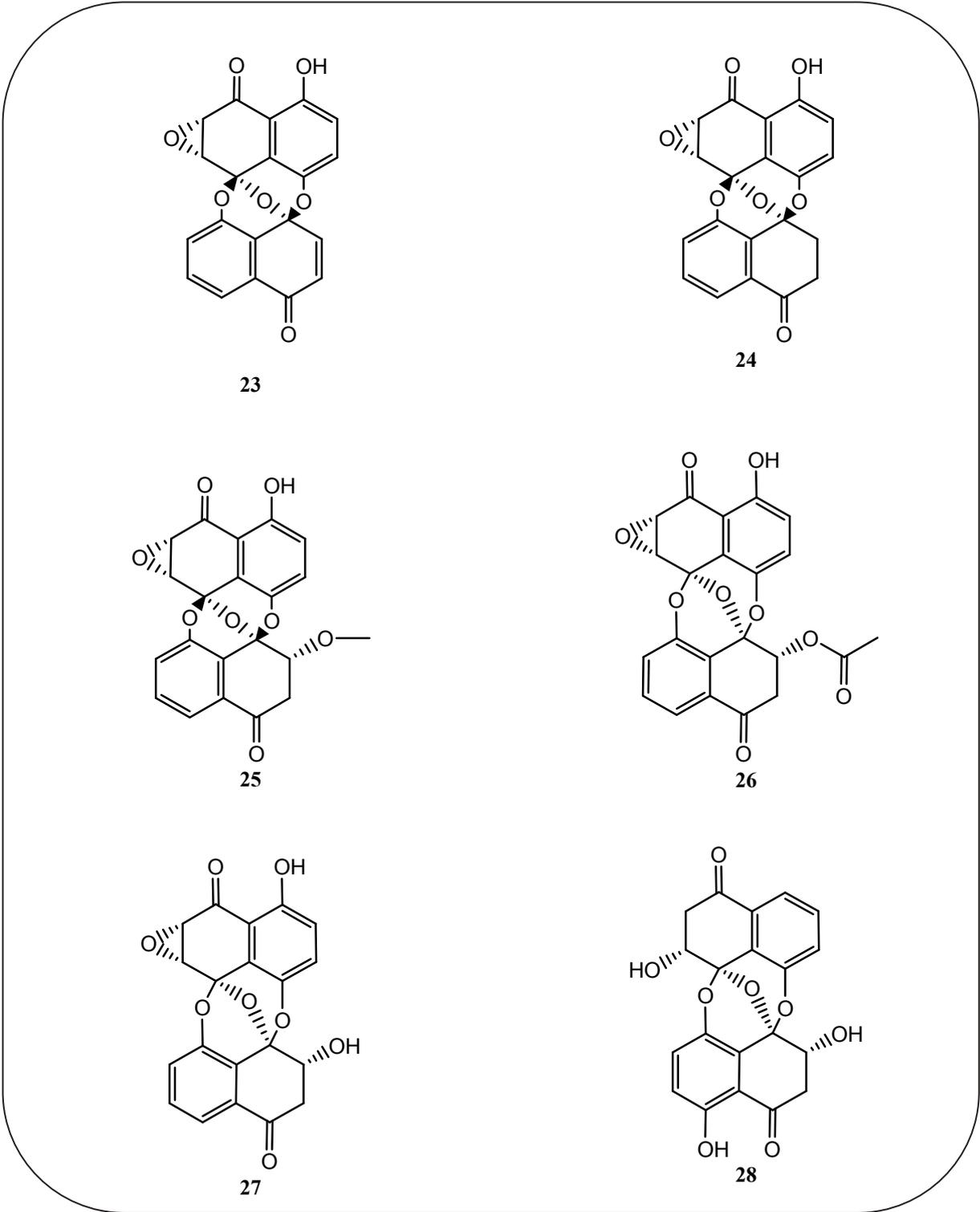
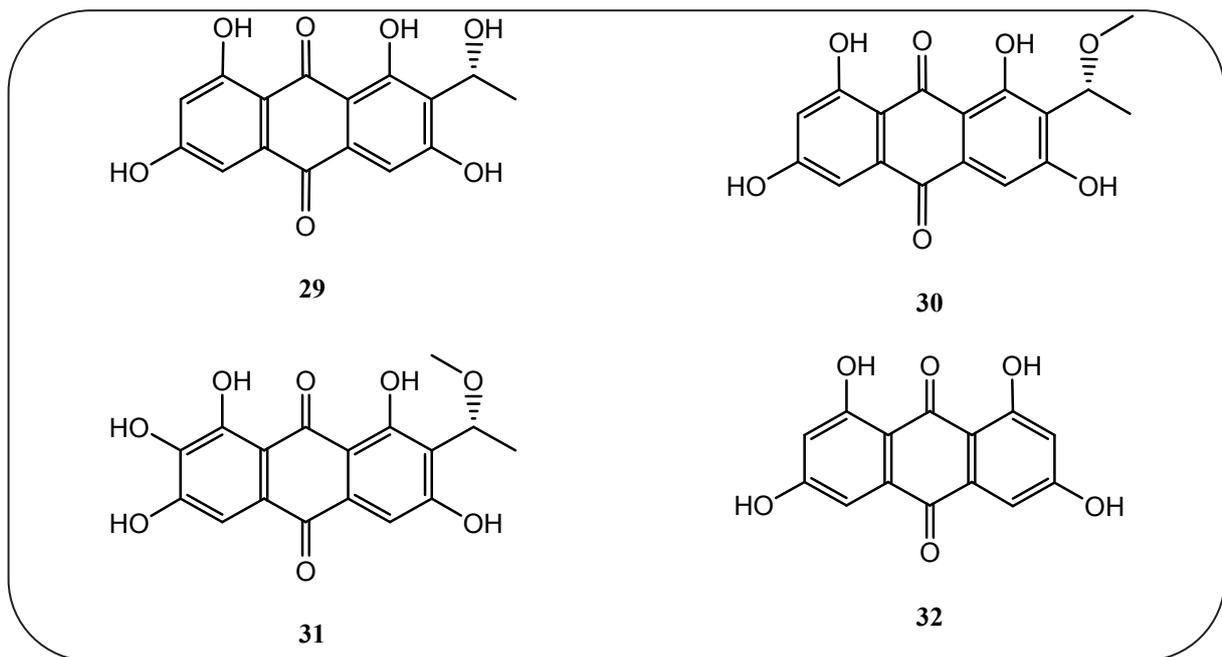
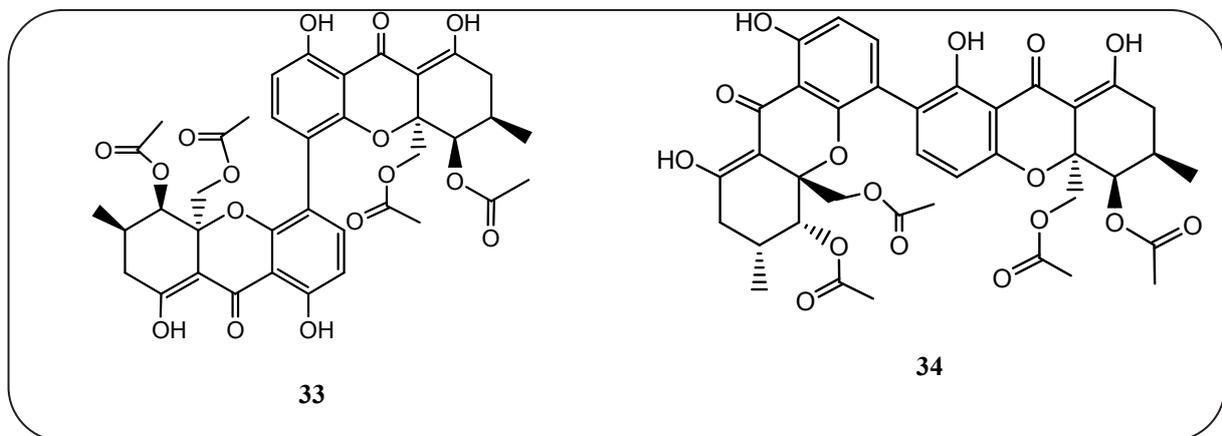


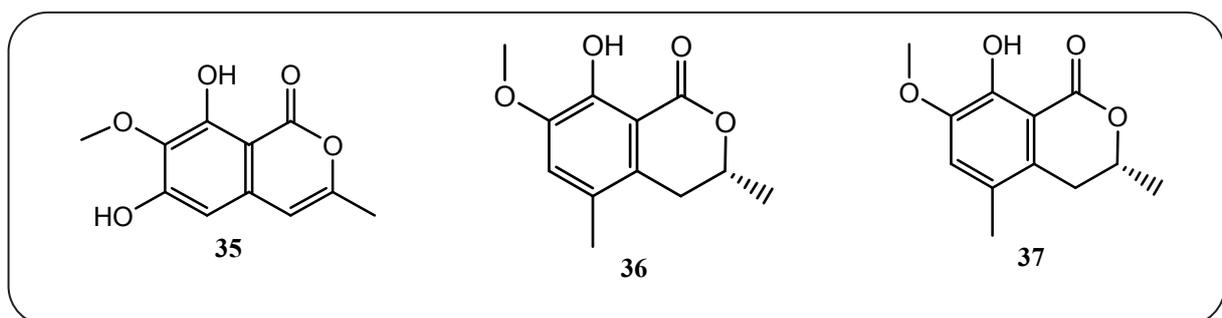
Abb. 4. Chinone aus endophytischen Pilzen



**Abb. 5. Anthrachinone aus endophytischen Pilzen**



**Abb.6. Xanthonen aus endophytischen Pilzen**



**Abb. 7. Isocoumarine aus endophytischen Pilzen**

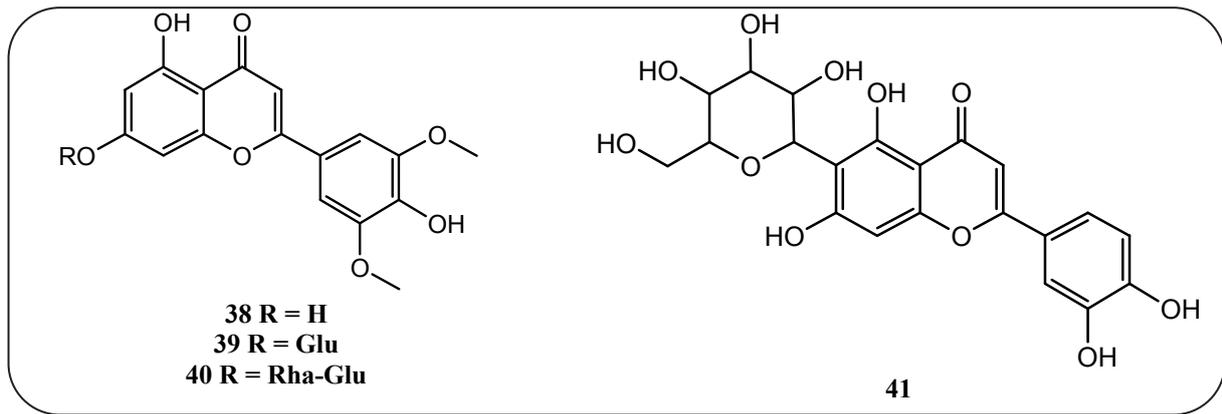


Abb. 8. Flavonoide aus endophytischen Pilzen

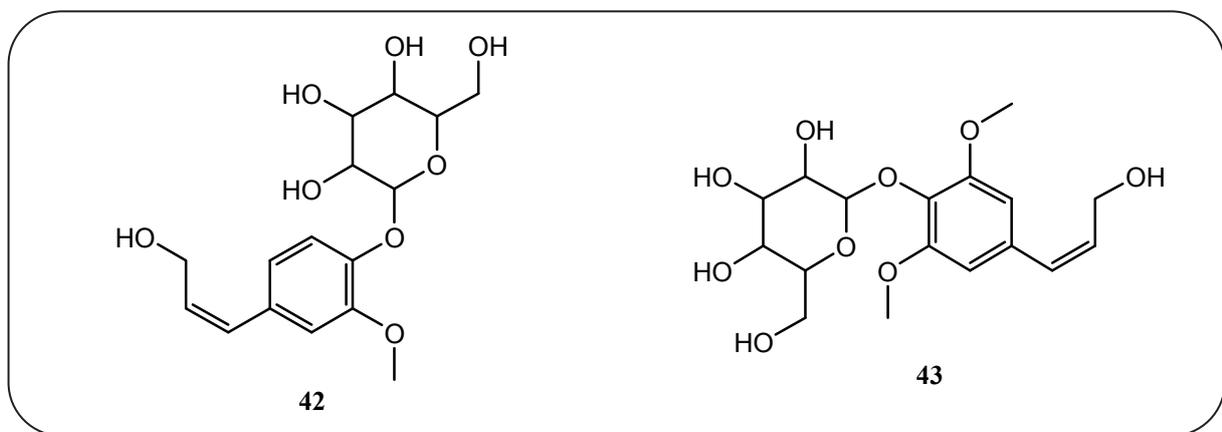


Abb.9. Phenylpropanoide aus endophytischen Pilzen

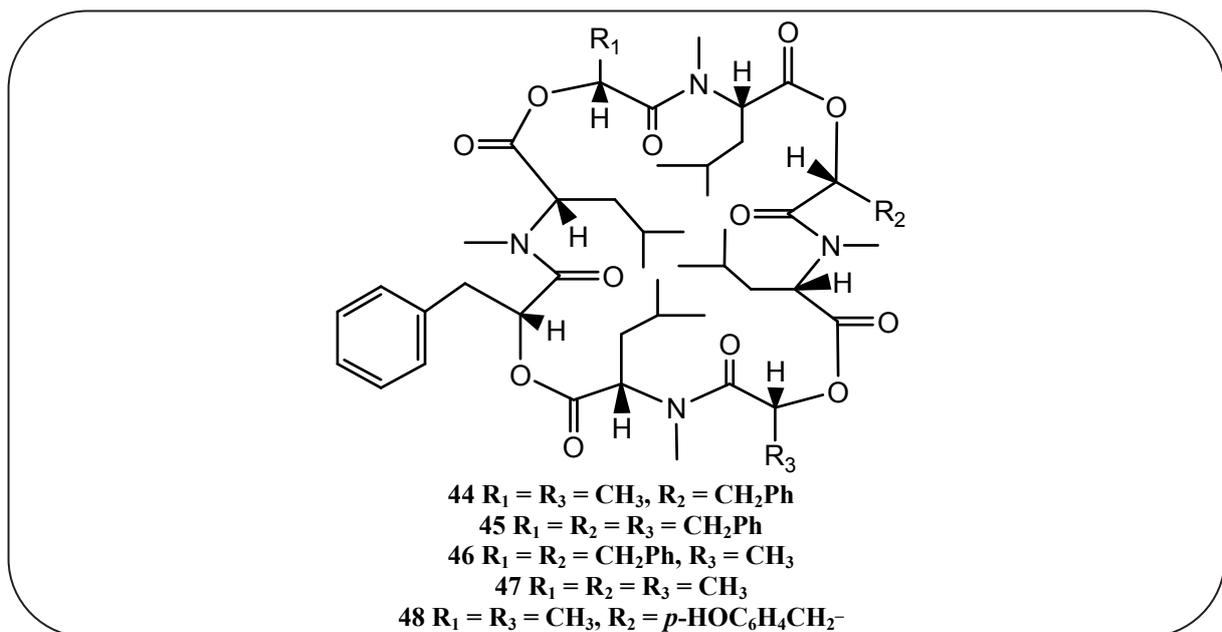
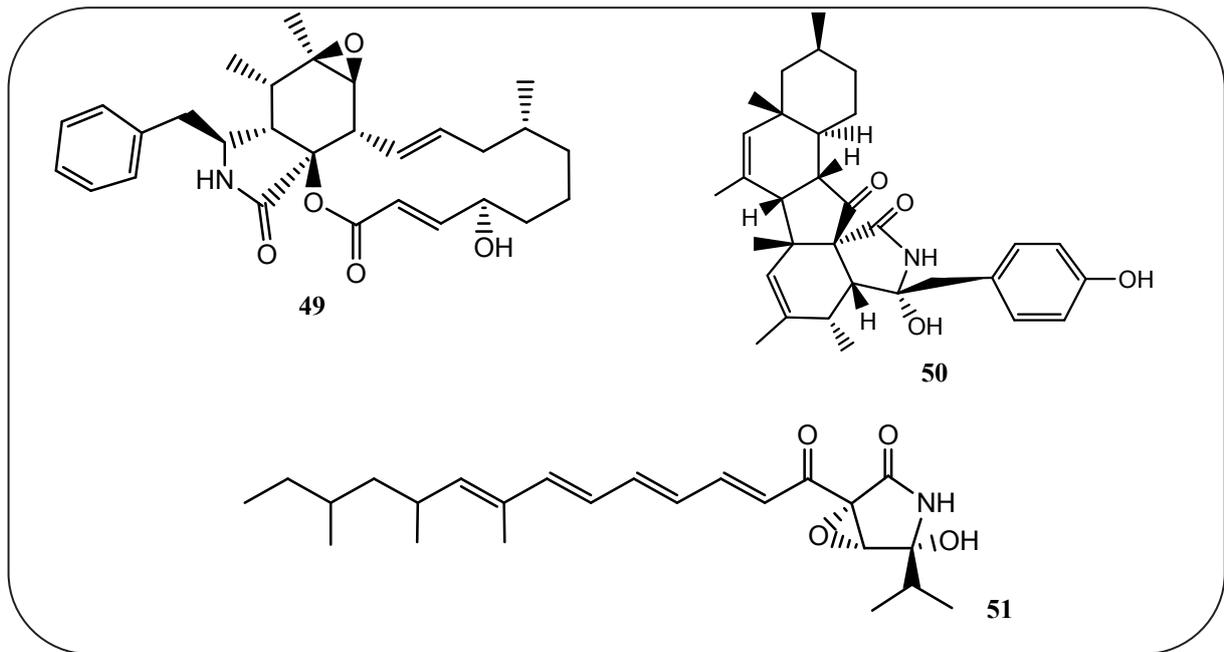
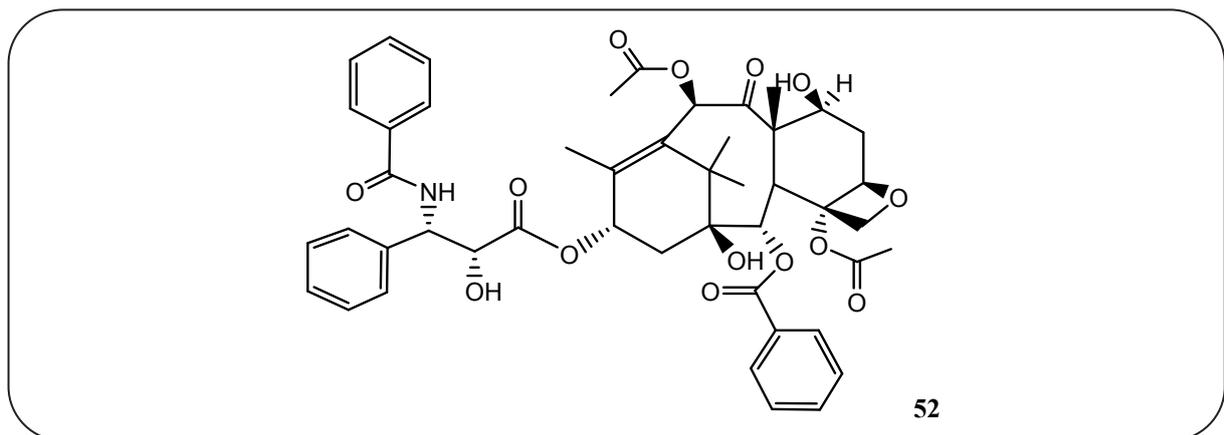


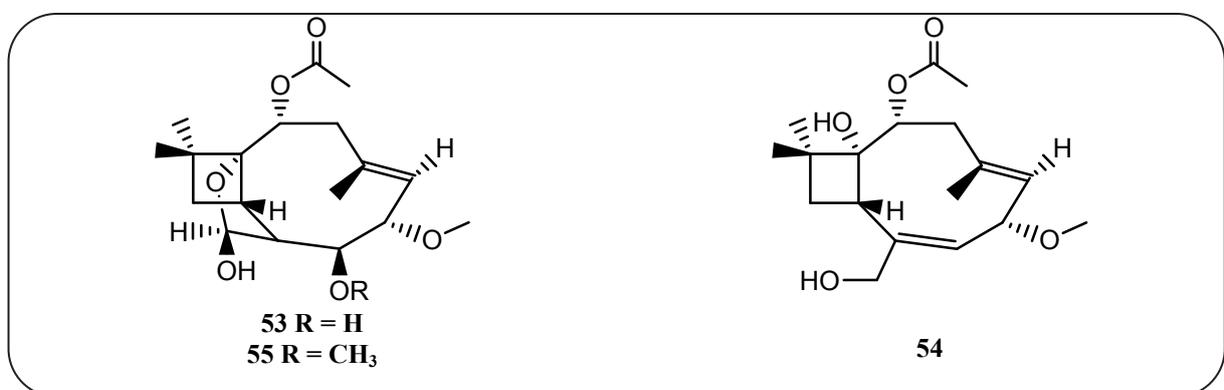
Abb. 10. Peptide aus endophytischen Pilzen



**Abb. 11. Alkaloide aus endophytischen Pilzen**



**Abb. 12. Diterpene aus endophytischen Pilzen**



**Abb. 13. Sesquiterpene aus endophytischen Pilzen**

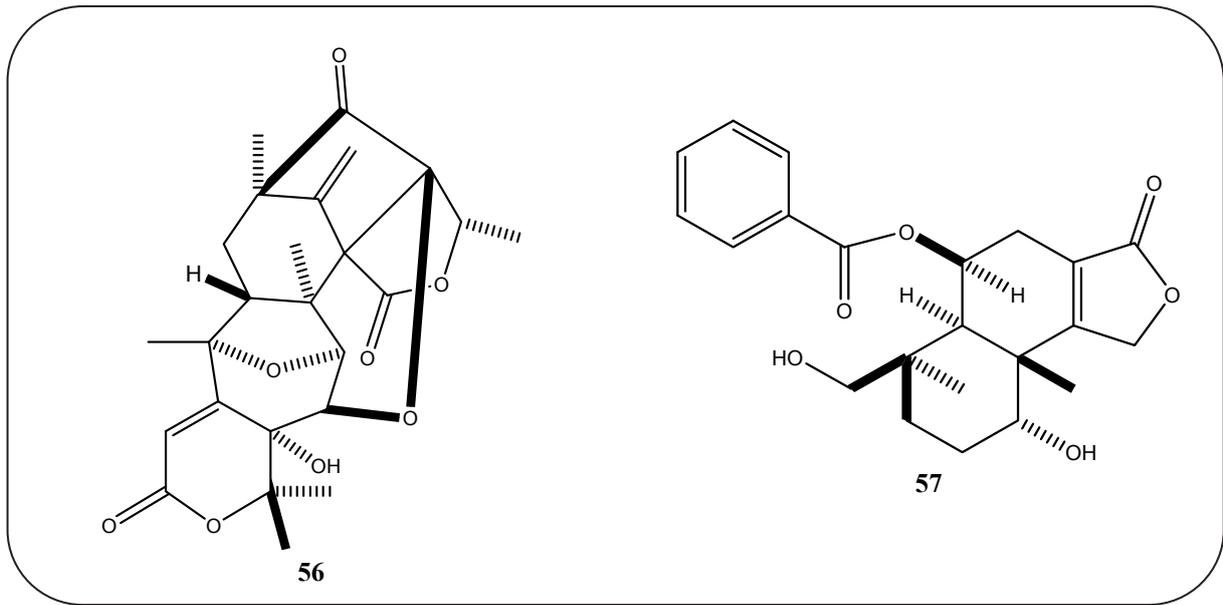


Abb. 14. Meroterpenoide aus endophytischen Pilzen

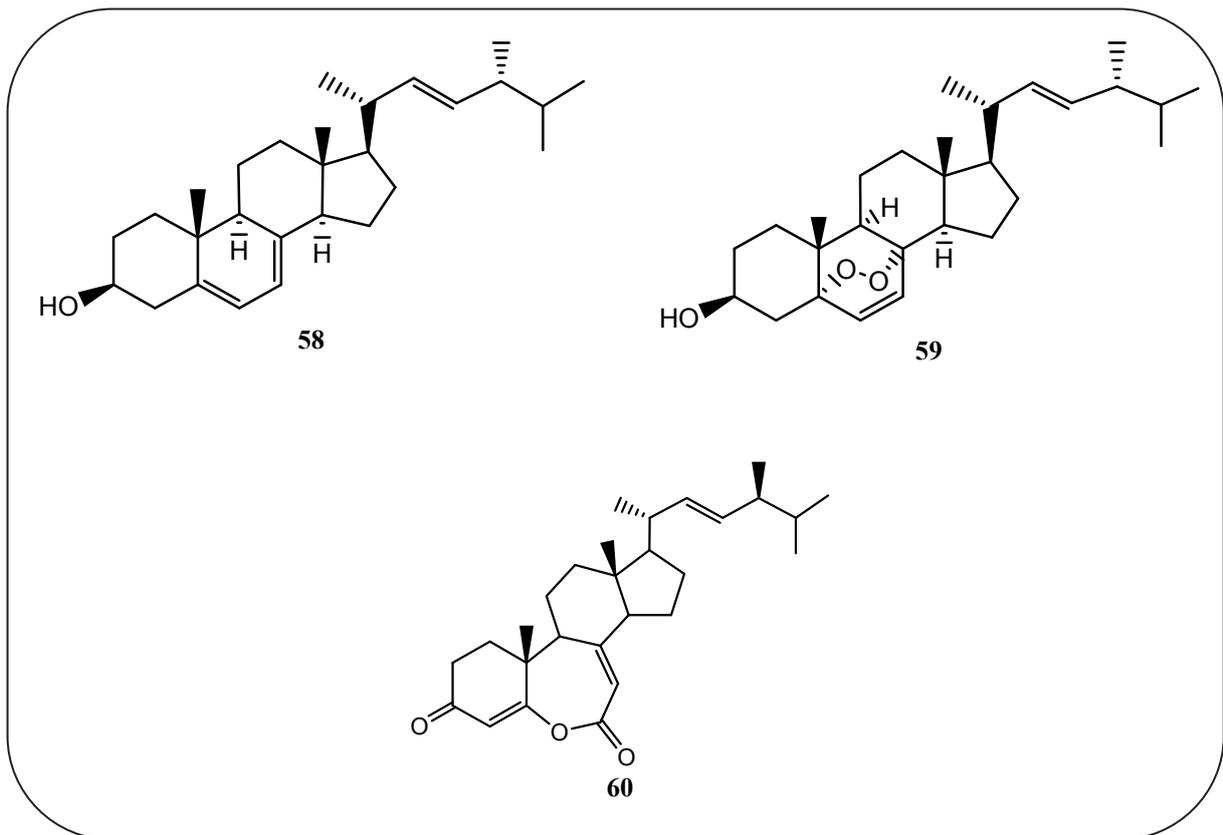


Abb. 15. Steroide aus endophytischen Pilzen

## 1.6. Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Interesse an der Erforschung endophytischer Mikroorganismen sowohl aus terrestrischen wie auch marinen Organismen hat bei der Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen in letzter Zeit stark zugenommen, da ihre Bedeutung als Quelle neuer Naturstoffe erkannt worden ist. Die von ihnen produzierten Sekundärstoffe weisen sehr häufig eine hohe Bioaktivität auf und stellen somit zusammen mit den von ihnen ableitbaren partialsynthetischen Derivaten eine vielversprechende Basis für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar (Cragg *et al.*, 1999, Pereira *et al.*, 1993; Breen, 1994; Rodrigues, 1994; Rodrigues und Dias-Filho, 1996; Miles *et al.*, 1998; Strobel und Long, 1998; Pereira *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Liberra und Lindequist, 1995; König und Wright, 1996; Pietra, 1997; Biabini und Laatsch, 1998).

Die Vorteile der Gewinnung neuer Wirkstoffe aus Mikroorganismen gegenüber Makroorganismen bestehen vor allem auf biotechnologischem Gebiet, da erstere zumindest prinzipiell fermentiert werden können. Somit ist die Gewinnung nahezu beliebiger Substanzmengen möglich, ohne dass dabei die natürlichen Ressourcen belastet werden müssen. Weiterhin sind Mikroorganismen genetisch einfacher manipulierbar, so dass durch rekombinante DNA-Techniken Gencluster für die Biosynthese praxisrelevanter Naturstoffe über die Artgrenzen hinweg neu kombiniert werden können (kombinatorische Biosynthese, König und Wright, 1997).

Aus diesen Gründen ist die Intensivierung der Erforschung der Sekundärstoffe aus Endophyten besonders aussichtsreich und wichtig, und sie wird auch in Zukunft ihren Beitrag bei der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheiten am Menschen oder zur Bekämpfung von Schädlingen in der Landwirtschaft leisten.

Die Zielsetzung dieser Arbeit gliedert sich in die folgenden Teilbereiche:

- Isolierung endophytischer Pilze aus verschiedenen Habitaten sowie die Untersuchung ihres Sekundärstoffwechsels
- Isolierung und Strukturaufklärung der von diesen endophytischen Pilzen gebildeten Sekundärstoffe
- Biologische und pharmakologische Charakterisierung der isolierten Substanzen

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Biologisches Material**

#### **2.1.1. Sammlung des endophytischen Wirtes**

Die bearbeiteten endophytischen Pilze wurden aus verschiedenen Wirten und Gebieten gewonnen. Terrestrische Wirtspflanzen sind auf dem Campus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf sowie im Rahmen einer bestehenden Kooperationsvereinbarung an der „Obafemi Awolowo University“ in Ile-Ife, Nigeria gesammelt worden. Aus Rheinbreitbach im Siebengebirge entstammt der Lebermoos *Bazzania trilobata*. Mangrovenpflanzen wurden in China („Dong Zhai Gang-Mangrove Garden“ - Hainan) im Rahmen einer Kooperation mit dem „National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs“ der „Beijing Medical University“ in Peking gesammelt. Aus den gesammelten Pflanzen bzw. Moose wurden insgesamt 18 Pilzstämme isoliert und identifiziert (Siehe Tab. 2).

#### **2.1.2. Isolierung der endophytischen Pilze aus den Wirtspflanzen**

Die endophytischen Pilze wurden aus den Wirtspflanzen und –moosen nach dem in der Literatur beschriebenen Standard (siehe insbesondere Strobel, 2002) isoliert, aber mit am Institut entwickelten Modifikationen.

Im einzelnen wurden die gesammelten Pflanzen oder Moose zunächst mit demineralisiertem Wasser gewaschen und durch Einwirken in 70% Ethanol (1-3 min) oberflächensterilisiert. Durch wiederholtes Schneiden mit einer sterilen Klinge wurden dann Gewebepartien des Pflanzeninneren über vorbereitete Festmedien auf Agarplatten gestrichen bzw. auf diese aufgebracht. Die Kulturmedien basieren auf Malzextrakt-Agar (15 g/l Malzextrakt, 15 g/l Agar), dem gefriergetrocknetes Gewebe der jeweiligen Wirtspflanze (5-10 g/l) zugesetzt wurde. Zur Unterdrückung des Wachstums von bakteriellen Kontaminanten wurde zusätzlich Chloramphenicol (0.1 g/l) inkorporiert. Zur Isolierung endophytischer Pilze

aus Mangroven wurde zusätzlich Meersalz in einer Konzentration von 10 g/l in Anpassung an den natürlichen Lebensraum der Mangroven verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von etwa 1 bis 2 Wochen (20 – 25 °C) konnten Kulturen endophytischer Pilze beobachtet werden, die z. T. deutlich aus dem Pflanzengewebe herausgewachsen sind. Zur Kontrolle wurden jeweils identische Kulturen der nicht oberflächensterilisierten Wirtspflanzen unter gleichen Bedingungen angesetzt.

Ausgehend von den so erhaltenen Primärplatten wurden einzelne Kolonien der erhaltenen Pilze auf frische Agarplatten abgeimpft. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis Reinkulturen erhalten wurden. Zur Vereinfachung war es an dieser Stelle meistens möglich, bei den Überimpfungen Malzextraktagarplatten zu verwenden, denen kein Pflanzenmaterial mehr zugesetzt wurde. (Zusammensetzung der Nähmedien siehe 2.2.6.)

**Tabelle 2. Erhaltene Pilze und ihre Wirtsorganismen**

	Herkunft	Stamm-bezeichnung	Wirtsorganismus/ verwendeter Pflanzenteil	Pilz	Identifizierungs- methode
1.	Düsseldorf Deutschland	FK-2	<i>Menyanthes trifoliata</i> Blatt	<i>Phoma</i> sp.	PCR
2.		FK-5	<i>Menyanthes trifoliata</i> Blatt	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	morphologische Merkmale
3.		SK-2	<i>Callitriche</i> sp. Blatt	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	morphologische Merkmale
4.		SK-K	<i>Callitriche</i> sp. Blatt	<i>Colletotrichum</i> sp.	morphologische Merkmale
5.		SL-5	<i>Iris pseudacorus</i> Blatt	<i>Pleurophoma cava</i>	morphologische Merkmale
6.		HN-B2	<i>Corylus avellana</i> Blatt	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PCR
7.		TUFA-S3	Tussilago farfara Stengel	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	PCR
8.	Ile-Ife Nigeria	NE-8	<i>Morinda lucida</i> Stamm	<i>Neurospora discreta</i>	PCR
9.	Hainan China	MGC-1.3	<i>Heritiera littoralis</i> Blatt	<i>Fusarium incarnatum</i>	PCR
10.		MGC-5.1	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> Rind	<i>Neurospora terricola</i>	PCR
11.		MGC-5.2	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> Blatt	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	PCR
12.		MGC-6.1	<i>Sonneratia alba</i> Blatt	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	PCR
13.		MGC-12.3	<i>Aegiceras corniculatum</i> Rinde	<i>Xylaria</i> sp.	PCR
14.		MGC-14.4	<i>Kandelia candel</i> Blatt	<i>Hypoxylon</i> sp.	PCR
15.		MGC-16.2	<i>Xylocarpus granatum</i> Blatt	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	PCR
16.		Rheinbreitbach Deutschland	BT-1	<i>Bazzania trilobata</i> (Moos)	<i>Eurotium rubrum</i>
17.	BT-3		<i>Bazzania trilobata</i> (Moos)	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	PCR
18.	BT-III.1		<i>Bazzania trilobata</i> (Moos)	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PCR

### **2.1.3. Identifizierung der isolierten Pilzstämme**

Bevor die Pilzstämme aufgrund ihrer biologischen Aktivität im Primärscreening zur weiteren chemischen Bearbeitung ausgewählt werden konnten, wurde die Identität dieser Stämme gemäß den Vorgaben der Biostoffverordnung bzw. den Regeln der guten mikrobiologischen Praxis bis zur Ebene der Art (Spezies) festgestellt. Dies erfolgte zum kleineren Teil (4 von 18 Stämmen) mit Hilfe klassischer mykologischer Methoden anhand morphologischer Merkmale durch den kommerziellen Identifizierungsservice des Centraalbureaus voor Schimmelcultures in Utrecht (Niederlande).

Mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden wurden die anderen 14 Stämme am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf identifiziert. Die Identifizierungen wurden von den Mitarbeitern Dr. Ine Dewi Indriani und Dr. Arnulf Diesel im Rahmen ihrer Doktorarbeiten durchgeführt (Siehe Tab. 2).

Hierzu wurde die DNA aus dem gefriergetrockneten Myzelium des zu untersuchenden Pilzes isoliert. Die isoliert vorliegende DNA wurde nun mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Als Primer dienten die spezifisch an Pilz-DNA bindenden Primer ITS1 (mit der Basensequenz TCCGTAGGTGAACCTGCGG) und ITS4 (mit der Basensequenz TCCTCCGCTTATTGATATGC). Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Auftrennung der DNA durchgeführt und zunächst die ca. 500 bp enthaltende Pilz-DNA aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Zur Reinigung des nach der Agarose-Gelelektrophorese vorliegenden PCR-Produktes wurde das Perfectprep Gel Cleanup Kit der Firma Eppendorf verwendet. Nachfolgend wurde die erhaltene aufgereinigte DNA von der Firma SeqLab in Göttingen sequenziert. Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde anschließend mit Hilfe des BLAST-Algorithmus mit Sequenzen der Datenbank Genebank verglichen. Auf diese Weise konnte schließlich der Pilz anhand seiner DNA identifiziert werden.

Den identifizierten Pilzen wurden Risikogruppen zugeordnet. Für die weitere Bearbeitung wurden nur Pilze, die kein Gesundheitsrisiko darstellen, ausgewählt.

## 2.1.4. Beschreibung der bearbeiteten Endophyten

**Tabelle 3. Taxonomische Zuordnung der bearbeiteten Pilze\***

Reich	Abteilung	Klasse	Unterklasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art
Fungi	Ascomycota	Ascomycetes	Incertae sedis**	Incertae sedis**	Incertae sedis**	<i>Pleurophoma</i>	<i>P. cava</i>
		Dothideomycetes	Incertae sedis**	Botryosphaerales	Botryosphaeriaceae	<i>Botryosphaeria</i>	<i>B. rhodina</i>
		Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i>
						<i>Eurotium</i>	<i>E. rubrum</i>
		Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>F. incarnatum</i>
						Sordariomycetidae	Sordariales
			Xylariomycetidae	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i>	<i>Xylaria sp.</i>
					<i>Hypoxylon</i>	<i>H. fragiforme</i>	

\* Taxonomie nach dem Internetdienst Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>).

\*\*Der lateinische Begriff „incertae sedis“ bezeichnet eine ungesicherte Zuordnung eines Taxons.

### 2.1.4.1. Stamm SL-5: *Pleurophoma cava* (Schulzer) Boerema, Loer. & Hamers (1996)

Der Pilzstamm SL-5 wurde aus dem Blatt der Sumpf-Schwertlilie (*Iris pseudacorus*), die auf dem Campus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gesammelt wurde, isoliert. Taxonomisch wurde dieser Pilz der Art *Pleurophoma cava* zugeordnet. *Pleurophoma* gehört zur Klasse Ascomycetes, aber die Zuordnung der Taxa Ordnung und Familie bleibt noch ungesichert. *P. aposphaerioides* (Briard & Hariot) und *Phoma cava* (Schulzer) gelten als Synonym dieser Art.

### 2.1.4.2. Stamm HN-B2: *Penicillium chrysogenum* Thom (1910)

Auf dem Campus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf wurden Haselnussblätter (*Corylus avellana*) gesammelt. Daraus wurde der Pilzstamm HN-B2 isoliert, der als der

Ascomycetes *Penicillium chrysogenum* identifiziert wurde. Als Synonyme für *P. chrysogenum* sind *P. aromaticum f. microsporum* (Romankova), *P. camerunense* (R. Heim), *P. harmonense* (Baghd.), *P. meleagrinum* (Biourge), *P. notatum* (Westling) zu finden.

#### **2.1.4.3. Stamm BT-3: *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M. A. Curtis) Arx (1970)**

Der Pilzstamm BT-3 wurde als Endophyt aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* (Herkunft: Rheinbreitbach, Siebengebirge) erhalten. BT-3 wurde der Art *Botryosphaeria rhodina* zugeordnet und ist eine teleomorphe Gattung der anamorphen *Lasiodiplodia theobromae*. *Botryodiplodia gossypii* (Ellis & Barthol.), *Diplodia cacaoicola* (Henn.), *D. gossypina* (Cooke), *D. natalensis* (Pole-Evans), *Physalospora fusca* (N.E. Stevens), *P. glandicola* (N.E. Stevens), *P. gossypina* (F. Stevens), *P. rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) sind Synonymen von *Botryosphaeria rhodina*.

#### **2.1.4.4. Stamm NE-8: *Neurospora discreta* D.D. Perkins & N.B. Raju (1986)**

Der Stamm NE-8, der aus der nigerianischen Bonko-Frucht (*Morinda lucida*) stammt, wurde auf dem Campus der „Obafemi Awolowo University“ in Ile-Ife, Nigeria gesammelt. Der Pilzstamm wurde taxonomisch der Art *Neurospora discreta* zugeordnet. *N. discreta* wurde so genannt wegen seiner stringent reproduktiven Isolation von anderen heterothallischen Arten dieser Gattung (Perkins und Namboori 1986). Es sind keine Synonyme für diese Art vorhanden.

#### **2.1.4.5. Stamm MGC-1.3: *Fusarium incarnatum* (Desm.) Sacc. (1886)**

Blätter der chinesischen Mangrovepflanze *Hertiera littoralis* wurden im „Dong Zhai Gang-Mangrove Garden“ auf Hainan, China gesammelt. Daraus wurden die mangrovenassoziierten Pilze *Fusarium incarnatum* (Stamm MGC-1.3) isoliert. Als Synonyme dieser Art gelten *F. semitectum* (Berk. & Ravenel) und *Pseudofusarium semitectum* (Berk. & Ravenel) Matsush.

#### **2.1.4.6. Stamm MGC-5.1: *Neurospora terricola* Goch. & Backus (1962)**

Der Stamm MGC-5.1 wurde als Endophyt aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Bruguiera gymnorhiza* isoliert. Taxonomisch wurde er als die homothallische Art *Neurospora terricola* identifiziert. Die Gattung *Neurospora* bewohnt tropische und subtropische Bereiche, sowie auch gemäßigte Klimazonen (Yun *et al* 1999). Für *N. terricola* sind keine Synonyme vorhanden.

#### **2.1.4.7. Stamm MGC-12.3: *Xylaria* sp. Hill ex Schrank (1789)**

Der Pilzstamm MGC-12.3 wurde aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Aegiceras cornilatum* aus dem „Dong Zhai Gang-Mangrove Garden“ isoliert. Er gehört zu der nicht näher bestimmten Gattung *Xylaria* sp.. Diese Gattung ist wahrscheinlich die größte der Familie Xylariaceae mit mehr als 500 Arten. *Xylaria*-Arten sind häufig Endophyten, besonders in den Tropen und wurden aus Palmen, Orchideen, Bromelien, Farne und Regenwaldbäumen isoliert (Dreyfuss und Petrini, 1984; Petrini und Petrini, 1995; Richardson und Currah, 1995).

#### **2.1.4.8. Stamm BT-III.1: *Hypoxylon fragiforme* (Pers.) J. Kickx f.(1835)**

Der Lebermoos *Bazzania trilobata* wurde im Siebengebirge in der Nähe von Rheinbreitbach gesammelt. Daraus wurde der Stamm BT-III.1 als Endophyt isoliert und mittels molekularbiologischer Methoden als *Hypoxylon fragiforme* identifiziert. *Hypoxylon* ist eine kosmopolitische Gattung der Xylariaceae, die derzeit 130 Arten umfasst, von denen mindestens 25 in Europa vertreten sind (Mühlbauer *et al.*, 2002).

Mehrere Arten gelten als Synonyme für *H. fragiforme*: *Discosphaera radians* (Tode) Dumort., *Epixylon coccineum* (Bull.) Füsting, *Hypoxylon argillaceum* (Fr.) J. Kickx f., *Hypoxylon coccineum* Bull., *Hypoxylon cupreum* Fr., *Hypoxylon enteromelum* (Schwein.) Berk., *Hypoxylon majusculum* Cooke, *Lycoperdon variolosum* Huds., *Peripherostoma fragiforme* (Pers.) Gray, *Sphaeria argillacea* Fr., *Sphaeria bicolor* DC. & Lam., *Sphaeria enteromela* Schwein., *Sphaeria fragiformis* Pers., *Sphaeria fragiformis* var. *radians* (Tode)

Pers., *Sphaeria lateritia* DC. & Lam., *Sphaeria radians* Tode, *Sphaeria radiata* Schumach., *Sphaeria rubra* Willd., *Sphaeria tuberculosa* Sowerby, *Stromatosphaeria fragiformis* (Pers.) Grev., *Valsa fragiformis* Scop..

#### **2.1.4.9. Stamm BT-1: *Eurotium rubrum* W. Bremer (1901)**

Der Stamm BT-1 wurde aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* (Herkunft: Rheinbreitbach, Siebengebirge) isoliert und mittels molekularbiologischer Methoden als *Eurotium rubrum* identifiziert. Die zu den Ascomyceten gehörende Gattung *Eurotium* stellt den Teleomorph (generative Hauptfruchtform) von bestimmten Arten der anamorphen Gattung *Aspergillus* (vegetative konidienbildende Nebenfruchtform) dar (Hofbauer *et al.*, 2003). *Aspergillus ruber* Thom & Church und *A. sejunctus* Bainier & Sartory sind Synonyme von *E. rubrum*.

Alle genannten Synonyme wurden aus dem Internetdienst Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>) entnommen.

## **2.2. Kultivierungsmethoden und verwendete Nährmedien**

### **2.2.1. Anlage von Flüssigkulturen**

Die gewonnenen Reinkulturen wurden zunächst in kleinerem Maßstab kultiviert, damit Extrakte zur Durchführung eines chemischen und biologischen Primärscreenings erhalten werden konnten. Jede Kultur wurde in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, der 300 ml Wickerham-Flüssigmedium (Zusammensetzung siehe 2.2.3.) enthielt. Um eine eventuelle Kontamination des Mediums auszuschließen, wurden nicht angeimpfte Kontrollansätze parallel beobachtet. Nach zwei bis vier Wochen Inkubation bei Raumtemperatur, je nach Wachstum der jeweiligen Pilzkultur, wurden die Standkulturen dann extrahiert.

Pilzstämme, deren Extrakte im initialen Screening biologische Aktivität bzw. ein interessantes chemisches Profil zeigten, wurden im größeren Maßstab kultiviert. Die Large-Scale-Kultur setzte sich aus 33 Kolben zu je 300 ml Wickerham-Flüssigmedium zusammen.

### 2.2.2. Anlage von Festkulturen

Um eine quantitative bzw. qualitative Optimierung der Inhaltstoffmuster zu bekommen, wurden die Pilze alternativ auf Festmedium kultiviert. Als Nährboden wurde Jasmin-Reis angewendet.

Die Reinkulturen wurden erneut auf Agarplatten überimpft, um eine aktiv wachsende Ausgangskultur zu bekommen. Der Fermentierungsprozess wurde in einem (kleiner Maßstab) bzw. 30 (großer Maßstab) 1 L Erlenmeyerkolben durchgeführt, in die jeweils 100 g Reis (Jasmine Broken Rice, Rose Brand) eingefüllt wurden. 100 mL Wasser wurden dem Reis hinzugegeben und über Nacht quellen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Reismedien 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung der Kolben auf Raumtemperatur wurden die Reismedien überimpft. Nach 40 bis 60 Inkubationstagen wurden die fermentierten Reiskulturen extrahiert.

### 2.2.3. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

#### Medium zur Isolierung von Endophyten

Agar-Agar	15.0 g/l
getrocknetes, pulverisiertes Pflanzenmaterial der Wirtspflanze	15.0 g/l
Chloramphenicol	0.2 g/l
ggf. Meersalz	10 g/l
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (eingestellt mit 0.1 N NaOH bzw. HCl)	7.4-7.8

**Malzmedium für Reinkulturen**

Agar-Agar	15.0 g/l
Malzextrakt	15.0 g/l
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (eingestellt mit 0.1 N NaOH bzw. HCl)	7.4-7.8

**Wickerham-Medium für Flüssigkulturen**

Hefeextrakt	3.0 g/l
Malzextrakt	3.0 g/l
Pepton	5.0 g/l
Glucose	20.0 g/l
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (eingestellt mit 0.1 N NaOH bzw. HCl)	7.2-7.4

**Reis-Medium für Festkulturen**

Reis	100.0 g
Destilliertes Wasser	100 ml

Sämtliche Medien wurden unter Standardbedingungen autoklaviert.

**2.3. Extraktion der Standkulturen**

**2.3.1. Extraktion der Small-Scale-Kulturen**

Zur Abtötung der Kulturen wurden jeder Erlenmeyerkolben der Small-Scale-Kulturen mit 250 ml Ethylacetat überschichtet und über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde die gesamte Kultur mit Ultraturax für 10 min extrahiert und über dem Büchnertrichter filtriert, um der Myzeliumrückstand vom Medium abzutrennen. Das Myzel wurde verworfen. Die Kulturbrühe und Ethylacetatphase wurden in einem Scheidetrichter abgetrennt. Die Kulturbrühe wurde noch 2 Mal mit 200 ml Ethylacetat versetzt und mit Ultraturax für 10 min extrahiert. Nach der Phasentrennung wurden die vereinigten EtOAc-Phase ggf. gegen 100 ml destilliertes Wasser ausgeschüttelt, um eventuell vorhandenes Meersalz zu entfernen. Die eingeeengte EtOAc-Phase wurde in 100 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (90:10) gelöst und gegen 100 ml Cyclohexan ausgeschüttelt, um vorhandene Fettsäuren abzutrennen. Der Ethylacetatextrakt wurde gewonnen, nachdem die Ethylacetatphase noch einmal mit dem Rotationsverdampfer eingeeengt wurde.

Bei der Kultivierung auf Reismedium wurde nach der Inkubationszeit die fermentierten Reismedien mit 300 ml EtOAc überschichtet und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Mycel-Reismedium mit einem Spachtel zerkleinert, 3-fach mit EtOAc und 2-fach mit MeOH oder BuOH extrahiert, unter Vakuum filtriert und einrotiert. So wurden Ethylacetatextrakt sowie Methanol- bzw. Buthanolextrakt erhalten.

Die Extrakte wurden mit Hilfe einer chromatographischen Untersuchung (z.B. HPLC und LC-MS) analysiert und für das Primärscreening auf biologische Aktivität eingesetzt. Für die Fälle, wo genügend Extraktmenge vorhanden war, wurde dieser ggf. weiteren chromatographischer Auftrennung unterzogen.

### **2.3.2. Extraktion der Large-Scale-Kulturen**

Pilzstämmen, deren Extrakte im initialen Screening biologische Aktivität zeigten, wurden im größeren Maßstab kultiviert und ihre Extrakte bioaktivitätsgeleitet fraktioniert.

Bei der Large-Scale-Kultur, die sich aus 33 Kolben zu je 300 ml Flußmedium zusammensetzte, wurden Kulturbrühe und Myzelien getrennt aufgearbeitet. Die mit einer Pinzette abgetrennt Myzelien wurden mit Methanol zu Abtötung überschichtet. Am folgenden Tag wurde das Ganze mit Ultraturax für 10 min extrahiert und über den Büchnertrichter unter Vakuum filtriert. Das Filtrat wurde anschließend einrotiert und so das Methanolextrakt erhalten. Die Kulturbrühe wurde, wie unter 2.3.1. beschrieben, behandelt und so das Ethylacetatextrakt erhalten.

Die Reiskulturen wurde hier genauso extrahiert, wie unter 2.3.1. beschrieben wurde.

## **2.4. Isolierung biologisch aktiver Verbindungen aus den endophytischen Pilzen**

Die erhaltenen Extrakte (siehe 2.3.) wurden wie folgt mittels verschiedener chromatographischer Methoden aufgearbeitet:

Vor der chromatographischen Auftrennung erfolgte als erst eine Flüssig-Flüssig-Verteilung der Extrakte jeweils zwischen Hexan, Ethylacetat, Butanol und Wasser. Anschließend folgte eine Vortrennung entweder per Vacuum-Liquid-Chromatographie (VLC) an Kieselgel oder eine Umkehrphasen-Trennung an HP-20 (Fa. Toyopearl). Weitere Trennschritte umfassten beispielsweise Säulen-, Flash- oder Mitteldruckchromatographie an Normal- und Umkehrphasen (Kieselgel bzw. RP-18-Materialien) oder Gelfiltration über Sephadex LH-20. Als letzter Reinigungsschritt schloss sich eine präparative oder semipräparative HPLC-Trennung (über RP-18 oder Kieselgel) an. Jeder Trennungs- und Reinigungsschritt wurde mittels HPLC-DAD und LC/MS überwacht. Für nicht ionisierende Substanzen ohne geeignete Chromophore stand zusätzlich auch ein Verdampfungs-Lichtstreuendetektor zur Verfügung.

Alle erhaltenen Fraktionen wurden wiederum den entsprechenden Bioassays unterzogen, um durch diese bioaktivitätsgeleitete Auftrennung schließlich die aktiven Reinsubstanzen zu erhalten.

## **2.5. Strukturaufklärung der biologisch aktiven Verbindungen**

Die Strukturaufklärung der isolierten Naturstoffe erfolgte unter Einsatz moderner spektroskopischer Verfahren, die am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie bereits seit langem etabliert sind: HPLC-UV/VIS- und LC/MS-Spektren mit eigenen Spektrenbibliotheken; kommerzielle Naturstoffdatenbanken (z. B. ANTIBASE oder Dictionary of Natural Products); Ion Trap-LC/MS (ESI und APCI) und eindimensionale ( $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT) sowie zweidimensionale (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY) NMR-Experimente (NMR-Service der Fakultät für Chemie in Düsseldorf und Abteilung für Molekulare Strukturforchung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig).

## **2.6. Primärscreening zur Ermittlung biologisch bzw. chemisch interessanter Extrakte**

Um interessante Pilzstämme bzw. Extrakte für die weitere chemische Aufarbeitung zu ermitteln, wurde mit den Extrakten aus der Small-Scale-Kultur ein orientierendes biologisches bzw. chemisches Primärscreening durchgeführt.

Für das Primärscreening wurden die folgenden Testsysteme eingesetzt:

- Antimikrobielle bzw. antifungale Aktivität: klassischer Agarplattendiffusionstest mit den Testkeimen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* bzw. *Saccharomyces cerevisiae*.
- Fungizide bzw. fungistatische Wirkung: Bioautographischer Assay mit den phytopathogenen Keimen *Cladosporium cucumerinum* bzw. *C. herbarum*.

Für das chemische Primärscreening wurden die Rohreextrakte mittels HPLC-DAD bzw. LC-MS untersucht.

## **2.7. Biologische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanze**

Neben den oben erwähnten Bioassays des Primärscreening (s. 2.6.) standen für die pharmakologische Charakterisierung insbesondere der erhaltenen Reinsubstanzen weitere Testsysteme zur Verfügung:

- Eingehende Untersuchungen zytotoxisch aktiver Substanzen fanden in Tests mit der Zelllinie L-5178Y (Lymphomzellen der Maus) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. W.E.G Müller (Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz) statt.
- Die Wirkung als Inhibitoren verschiedener Proteinkinasen wurde in Kooperation mit der Firma ProQinase GmbH (Freiburg) untersucht.

## 2.8. Beschreibung der Tests auf biologische Aktivität

### 2.8.1. Antibiotische und fungizide Aktivität

Die antibiotische und fungizide Wirkung der erhaltenen Extrakte bzw. der isolierten Verbindung wurde mittels des sogenannten Agarplattendiffusionstest untersucht. Als Testorganismen wurden die folgenden Mikroorganismen verwendet:

- das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* (BS), das Gram-negative *Escherichia coli* (EC) und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (SC)
- die phytopathogenen Pilze *Cladosporium cucumerinum* (CC) und *Cladosporium herbarum* (CH)

Zunächst wurden *E. coli* und *B. subtilis* in dem Luria Bertoni Medium und *S. cerevisiae* in einem Universalmedium für Hefen kultiviert (Zusammensetzung siehe 2.8.1.1.). Nach ausreichendem Wachstum wurde ein Aliquot von 400 µl für Bakterien und 200 µl für Hefe mittels einer Eppendorf-Pipette zum Animpfen der Platten entnommen. Anschließend wurden die Kulturen mit einer sterilen Impföse gleichmäßig auf die Agarplatten aufgebracht.

Die zu testenden Proben wurden meistens in Methanol gelöst. Im Fall eines Extraktes wurde eine Konzentration von 25 mg/ml benutzt und bei Reinsubstanzen eine Konzentration von 5 mg/ml.

Die Proben wurden zunächst in zwei verschiedenen Volumina von jeweils 20 µl und 10 µl mit einer Eppendorf-Pipette auf Filterpapierplättchen (Oxoid Ltd.) mit einem Durchmesser von 5 mm aufgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Filterpapierplättchen kreisförmig auf der Agarplatten mit dem jeweils Kulturen platziert. Die Platten wurden anschließend über 24 h bei 37 °C für Bakterien und 27 °C für Hefen im Brutschrank inkubiert. Der entstandene Hemmhof um die Plättchen wurde dann in mm gemessen. Gentamicin, Penicillin und Streptomycin wurden als Positivkontrollen für die antibakterielle Tests benutzt. Nystatin dient als Kontrolle für den fungistatischen Test mit Hefe. Zur Negativkontrolle wurde jeweils das Lösungsmittel Methanol auf einem Plättchen getestet.

Für den Test mit *Cladosporium cucumerinum* und *C. herbarum* wurde ein Kartoffel-Dextrose-Medium verwendet. Kultiviert wurden die Pilze zunächst in einem frischen Flüssigmedium für ca. 4 Wochen (Zusammensetzungen der Medien siehe 2.8.1.1.). Nach

ausreichendem Wachstum wurden die Flüssigkulturen mit Hilfe eines Pürriergerätes zerkleinert und anschließend unter Vakuum filtriert. Zu 300 ml semi-flüssigem Kartoffel-Dextrose-Medium (mit zusätzlich 0.01% Agar) wurde 100 ml Suspension mit Pilzsporen gemischt. Von dieser Sporesuspension wurde ein Aliquot von 10 ml auf die Platten pipettiert und mit einer sterilen Impföse gleichmäßig darauf aufgebracht. Das Auftragen der zu testenden Substanzen wurde wie oben geschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden dann für ca. 1 Woche bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene Hemmhof um die Plättchen bei aktiven Substanzen wurde vermessen. Als Positivkontrolle wurde Nystatin benutzt.

**Tabelle 4. Durchmesser des Hemmhofes [mm] für die Positivkontrollen**

Substanz	EC		BS		SC		CC	CH
	50 µg	100 µg						
Gentamicin	23	23	18	22	-	-	-	-
Streptomycin	14	16	18	22	-	-	-	-
Penicillin	7	7	12	15	-	-	-	-
Nystatin	-	-	-	-	20	20	39	19

#### 2.8.1.1. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

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

Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
Natriumchlorid	10.0 g
Agar-Agar	15.0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (eingestellt mit 0.1 N NaOH bzw. HCl)	7.0

**Universal-Hefe-Medium für *Saccharomyces cerevisiae***

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

**Flüssigmedium für *Cladosporium cucumerinum* und *Cladosporium herbarum***

Mannitose	50.0 g
Saccharose	50.0 g
Bernsteinsäure	5.4 g
Hefeextrakt	3.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.3 g
FeSO <sub>4</sub>	10.0 mg
ZnSO <sub>4</sub>	10.0 mg
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml
pH (eingestellt mit 0.1 N NaOH bzw. HCl)	5.4

**Kartoffel-Dextrose-Medium**

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

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

Sämtliche Medien wurden unter Standardbedingungen autoklaviert.

### 2.8.3. Zytotoxizität

In diesem Test wurde der Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellelinie L5178Y (Lymphomzellen der Maus) mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. Durchgeführt wurden die Tests von der Arbeitsgruppe von Prof. W.E.G. Müller in der Abteilung Angewandte Molekularbiologie des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Mainz.

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des MTT-Assay beruht hauptsächlich auf der Messung der Glykolyserate der Zellen. In diesem Test nehmen lebende Zellen das gelbe Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) auf und setzen es durch Enzymen des endoplasmatischen Retikulums der lebenden Zellen zum wasserunlöslichen, blau-violetten Farbstoff Thiazolylblau-Formazan um. Die Menge an gebildetem Formazan kann über die optische Dichte bestimmt werden und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. (Berridge *et al.*, 1996).

Die L5178Y-Zellen wurden in „Eagle’s Minimal Essential Medium“ mit 10% Pferdserum (Müller *et al.*, 1985; Kreuter *et al.*, 1992) unter Standardbedingungen (Drexler *et al.*, 1995) gehalten. Für die Tests wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase aus dem Medium entnommen, gewaschen und in frischem Medium in einer Konzentration von ca.  $10^5$  Zellen/ml suspendiert (Müller *et al.*, 1985).

Die Testsubstanzen wurden zunächst in DMSO gelöst und dann mit Kulturmedium auf 1% DMSO verdünnt. Anschließend wurden 90 µl der Zellsuspension und 10 µl der jeweiligen Testlösung in jede Vertiefung einer 96-Well-ELISA-Platten hineinpipettiert. Als Kontrolle diente Medium unter Zusatz von DMSO. Danach wurden die Platten für 48 h bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden zu jeder Vertiefung 10 µl Methylthiazoltetrazolium (5 mg/ml) hinzugefügt. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit unter gleichen Bedingungen wurde 120 µl 5%iger Ameisensäure in Isopropylalkohol zugegeben, um die Lyse der Zellen herbeizuführen. Darauf folgend wurde die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (Titerteck Multiscan, Flow Laboratories) gemessen, die je nach Anzahl lebender Zellen unterschiedlich stark ausfiel und somit ein direktes Maß für eine Zytotoxizitätsbestimmung darstellt.

### 2.8.3. Proteinkinase-Assays

**Tabelle 5. Liste der getesteten Proteinkinasen und ihrer Substrate<sup>1</sup>**

Familie	Kinase	Substrat
Serin/Threoninkinasen	AKT1/PKB alpha	GCS3(14-27)
	ARK5	Autophos.
	Aurora-A	tetra(LRRWSLG)
	Aurora-B	tetra(LRRWSLG)
	CDK2/Cyclin A	Histon H1
	CDK4/Cyclin D1	Rb-CTF
	CK2-alpha1	p53-CTM
	COT	Autophos.
	PLK-1	Casein
	B-RAF-VE	MEK1-KM
	SAK	Autophos.
Rezeptor-Tyrosinkinasen	EGFR	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	EPHB4	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	ERBB2	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	FLT3	Poly (Ala,Glu,Lys,tyr) <sub>6:2:5:1</sub>
	IGF1-R	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	INS-R	Poly (Ala,Glu,Lys,tyr) <sub>6:2:5:1</sub>
	MET	Poly (Ala,Glu,Lys,tyr) <sub>6:2:5:1</sub>
	PDGFR- beta	Poly (Ala,Glu,Lys,tyr) <sub>6:2:5:1</sub>
	TIE-2	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	VEGF-R2	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	VEGF-R3	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
Lösliche Tyrosinkinasen	FAK	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>
	SRC	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>

<sup>1</sup> Tests wurden von der Firma ProQinase GmbH (Freiburg) durchgeführt

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Naturstoffe wurden im Rahmen einer bestehenden Forschungs Kooperation von der Firma ProQinase GmbH (Freiburg) hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung an Proteinkinasen geprüft. Für diese Test wurde ein von der Fa. ProQinase entwickelter Protein Kinase Assay (<sup>33</sup>PanQinase® Assay) für die Beeinflussung der Aktivität von 24 Kinasen angewendet. Bei den Assays wurden nach dem Protokoll der Fa. ProQinase wie folgt vorgegangen (Angaben von ProQinase):

1. Die Kinase-Assays wurden in 96-Well-Flash-Platten (Perkin Elmer) durchgeführt. Der Reaktions-Cocktail enthielt: Assay-Puffer (Standard Puffer oder PKC-Assay Puffer), ATP-Lösung (in H<sub>2</sub>O), Testsubstanz (in 10% DMSO), Substrat /Enzym-Lösung (premixed). Die Tabelle 5 zeigt die Kinasen und die Substraten, die für diesen Assay benutzen wurden.

2. Der Assay für alle Enzyme enthielt: HEPES-NaOH, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na-orthovanadat, DTT, PEG<sub>20000</sub> und [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP.
3. Die Reaktions-Cocktails wurden bei 30 °C für 80 min inkubiert.
4. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 2% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt, die Platten aspiriert und zwei Mal mit 0.9% (w/v) NaCl oder mit Wasser gewaschen.
5. Die <sup>33</sup>P<sub>i</sub>-Strahlung wurde mittels eines „microplate scintillation“-Zählers (Microbeta, Wallac) gemessen.

Alle Assays wurden mit einem BeckmanCoulter/Sagin Roboter-System durchgeführt.

## **2.9. Allgemein verwendete Analysen- und Meßmethoden**

### **2.9.1. Chromatographische Methoden**

#### **2.9.1.1. Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Fertigplatten mit Kieselgel 60, F<sub>254</sub> (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck durchgeführt. Als Fließmittel wurde zumeist ein Gemisch aus Hexan – Ethylacetat oder Dichlormethan – Methanol genutzt, je nach Polarität der Substanzen wurden verschiedene Mischungsverhältnisse verwendet.

Die Auswertung der Platten erfolgte im UV-Licht bei 254 nm durch Fluoreszenzlöschung oder bei 366 nm durch Eigenfluoreszenz. Anschließend wurde die Platte mit Anisaldehydsprühreagenz (DAB 10) besprüht und auf ca. 110 °C erhitzt.

#### **2.9.1.2. Säulenchromatographie (SC)**

#### **Vakuumflüssigchromatographie (VLC)**

Bei der VLC wurden die Rohextrakte auf eine stationären Phase (Kieselgel 60, Korngröße 0.2 – 0.5 µm, Merck) aufgezogen und anschließend unter Vakuum mit einem Lösungsmittelgradienten steigender Polarität zur primären Auftrennung eluiert.

Hierfür wurden folgende Lösungsmittel in verschiedenen Mischungsverhältnissen verwendet:

<b>Lösungsmittel (%)</b> <b>Fraktion</b>	<b>Hexan</b>	<b>Ethylacetat</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>Methanol</b>
1	100	0	0	0
2	75	25	0	0
3	50	50	0	0
4	25	75	0	0
5	0	0	100	0
6	0	0	75	25
7	0	0	50	50
8	0	0	25	75
9	0	0	0	100

### **Normalphasenchromatographie an Kieselgel**

Hierbei wurde die Glassäule mit Kieselgel (Kieselgel 60, Korngröße 0.2-0.5 mm, Merck) als stationäre Phase gefüllt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Hexan:Ethylacetat (85:15 bis 95:5) oder Dichlormethan:Methanol (85:15 bis 95:5) angewendet, wobei hydrophobe Substanzen die Säule schneller verließen als hydrophile. Am Ablauf konnten dann die einzelnen Fraktionen, im Idealfall getrennten Substanzen, mit dem Fraktionssammler aufgefangen werden.

### **Gelpermeationschromatographie (GPC)**

Die GPC trennt Substanzen aufgrund ihrer Molekülgröße sowie durch Adsorptionseffekte. Moleküle kleinerer Größe verweilten hierbei länger in der Säule als größere. Hierfür wurde Sephadex LH-20 (Sigma) verwendet und als Fließmittel dienten 100 % Methanol bzw. Gemische aus Methanol und Dichlormethan (90:10).

#### **2.9.1.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography)**

##### **Analytische HPLC**

Mit Hilfe der HPLC-DAD wurde im Rahmen dieser Arbeit analytisch gearbeitet. Die Zusammensetzung der Rohextrakte bzw. der daraus hervorgehenden Fraktionen, die Reinheit

der isolierten Substanzen, sowie die Identität der bekannten Substanzen durch Vergleich mit der internen UV-Spektrenbibliothek wurden hiermit festgestellt.

Bei der analytischen Trennung wurde ein Proben-Volumen von 20 µl injiziert (Konzentration ca. 1 mg / ml). Die Flußrate durch die in einem Säulenofen mit 20 °C konstant temperierte Säule betrug 1 ml/min. Detektiert wurde mit einem UV Detektor des Photodioden-Array-Typs bei 210 nm, 235 nm, 254 nm und 366 nm. Dieser Detektor zeichnet das UV-Spektrum jeder bei einer der angegebenen Wellenlängen detektierten Substanz online auf.

Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Methanol (Elutionsmittel 1) und NANOPur-Wasser pH 2.0 (Elutionsmittel 2, eingestellt mit *ortho*-Phosphorsäure 85% p.a.). Die zu vermessenden Proben waren in 100% Methanol gelöst.

<b>Standardgradient für die analytische HPLC-Anlage</b>		
<b>Zeit [min]</b>	<b>Elutionsmittel 1 [%]</b>	<b>Elutionsmittel 2 [%]</b>
0	10	90
5	10	90
35	100	0
45	100	0
46	10	90
60	10	90

<b>Analytische HPLC-DAD-Anlage</b>	
Pumpe	P 580, Dionex
Steuerung	Chromleon V6.3
Probengeber	ASI-100, Injektionsvolumen 20 µl, Dionex
Säulenofen	STH 585, Dionex
Säule	Eurospheer 100-C18, Knauer
Detektor	UVD 340 S, Dionex

## HPLC-MS

Durch die Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer wurden die Molekulargewichte von Substanzen als Einzelkomponente einer Probe sowie auch als Bestandteilen von Substanzgemischen festgestellt. Als Ionisierungsmethode diente das ESI-Verfahren, das nicht nur über Bestimmung des Molekulargewichtes von Substanzen, sondern auch durch weitere Fragmentierung über das MS/MS-Verfahren zur Strukturaufklärung beitrug.

Die zu vermessenden Proben waren jeweils in 100 % Methanol gelöst. Als Fließmittel dienten Acetonitril (Elutionsmittel 1) und NANOPur-Wasser (Zusatz von 0.1 % Ameisensäure, Elutionsmittel 2) mit einer Flussrate von 0.3 ml/min. Gemessen wurde standardmäßig sowohl im positiven wie auch im negativen Probenmodus.

Des Weiteren konnten Reinsubstanzen über Direkteinlass auch direkt, d.h. ohne vorherige Trennung über die HPLC-Säule, in die MS appliziert werden.

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

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

<b>HPLC-MS-Messbedingungen</b>	
<b><i>Electro Spray Ionisation (ESI)</i></b>	
Sprayspannung	5.0 kV
Kapillarspannung	-15.4 V
Kapillartemperatur	350 °C
Flussrate	3.0 µl/min
<b><i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)</i></b>	
Sprayspannung	4.2 kV
Vaporizer-Temperatur	450.5 °C
Kapillarspannung	19.2 V
Kapillartemperatur	227 °C
Flussrate	4.0 µl/min

### **Semipräparative HPLC**

Die semipräparative HPLC wurde für die Aufreinigung von Reinsubstanzen eingesetzt, sowie auch für die Auftrennung von weniger komplexen Fraktionen, deren Menge weniger als 40 mg umfasst.

Die Probe wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser gelöst. Pro Injektion wurde maximal 1 – 1.5 mg Substanz, in einem Volumen nicht größer als 200 µl, eingespritzt. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch von Methanol bzw. Acetonitril und NANOpur-Wasser (teilweise unter Zusatz von 0.1 % TFA) benutzt, wobei die Flussrate 5 ml/min betrug. Die Elutionsgradienten wurden den jeweiligen Proben angepasst.

Mittels eines UV-Detektors konnte festgestellt werden, wann eine Substanz die Säule verlassen hatte. Die entsprechende Substanz wurde dann manuell in einem geeigneten Gefäß gesammelt.

<b>Semipräparative HPLC-Anlage</b>	
Pumpe	LaChrom L-7100, Merck/ Hitachi
Detektor	LaChrom L-7400, Merck/ Hitachi
Schreiber	Chromato-Integrator D-2000, Merck/ Hitachi
Säule	Eurospher 100-C18, Knauer
Vorsäule	Eurospher 100-C18, Knauer

## **2.9.2. UV-Vis-Spektroskopie**

Mit Hilfe des DAD-Detektors der analytischen HPLC-Anlage (siehe 2.9.1.3.) wurden UV-Spektren der untersuchten Verbindungen gemessen. Der Detektor des Photodioden-Array-Typs detektiert in einem Messgang den kurzwelligen Bereich von 210-380 nm als UV-Spektroskopie (Ultraviolett) und den sichtbaren Bereich von 380-595 nm als VIS-Spektroskopie (Visible). Die online aufgezeichneten Spektren der detektierten Substanzen wurden dann mit einer internen Spektrenbibliothek sowie Literaturwerten verglichen.

## **2.9.3. Massenspektrometrie (MS)**

Die Massenspektrometrie ist eine schnell durchführbare Methode, die ein wichtiges Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung durch der Bestimmung der relativen Molekülmasse einer Substanz und ihrer Fragmentierungsmuster darstellt.

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

Bei dieser Ionisierungsmethode wird die Probenlösung (in Methanol) bei Atmosphärendruck über eine Potentialdifferenz von 2-5 kV durch eine Kapillare in den stufenweise evakuierten Einlaß des Massenspektrometers gesprüht. Die Tröpfchen werden elektrostatisch aufgeladen und wiederholt geteilt. Die entstehenden Pseudomolekülonen werden entsprechend ihrer Größe und Ladung im Analysatorteil detektiert.

Die Messung von ESI-Massenspektren wurde an einer HPLC-MS-Anlage des Typs Finnigan LCQ<sup>DecaXP</sup> der Firma Thermoquest (siehe 2.9.1.3.) durchgeführt.

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

Bei der Elektronenstoß-MS wird die Probe im gasförmigen Zustand in ein Hochvakuum überführt, wo die Moleküle mit einem Elektronenstrahl (10-100 eV) beschossen werden. Dabei wird die Substanz ionisiert und fragmentiert. Diese Fragmente können dann durch kontinuierliches Verändern der Feldstärke aufgrund ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt und detektiert werden.

Die Messung der EI-Spektren erfolgte am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf durch Herr Dr. Helmut Keck und Herr Dr. Peter Tommes mit einem Gerät des Typs Finnigan MAT 8200.

### **Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)**

Mittels Hochauflösender Massenspektrometrie kann die Elementarzusammensetzung einzelner Fragmente bestimmt werden, da dabei die Massen auf bis zu vier Dezimalstellen genau ermittelt werden.

Die Aufnahme der Massenspektren und die Bestimmung der Feinmassen wurde von Herrn Dr. Manfred Nimtze an der Abteilung Molekulare Strukturforchung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig vorgenommen.

### **2.9.4. Kernresonanzspektroskopie (NMR - Nuclear Magnetic Resonance)**

Die Kernresonanzspektroskopie ist für die Strukturaufklärung von organischen Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Durch Vergleich der gemessenen chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ), der Kopplungskonstanten ( $J$ ) und der Integrale der Peakflächen von Protonen wie auch C-Atomen von Molekülen mit Literaturdaten können die Strukturen bekannter Verbindungen sowie auch neuer Naturstoffe aufgeklärt werden.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an den Spektrometern DRX-500 (500 MHz bzw. 125 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Neben der eindimensionalen NMR-Experimente ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT) wurden auch zweidimensionale (COSY, HMQC, HMBC) NMR-Experimente am Institut für Anorganische Chemie der HHU Düsseldorf durch Dr. Wilfried Peters durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GBF in Braunschweig durch Dr. Victor Wray an Spektrometern des Typs AM-300, ARX-400 sowie DMX-600 der Firma Bruker.

Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der  $\delta$ -Skala (in ppm) angegeben. Zur Eichung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard [z.B.  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ;  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$ ,  $\delta$ -Aceton- $d_6 = 2.05$ ] und bei den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignale der verwendeten Lösungsmittel [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.0$ ;  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.15$ ,  $\delta$  (Aceton- $d_6$ ) = 29.8].

Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit der WIN-NMR-Software (Bruker). Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgte in Hertz (Hz). In der Schreibweise  ${}^nJ_{X,Y}$  gibt n die Anzahl der an der entsprechenden Kopplung X-Y beteiligten Bindungen wieder.

### 2.9.5. Optische Drehung

Chirale Moleküle besitzen die Eigenschaft, die Ebene des linear polarisierten Lichtes zu drehen. Mittels optischer Drehwerte können Rückschlüsse auf die absolute Konfiguration von Verbindungen gezogen werden, wenn entsprechende Literaturangaben für identische bzw. strukturell eng verwandte Verbindungen vorliegen.

Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter 241 MC der Fa. Perkin-Elmer. Gemessen wurde  $[\alpha]_D^{20}$  bei der Natrium-D-Linie von 589 nm in einer auf 20 °C temperierten Küvette bei einer Schichtdicke von 10 cm. Zur Bestimmung der Drehwerte wurden Proben in einem geeigneten Lösungsmittel (UV-grade) gelöst. Die Angabe der Konzentration der Substanz (c) erfolgte in g/100 ml und der ermittelten Drehwerte in °.

Als Vergleichsstandard diente (+)-Rutin (c, 0.5 in Ethanol) mit einem Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = +9.4^\circ$ .

## 2.10. Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien

### 2.10.1. Geräte

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

**2.10.2. Chemikalien**

<b>Fließmittel für HPLC und LC-MS</b>	
Acetonitril	LiChroSolv HPLC grade, Merck
Methanol	LiChroSolv HPLC grade, Merck
<b>Lösungsmittel für NMR</b>	
CDCl <sub>3</sub>	euriso-top
CH <sub>3</sub> OD	euriso-top
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	euriso-top
<b>Bestandteile der Nährmedien</b>	
Agar-Agar	Galke
Chloramphenicol	Sigma
Glucose	Caelo
Hefeextrakt	Sigma
Malzextrakt	Merck
Meersalz	Biomarine
Natriumchlorid	Merck
Pepton	BD
Trypton	Sigma

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

### 3. Ergebnisse

Dieses Forschungsprojekt beschäftigte sich mit einer aktuellen Fragestellung der Wirkstoffforschung und hatte zum Ziel, eine bisher nur unvollständig erschlossene Quelle neuer biologisch aktiver Substanzen, die endophytischen Pilze, näher zu untersuchen.

Bei der Suche nach neuen, möglichst biologisch aktiven Naturstoffen aus endophytischen Pilzen wurden die biologisch sowie chemisch analytisch aussichtsreich erscheinenden Extrakte zur weiteren Untersuchung ausgewählt, so dass Extrakte aus insgesamt neun Pilzstämmen bearbeitet wurden. Diese stammten sowohl aus terrestrischen Habitaten (Pflanzen und Moosen) als auch aus chinesischen Mangrovenpflanzen (siehe 2.1.4.). Durch Fraktionierung und anschließende Isolierungsschritte wurden insgesamt 33 Verbindungen identifiziert und charakterisiert, von denen drei neue Sekundärstoffe darstellen. Die isolierten Reinsubstanzen wurden, soweit ausreichende Mengen vorhanden waren, auf ihre pharmakologischen Eigenschaften mittels Tests mit der Zelllinie L-5178Y (Lymphomzellen der Maus) sowie als Inhibitoren verschiedener Proteinkinasen untersucht.

Die hier erreichten Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert.

#### 3.2. Inhaltsstoffe aus *Pleurophoma cava* (SL-5)

Der Pilz *Pleurophoma cava* Stamm SL-5 wurde auf 300 ml Wickerham-Flüssigmedium ca. vier Wochen bei Raumtemperatur kultiviert. Der gewonnene EtOAc-Extrakt (232.8 mg) wurde mittels HPLC-DAD analysiert, wobei die Anwesenheit einer einzelnen Hauptkomponente festgestellt wurde. Diese ließ sich nach zwei säulenchromatographischen Trennungen über Kieselgel isolieren und als Aposphaerin A identifizieren.

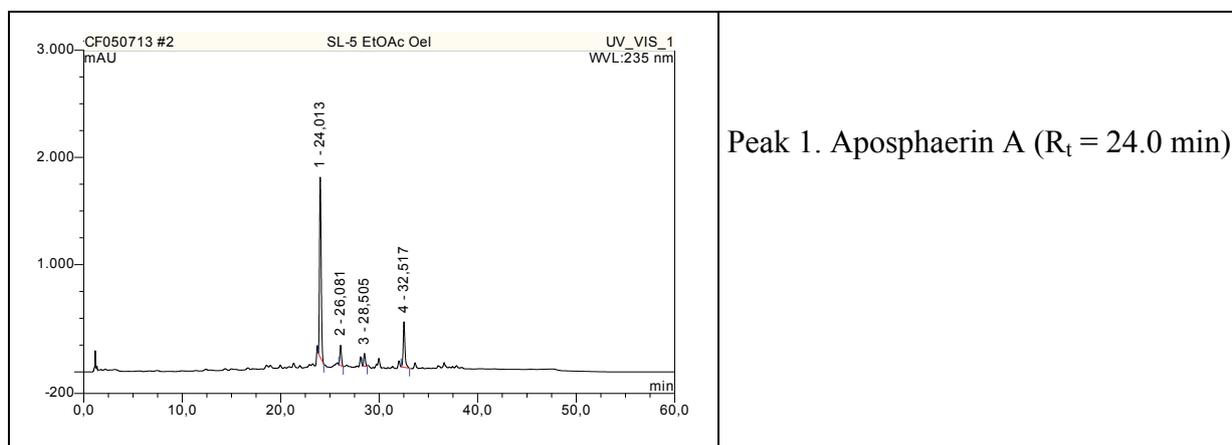
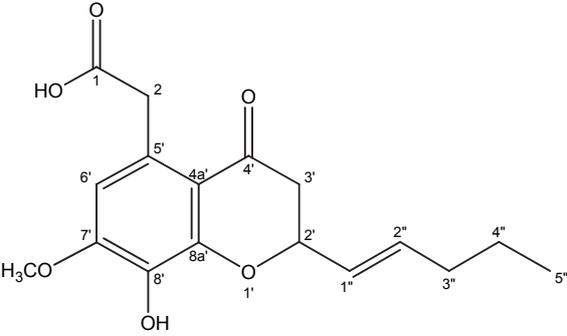
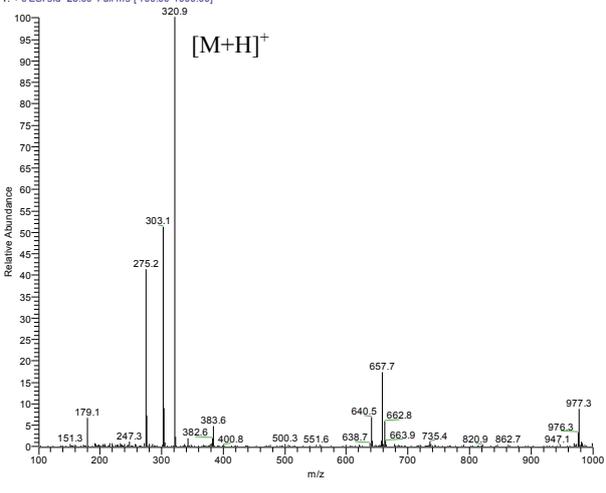
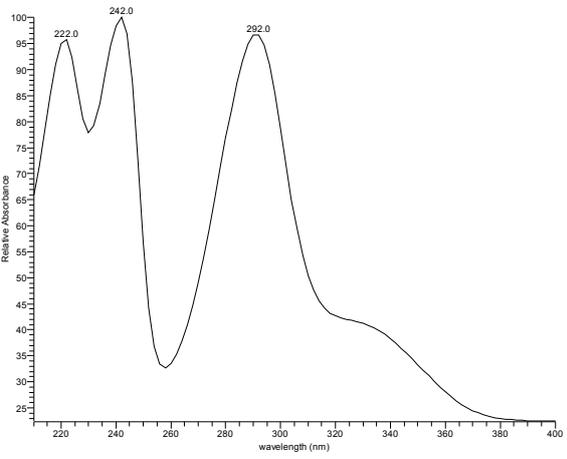
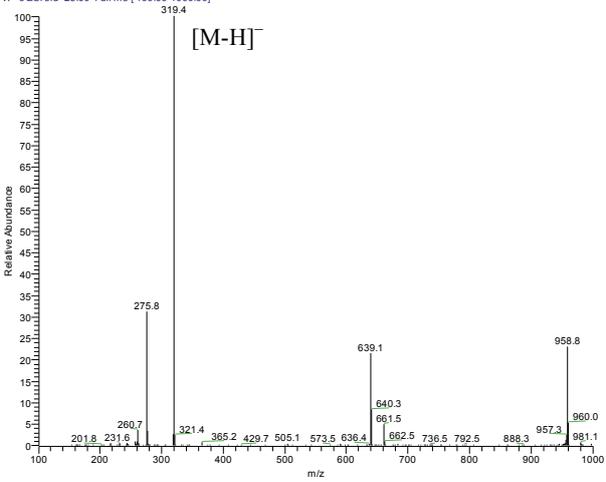


Abb. 16. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Pleurophoma cava*

## 3.1.1. Aposphaerin A

<b>AOPSPHAERIN A</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	(8-Hydroxy-7-methoxy-4-oxo-2-pent-1-enyl-chroman-5-yl)-essigsäure
<b>Probencode:</b>	SL-5EB-C1.82
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Pleurophoma cava</i> (aus <i>Iris pseudacorus</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	46.6 mg
<b>Beschreibung:</b>	farbloses Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	320 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	24.0 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>SL-5EB C2-7.5 #678 RT: 19.97 AV: 1 NL: 1.40E8 T: + c ESI: sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>SL-5EB C2-7.5 #2959 RT: 19.97 AV: 1 NL: 4.53E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>SL-5EB C2-7.5 #676 RT: 19.91 AV: 1 NL: 9.82E6 T: - c ESI: sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 

Aposphaerin A wurde aus dem EtOAc-Extrakt von *Pleurophoma cava* Stamm SL-5 als farbloses Pulver (46.6 mg) isoliert. Die Struktur des Moleküls konnte neben der Bestimmung des Molekulargewichtes von 320 g/mol durch ESI-MS mit Hilfe von NMR-Daten festgelegt werden.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte elf verschiedene Signale: drei Singulets von einem aromatischen Proton (6.58 ppm), einer Methoxygruppe (3.81 ppm) und einer Methylengruppe (3.78 ppm), ein tieffeldverschobenes Multiplett von einem Methinproton (4.89 ppm), benachbart zu einem Multispin-System von einer ungesättigten Alkylseitenkette (5.66, 5.85, 2.00, 1.37, 0.86 ppm) und einer Methylengruppe (2.55, 2.71 ppm) (s. Tab. 6). Im COSY-Spektrum (s. Abb. 18) liessen sich zwei Spinsysteme ableiten, zum einen die Seitenkette  $\text{H}_3\text{-5}''$  bis  $\text{H-1}''$ , die weiterhin über  $\text{H-2}'$  mit  $\text{H}_2\text{-3}'$  verbunden war, sowie  $\text{H}_2\text{-2}$ , das eine *peri*-Kopplung zu  $\text{H-6}'$  aufwies. Im HMBC-Spektrum (s. Abb. 19) konnte letzteres durch entsprechende Korrelationen von  $\text{H}_2\text{-2}$  zu C-1, C-4'a, C-5' und C-6' sowie von  $\text{H-6}'$  zu C-8' zu einer oxigenierten Phenyllessigsäure-Partialstruktur erweitert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich hier um ein Chroman-4-on-derivat handelt, was unter anderem durch eine Korrelation von  $\text{H}_2\text{-3}'$  zu C-5' im HMBC-Spektrum bestätigt wurde.

Mit Hilfe des Molekulargewichts und den formulierten Strukturelementen konnte über eine Substruktur-Suche in der Datenbank „Antibase“ die Verbindung als der bereits bekannte Pilzinhaltsstoff Aposphaerin A identifiziert werden. Anschließend wurden die NMR-Daten mit den Literaturdaten (Krohn *et al.*, 1996) verglichen. Obwohl die in DMSO gemessenen NMR-Daten von den in der Literatur angegebenen leicht abwichen (siehe Tab. 6), da hier MeOH als Lösungsmittel verwendet wurde, konnte die Struktur eindeutig als Aposphaerin A identifiziert werden.

Da in der Originalliteratur weder die absolute Konfiguration sowie die optische Drehung für Aposphaerin A ermittelt wurden, zum anderen die Struktur der Verbindung keinen Ansatz zur Bestimmung der absoluten Konfiguration mittels chemischer Derivatisierung erfolgsverprechend erscheinen ließ, wurde auf die Bestimmung des Drehwerts verzichtet.

Tabelle 6. NMR-Daten von Aposphaerin A

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (MeOD, 100 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	-	-	176.3	172.7	-	2
2	3.92, d (16.7) 3.98, d (16.7)	3.79, s	42.3	40.4	6'	6', 4a', 8a', 1, 4'
2 <sub>ax</sub> '	4.89, m	4.90, m	79.7	77.5	1'', 3 <sub>a</sub> ', 3 <sub>e</sub> '	1'', 2'', 4'
3 <sub>eq</sub> '	2.72, dd (16.7, 4.0)	2.59, dd (16.4, 3.5)	45.2	42.5	2 <sub>a</sub> '	2', 1'', 5', 4'
3 <sub>ax</sub> '	2.79, dd (16.7, 10.5)	2.71, dd (16.7, 10.3)				
4'	-	-	195.0	191.9	-	3', 2', 6', 2
4a'	-	-	115.6	113.9	-	6', 2
5'	-	-	130.3	128.3	-	3', 6', 2
6'	6.60, s	6.59, s	110.8	109.7	2	2, 4a', 5', 8', 7', 6
7'	-	-	153.8	151.8	-	6'
7'-OCH <sub>3</sub>	3.96, s	3.82, s	57.0	56.1	-	7'
8'	-	-	135.2	133.4	-	6'
8a'	-	-	152.6	148.9	-	-
1''	5.77, tdd (15.5, 6.4, 1.2)	5.67, dd (15.6, 6.2)	129.3	127.8	2 <sub>a</sub> '	3'', 3', 2'
2''	5.94, dtd (15.5, 7.1, 0.7)	5.86, m	136.5	134.1	3''	4'', 3'', 2', 1''
3''	2.12, dt	2.02, m	35.7	33.7	2'', 4''	5'', 4'', 1'', 2''
4''	1.48, m	1.38, m	23.4	21.5	3'', 5''	3'', 2'', 5''
5''	0.96, t (7.4)	0.87, t (7.2)	14.2	13.4	4''	4'', 3''
1-OH	11.90, s <sup>a</sup>	11.79, s	-	-	-	-
8'-OH	8.58, s <sup>a</sup>	8.57, s	-	-	-	-

<sup>1</sup> Krohn *et al.*, 1996<sup>a</sup> in DMSO- $d_6$

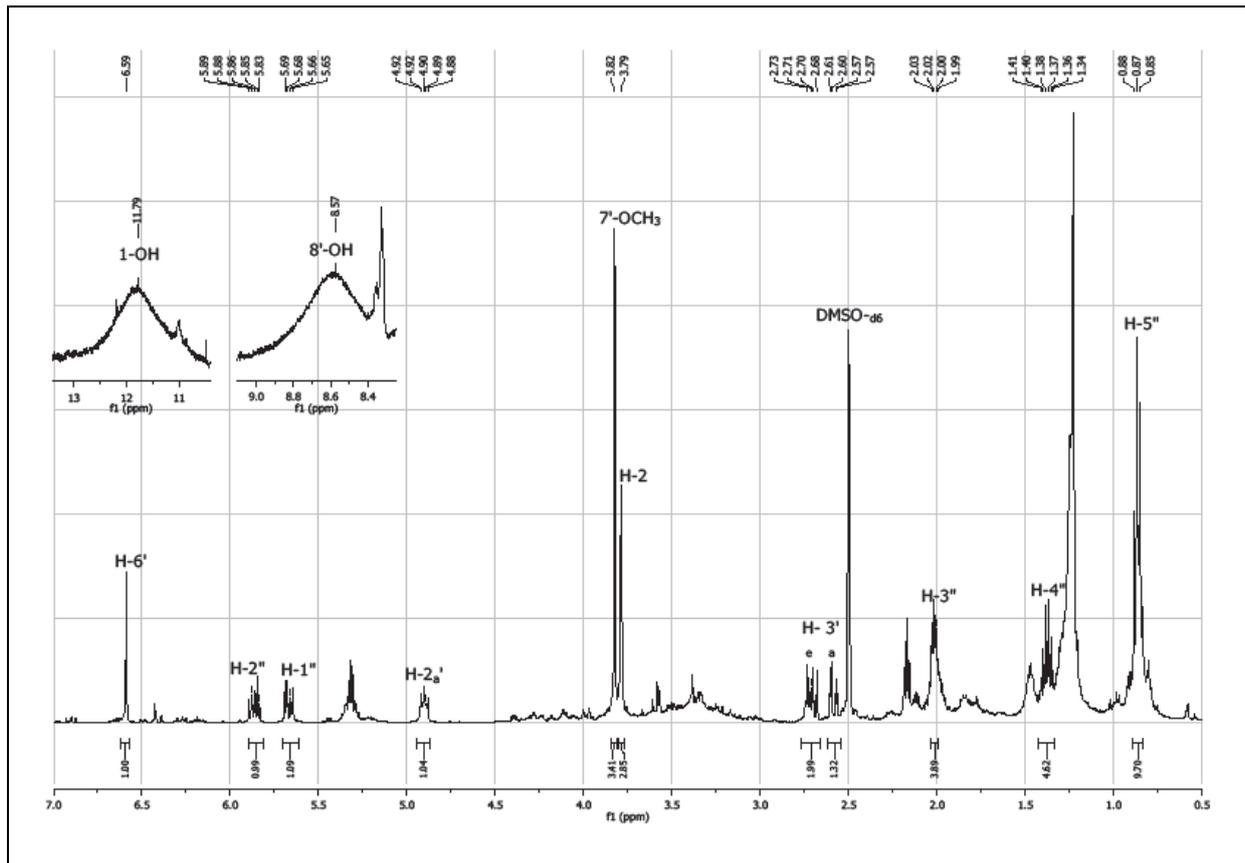


Abb. 17.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Aposphaerin A, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

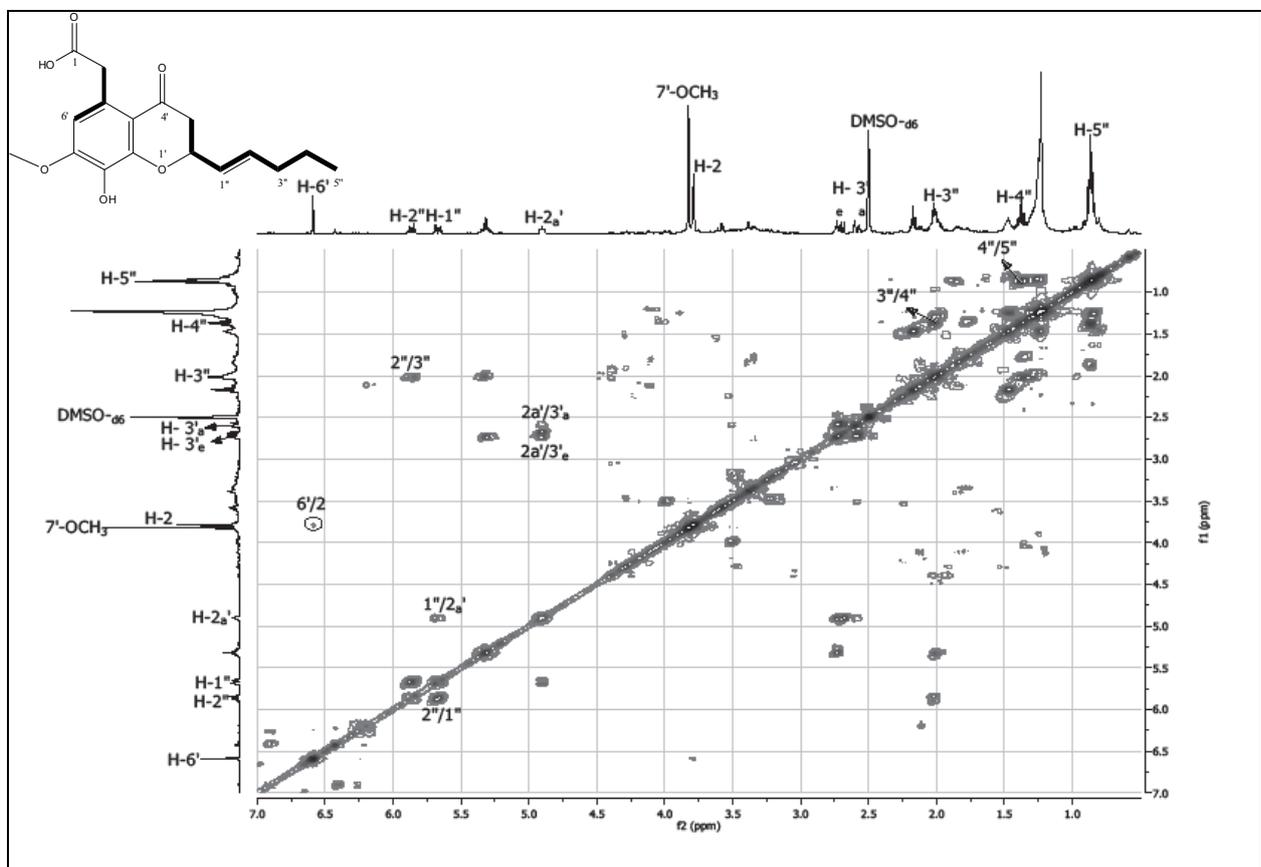


Abb. 18. COSY-Spektrum von Aposphaerin A, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

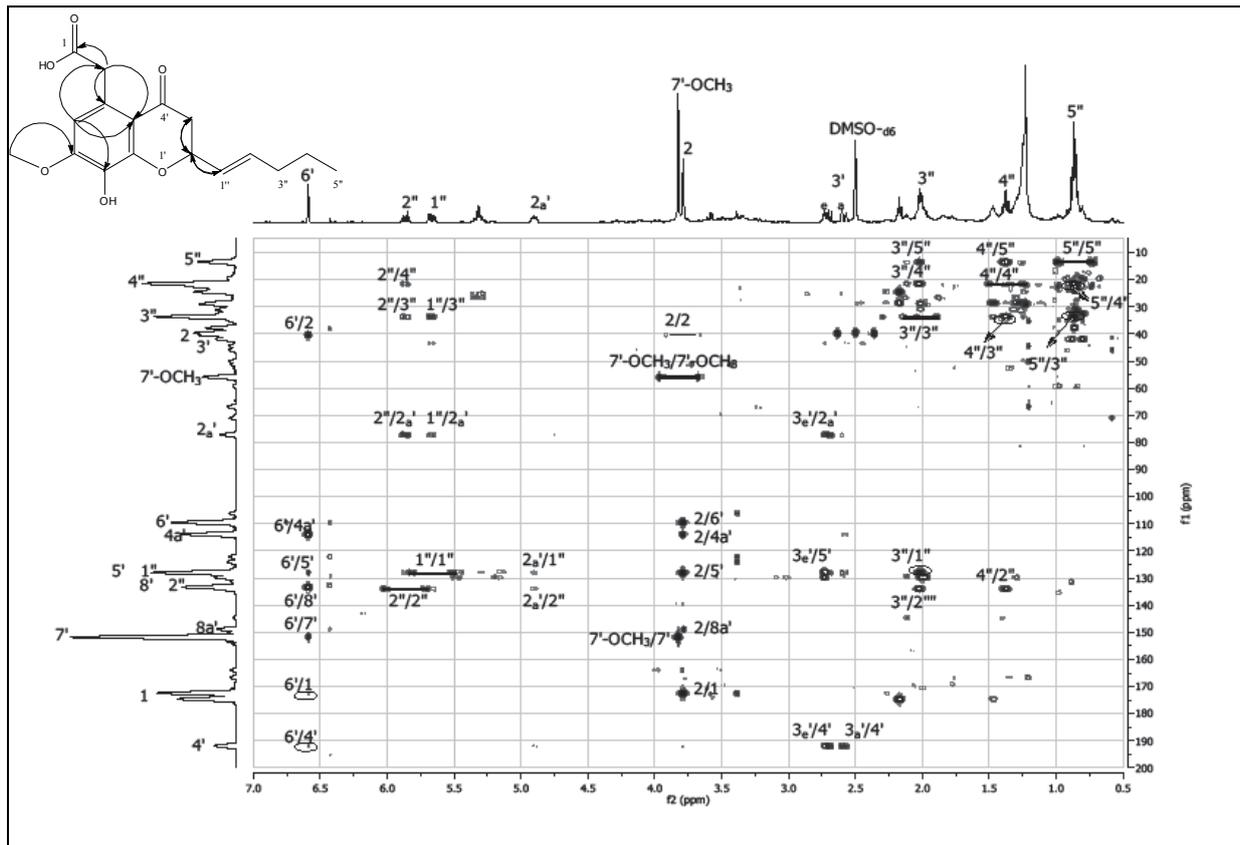
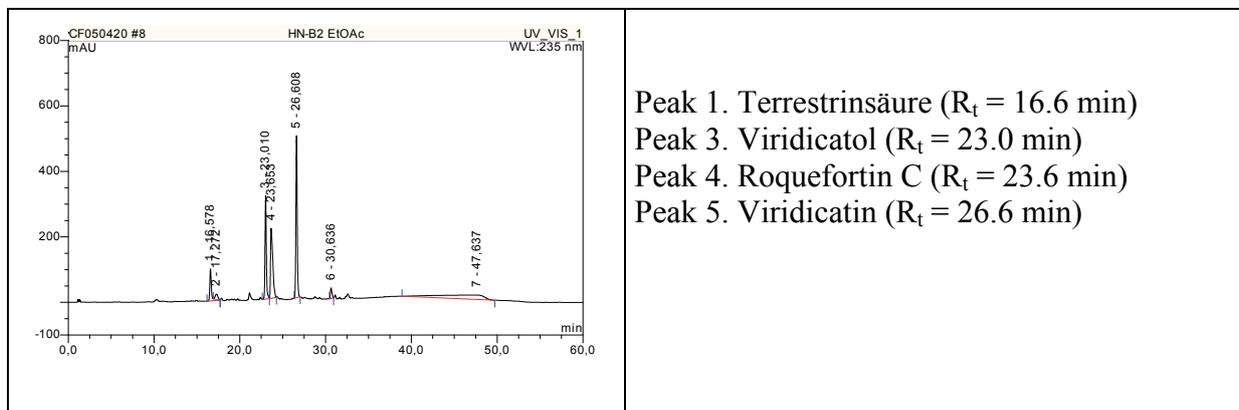


Abb. 19. HMBC-Spektrum von Aposphaerin A, gemessen in DMSO-*d*<sub>6</sub> (500 MHz)

### 3.2. Inhaltsstoffe aus *Penicillium chrysogenum* (HN-B2)

Der Pilz *Penicillium chrysogenum* (Stamm HN-B2) wurde aus Blättern der Haselnuss (*Corylus avellana*), die auf dem Campus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gesammelt wurden, isoliert. Aus dem Ethylacetat-Extrakt (46.4 mg) wurden mittels semi-präparativer HPLC vier Verbindungen isoliert. Die Verbindungen Terrestrinsäure, Viridicatul, Roquefortin C und Viridicatin konnten mittels spektroskopischer Methoden identifiziert werden. Es handelt sich um bekannte Mykotoxine, die aus verschiedenen *Penicillium*-Arten bereits beschrieben wurden (Cunningham und Freeman, 1953; Birkinshaw *et al.*, 1963; Ciegler und Hou, 1970; Jacobsen *et al.*, 1978).



**Abb. 20. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Penicillium chrysogenum***

## 3.2.1. Terrestrinsäure

<b>TERRESTRINSÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	(R,E)-3-((S)-5-Ethyl-dihydrofuran-2(3H)-yliden)-5-methylfuran-2,4(3H,5H)-dion
<b>Probencode:</b>	HN-B2E-P2
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> (aus <i>Corylus avellana</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	10.0 mg
<b>Beschreibung:</b>	farblose Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	210 g/mol
<b>Drehwert</b> [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> :	+ 58.6° (c, 0.10 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	17.1 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>HN-B2E-P2 #445 RT: 11.99 AV: 1 NL: 5.48E7 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>HN-B2E-P2 #1751 RT: 11.92 AV: 1 NL: 2.46E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>HN-B2E-P2 #439 RT: 11.85 AV: 1 NL: 2.19E7 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 

Terrestrinsäure wurde als farblose Kristalle (10 mg) aus dem Ethylacetat-Extrakt von *Penicillium chrysogenum* (Stamm HN-B2) gewonnen. Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Maxima bei 234 und 274 nm. Im ESI-MS wurde der Pseudomolekülionenpeak bei positiver Ionisierung bei  $m/z$  211  $[M+H]^+$  detektiert, so dass sich das Molekulargewicht auf 210 g/mol festlegen ließ. Interessanterweise wurde bei negativer Ionisierung ein Pseudomolekülionenpeak bei  $m/z$  227 detektiert, der formal  $[M+OH]^-$  entspricht und auf die Ringöffnung des sterisch gespannten Lactons unter Wasseranlagerung und Abstraktion eines Protons zurückzuführen sein dürfte.

Das in deuteriertem Chloroform aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte insgesamt zehn Signale im aliphatischen Bereich, zwei davon im Hochfeldbereich für zwei Methylgruppen  $\text{H}_3\text{-6}$  (1.46 ppm) und  $\text{H}_3\text{-7}'$  (1.06 ppm). Weiterhin erschienen sechs Protonen dreier diastereotopen Methylengruppen ( $\text{H}_2\text{-3}'$ ,  $\text{H}_2\text{-4}'$  und  $\text{H}_2\text{-6}'$ ) sowie zwei weitere Protonen  $\text{H-5}$  und  $\text{H-5}'$ , die durch ihre Nähe zu Sauerstoffsubstituenten eine Tieffeldverschiebung von 4.61 und 4.92 ppm aufwiesen (s. Tab. 7).

Das COSY-Spektrum (s. Abb. 22) zeigte durch entsprechende Kreuzsignale, dass die beiden Methylgruppen zu zwei verschiedenen Spin-Systemen gehörten ( $\text{H-5}/\text{H}_3\text{-6}$  bzw.  $\text{H}_3\text{-7}'/\text{H}_2\text{-6}'$ ,  $\text{H-5}'$ ,  $\text{H}_2\text{-4}'/\text{H}_2\text{-3}'$ ). Dies wurde durch entsprechende Korrelationen im HMBC-Spektrum bestätigt. Die weiterhin im HMBC-Spektrum beobachtete Korrelation zwischen  $\text{H-5}'$  (4.92 ppm) und  $\text{C-2}'$  (186.2 ppm) belegte zudem die Anwesenheit einer Vinylether-Substruktur, während die Korrelationen zwischen  $\text{H-5}$  (4.61 ppm) und  $\text{H-6}$  (1.46 ppm) mit  $\text{C-4}$  (197.7 ppm) auf die Anwesenheit der  $\beta$ -Keto- $\gamma$ -Lacton-Partialstruktur hindeuteten.

Die Struktur der Verbindung konnte durch Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten mit aus der Literatur (Birkinshaw und Raistrick, 1936; Jacobsen *et al.*, 1978; Nukina, 1988) entnommenen Daten als Terrestrinsäure bestätigt werden. Der Wert für die optische Drehung betrug  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 58.6^\circ$  (c, 0.10 in MeOH) und ist damit mit dem in der Literatur (Nukina, 1988) angegebenen Wert von  $+ 34^\circ$  (c, 0.80 in MeOH) vergleichbar, wodurch geschlossen werden kann, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierte Verbindung diesselbe absolute Konfiguration aufweist. Weiterhin ließ der Vergleich der  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten mit den Werten aus der Literatur (s. Tab. 8) die Schlussfolgerung zu, dass es sich hier um einen *E-Z*-Isomerengemisch handelte. Untersuchungen über die Isomerisierung der Furyliden-Doppelbindung der Tetrone Säuren zeigten, dass die  $^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebung der beiden Lactoncarbonylgruppe ( $\text{C-2}$  und  $\text{C-4}$ ) bei dem (*Z*)-Isomer etwa 3 ppm tieffeldverschoben ist als bei dem (*E*)-Isomer (Jacobsen *et al.*, 1977; Jacobsen *et al.*, 1978; Arai *et al.*, 1989). Dies

konnte durch die Korrelationen im HMBC-Spektrum von H<sub>3</sub>-6 zu (Z)-C-4 bei 200.56 ppm und (E)-C-4 197.74 festgestellt werden (siehe Abb. 24).

**Tabelle 7. <sup>1</sup>H-NMR-Daten, COSY- und HMBC-Korrelationen von Terrestrinsäure**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
5	4.59, q (7.0)	4.61, td (6.9, 13.9)	6	4, 5, 6
6	1.45, d (7.0)	1.46, d (7.0)	5	4, 5, 6
3'a	3.60, ddd (20.0, 9.6, 8.6)	3.59, m	3'b	-
3'b	3.29, ddd (20.0, 9.6, 4.3)	3.27, m	3'a	-
4'a	2.39, m	2.35, m	3'b	2', 4'
4'b	1.90, m	1.97, m	6'b, 7'	3'
5'	4.95, m	4.92, m	-	7'
6'a	1.95, m	2.05, m	-	4', 5', 7'
6'b	1.82, m	1.79, m	4'b, 7'	4', 7'
7'	1.08, t (7.5)	1.06, t (7.3)	4'b, 6'b	4', 5', 7'

<sup>1</sup>Nukina, 1988

**Tabelle 8. <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Terrestrinsäure**

Position	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) <sup>1</sup>		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 125 MHz) <sup>2</sup>	
	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>
2	166.94	170.33	-	-
3	94.28	94.77	-	-
4	198.82	195.13	200.56	197.74
5	79.26	79.03	80.92	80.27
6	17.03	17.03	16.87	16.87
2'	187.14	186.4	190.79	189.92
3'	33.63	33.86	30.77	30.77
4'	27.64	27.64	26.86	26.86
5'	93.03	92.50	95.25	94.60
6'	26.41	26.41	16.87	16.87
7'	9.46	9.46	9.49	9.49

<sup>1</sup>Jacobsen *et al.* 1978

<sup>2</sup>Werte aus dem HMBC-Spektrum entnommen

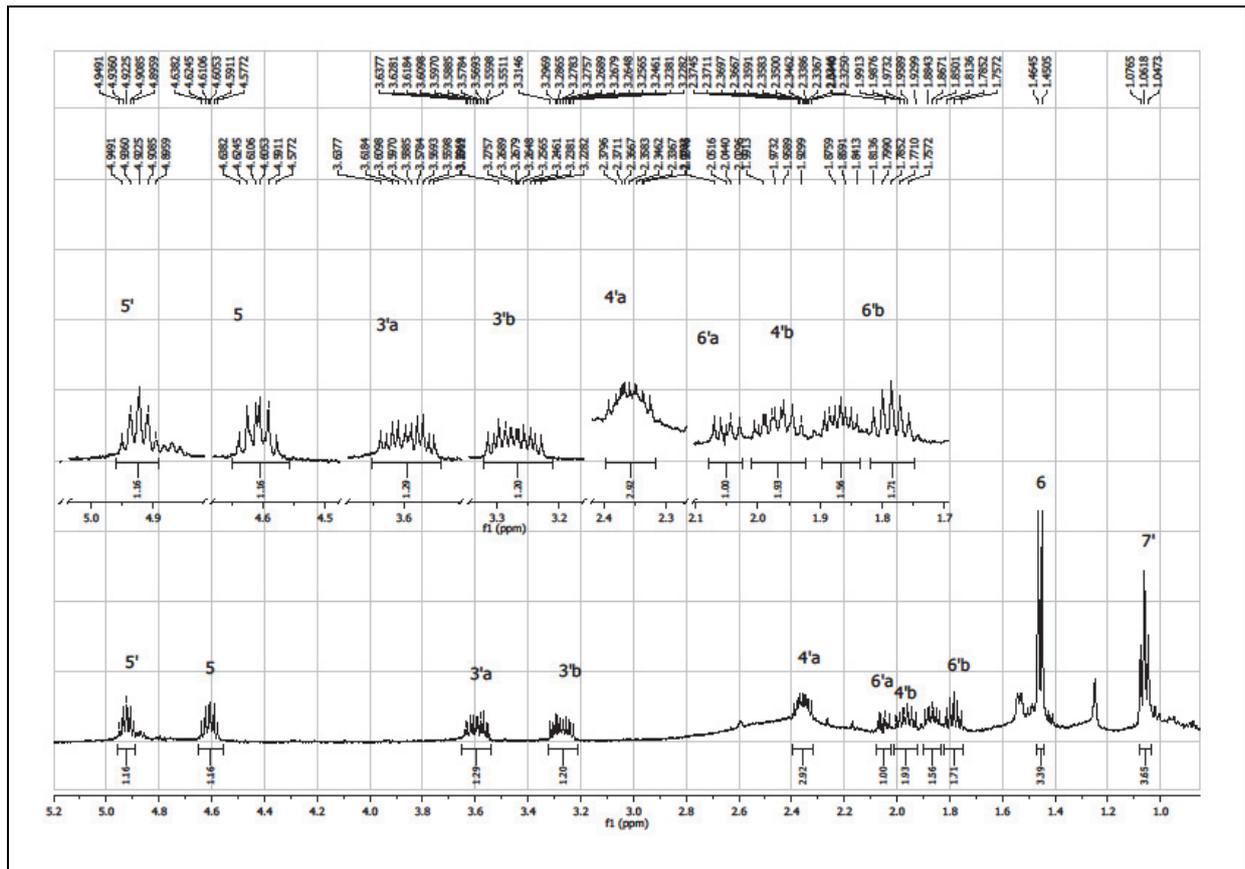


Abb. 21. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Terrestrinsäure, gemessen in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

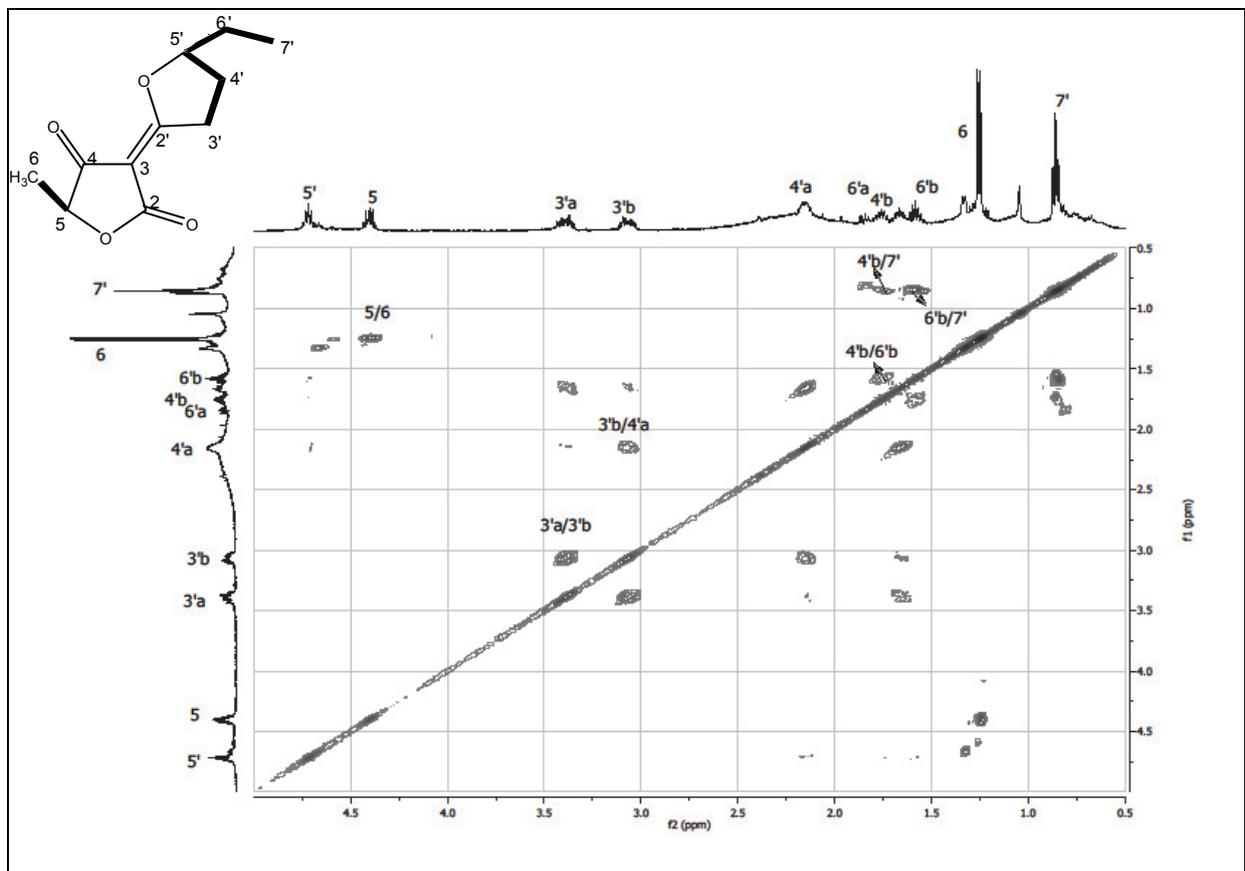


Abb. 22. COSY-Spektrum von Terrestrinsäure, gemessen in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

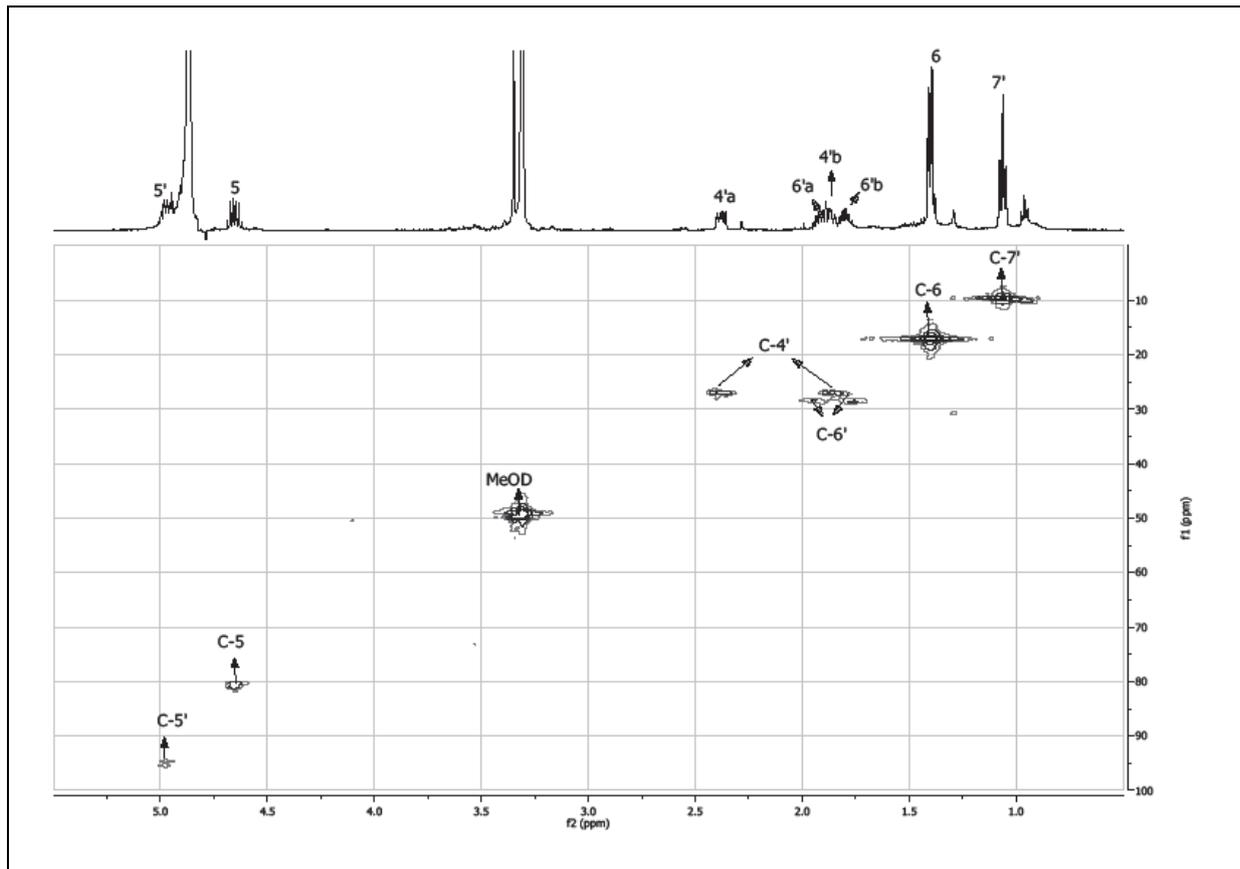


Abb. 23. HMBC-Spektrum von Terrestrinsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

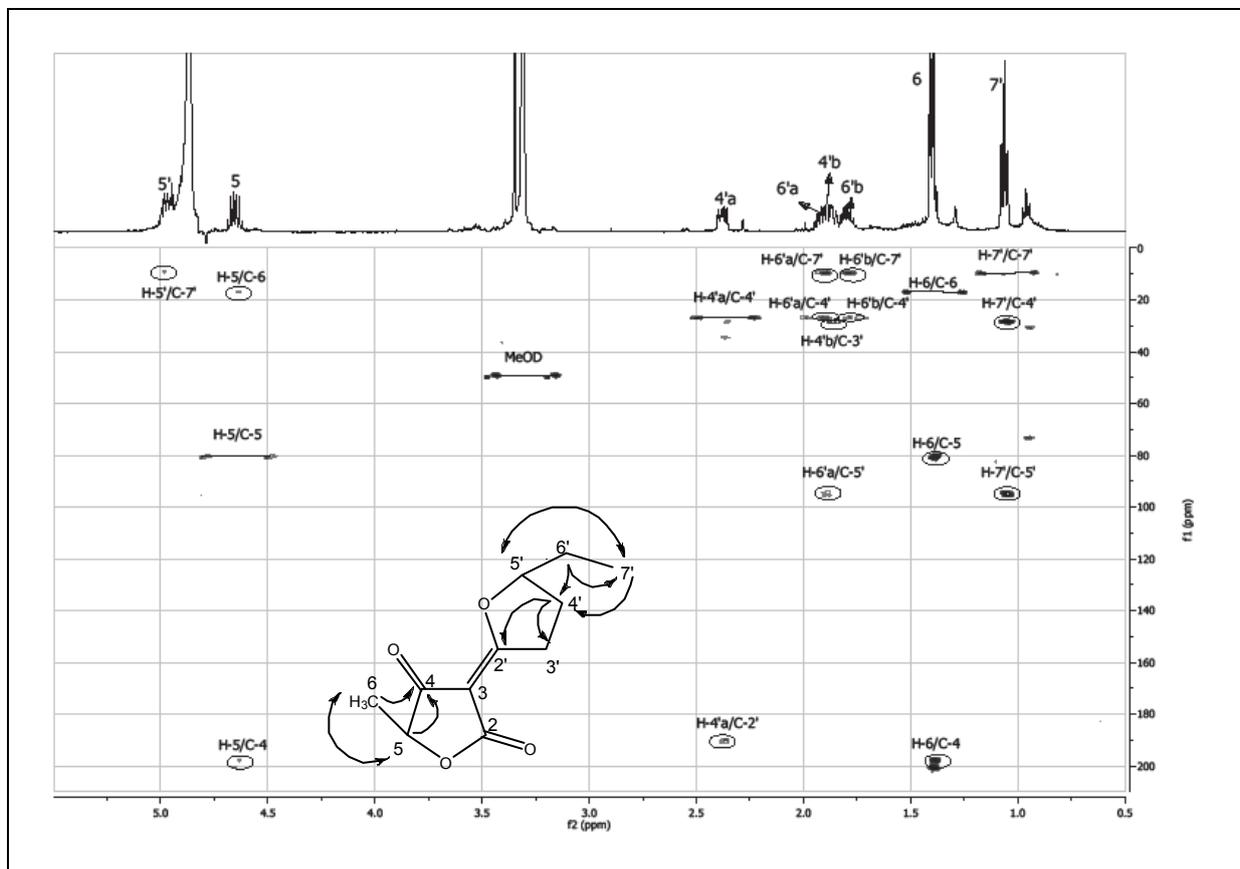


Abb. 24. HMBC-Spektrum von Terrestrinsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

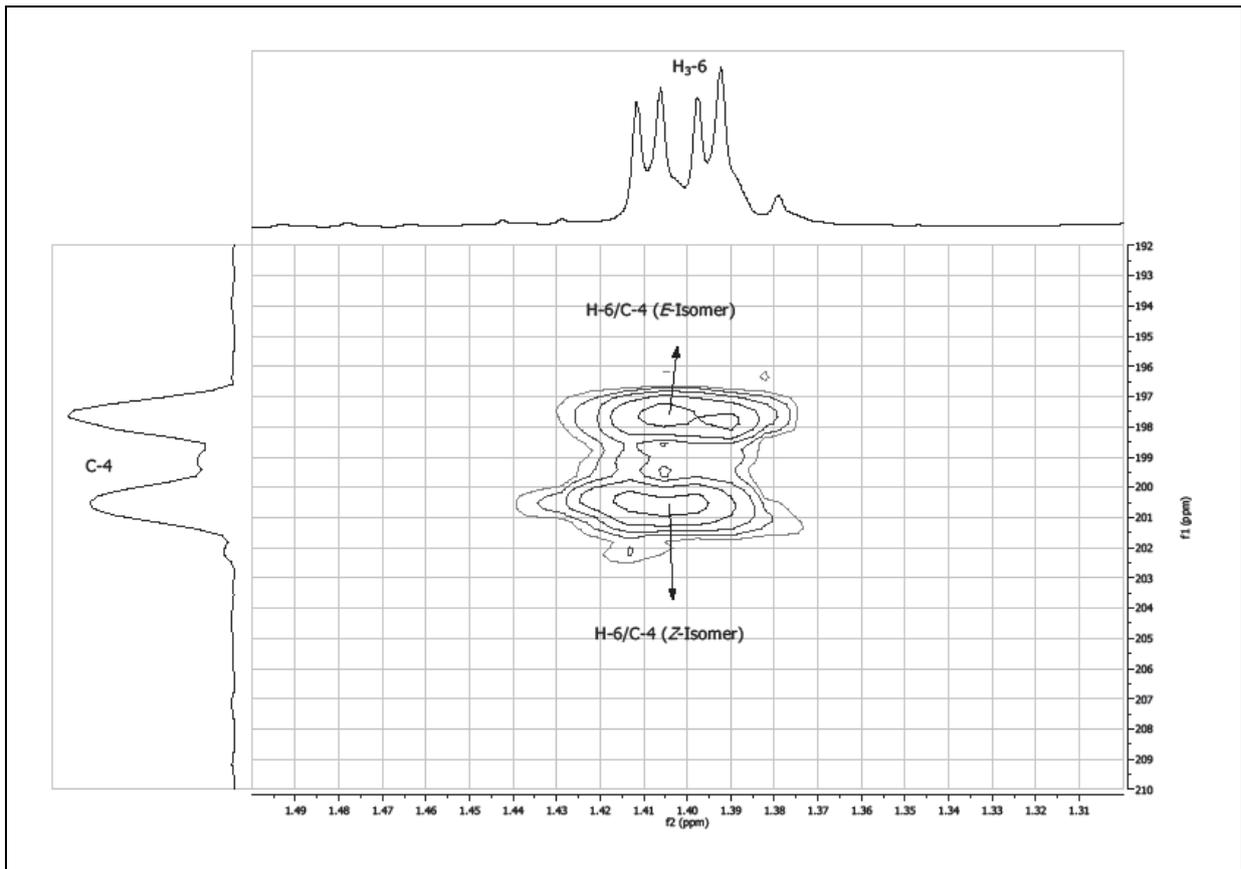
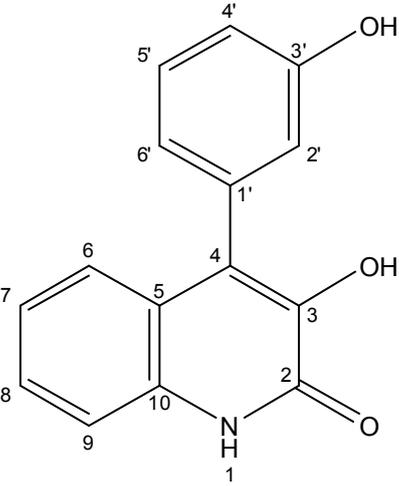
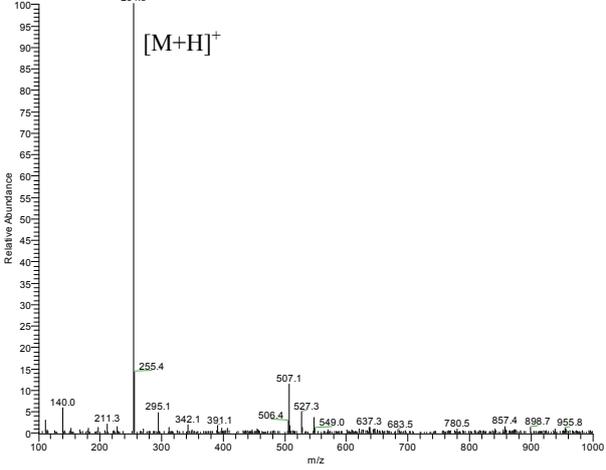
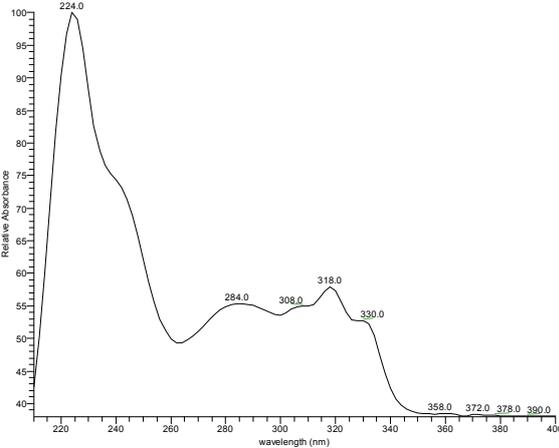
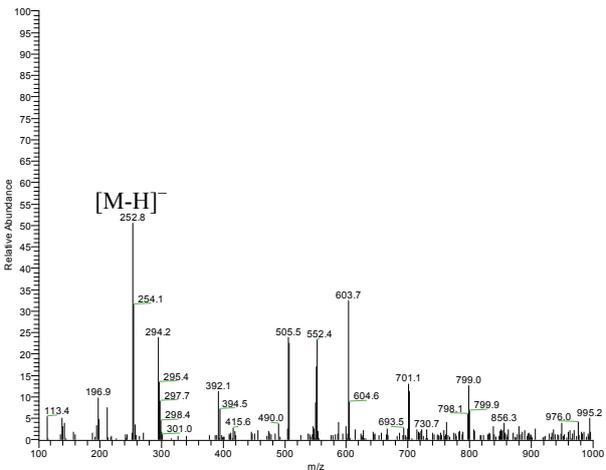


Abb. 25. Vergrößerung des HMBC-Spektrums von Terrestrinsäure, gemessen in MeOD  
(500 MHz)

## 3.2.2. Viridicatol

<b>VIRIDICATOL</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-Hydroxy-4-(3-hydroxy-phenyl)-1H-chinolin-2-on
<b>Probencode:</b>	HN-B2E-P3
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> (aus <i>Corylus avellana</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	8.4 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelblich-orange, kristallin
<b>Summenformel:</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	253 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	23.0 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> HN-B2 EIOAc #653 RT: 17.41 AV: 1 NL: 3.43E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b> HN-B2 EIOAc #2580 RT: 17.45 AV: 1 NL: 2.67E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> HN-B2 EIOAc #651 RT: 17.35 AV: 1 SB: 5 17.56, 17.03-17.50 NL: 5.04E5 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Viridicatol wurde aus dem EtOAc-Extrakt als gelbliche Kristalle (8.4 mg) isoliert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 224, 284, 308, 318 und 330 nm. Mithilfe der ESI-Massenspektrometrie konnte das Molekulargewicht der isolierten Substanz von 253 g/mol ermittelt werden. Das in DMSO- $d_6$  aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte insgesamt 11 Signale. Während der Singulett bei 12.20 ppm auf eine NH-Gruppe hindeutete, wurden die anderen zwei Protonen im tiefen Feld, die Singulett bei 9.53 und 9.13 ppm, als die phenolischen Hydroxylfunktionen 3'-OH und 3-OH identifiziert. Acht aromatische Protonen wurden trotz teilweiser Signalüberlappung identifiziert und mit Hilfe von Referenzspektren (Fremlin *et al.*, 2009) zugeordnet (s. Tab. 9). Hierbei handelte es sich um zwei ABCD-Spinsysteme, wobei H-6 bis H-9 zu einem Chinolinskelett gehörten und H-2', H-4' bis H-6' das Spinsystem des 1,3-disubstituierten Phenylringes bildeten. Diese Substanz wurde bereits anhand der ESI-Massenspektren und UV-Spektren durch Vergleich mit der authentischen Reinsubstanz (Teuscher, 2005) identifiziert, weshalb auf die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren verzichtet wurde. Die zusätzliche Übereinstimmung der NMR-spektroskopischen Daten mit aus der Literatur entnommenen Werten (Fremlin *et al.*, 2009) konnte die Identität dieser Substanz eindeutig als Viridicatol bestätigen.

Tabelle 9. NMR-Daten von Viridicatol

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in DMSO- $d_6$ , 600 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in DMSO- $d_6$ , 500 MHz)
1	12.19, s	12.20, s
3	9.13, s	9.13, s
6	7.31, m	7.32, m
7	7.08, ddd (8.1, 6.0, 1.9)	7.08, ddd (8.1, 6.3, 2.2)
8	7.11, m	7.11 m
9	7.33, m	7.34, m
2'	6.71, m	6.71, s
3'	9.51, s	9.53, s
4'	6.83, ddd (8.2, 2.3, 1.1)	6.83, d (7.4)
5'	7.30, t (7.6)	7.30, t (7.6)
6'	6.72, m	6.73, s

<sup>1</sup>Fremlin *et al.*, 2009

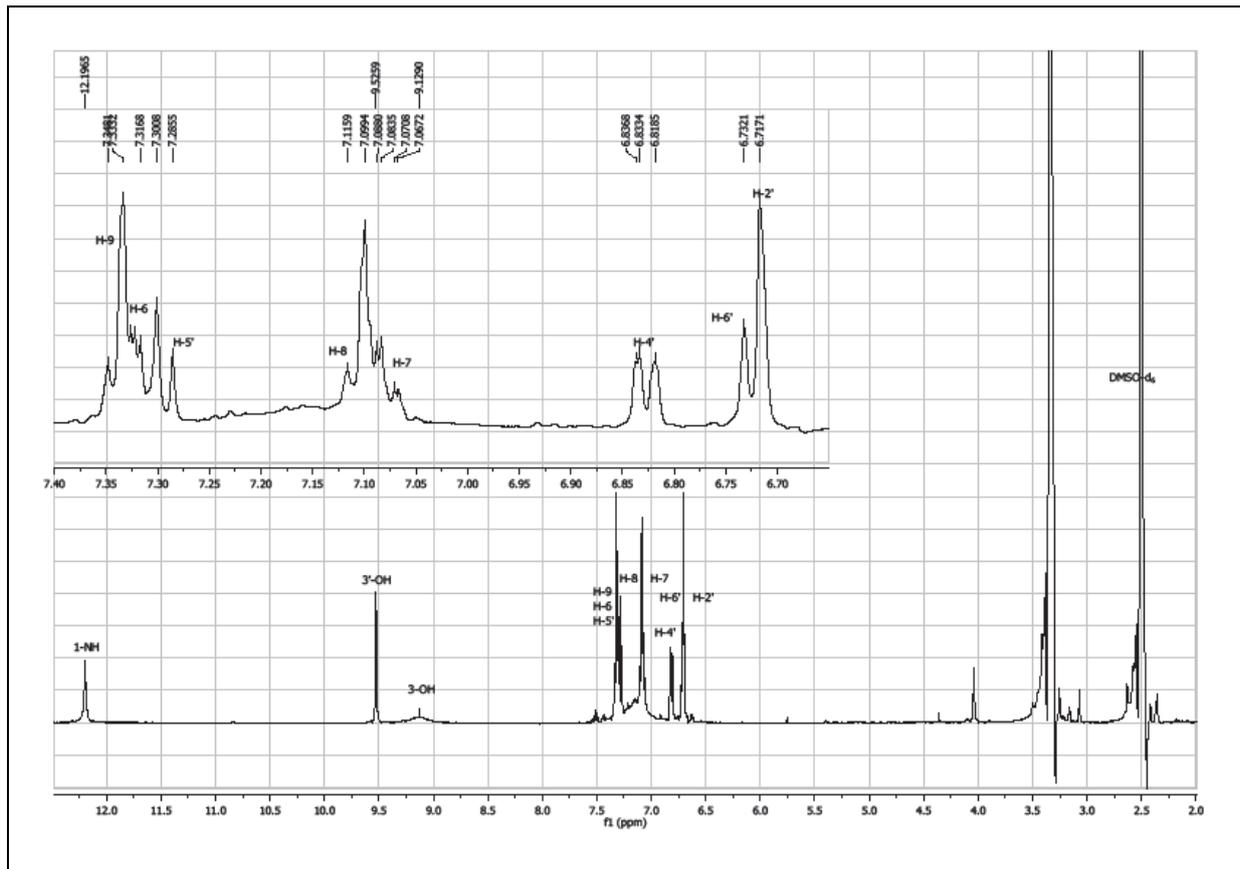
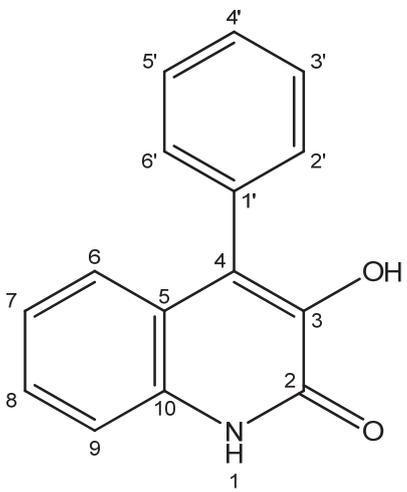
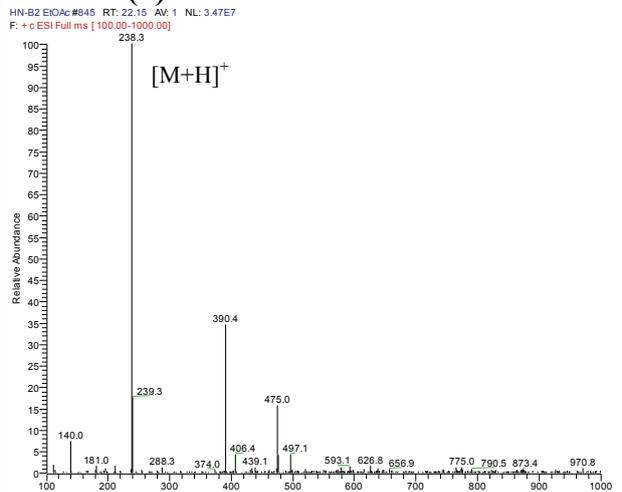
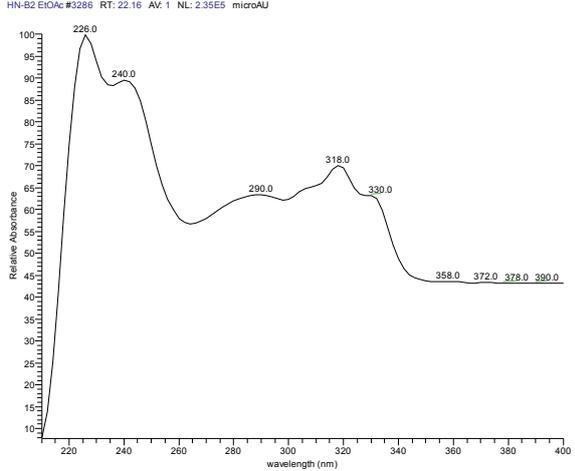
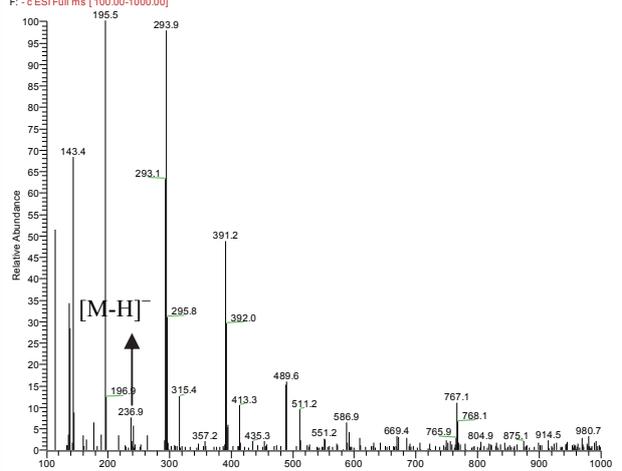


Abb. 26.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Viridicatinol, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

## 3.2.3. Viridicatin

<b>VIRIDICATIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-Hydroxy-4-phenyl-1H-chinolin-2-on
<b>Probencode:</b>	HN-B2E-P5
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> (aus <i>Corylus avellana</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	4.7 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	237 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	26.5 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> HN-B2 EIOAc #845 RT: 22.15 AV: 1 NL: 3.47E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b> HN-B2 EIOAc #3288 RT: 22.16 AV: 1 NL: 2.35E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> HN-B2 EIOAc #843 RT: 22.09 AV: 1 NL: 7.49E5 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 

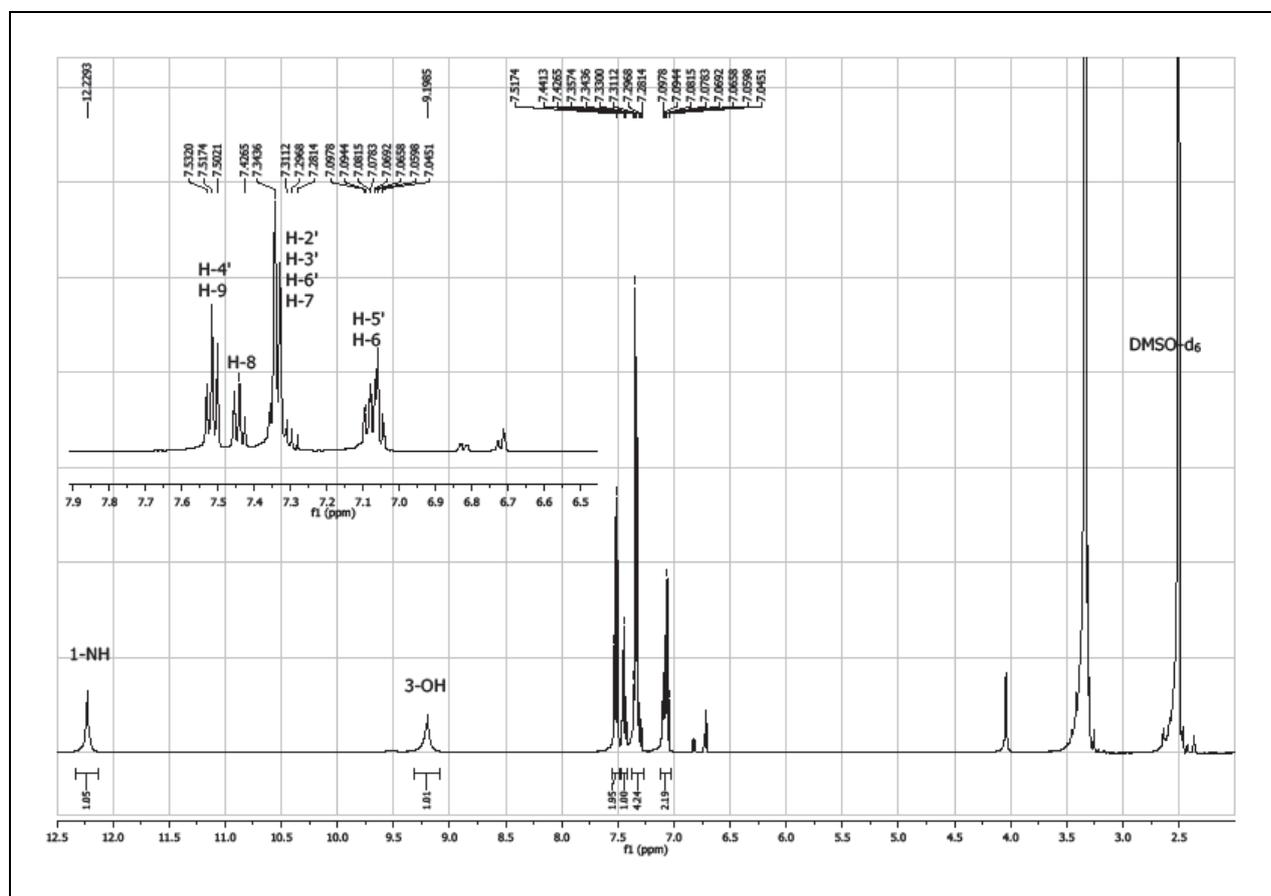
Die Verbindung Viridicatin wurde ebenso wie Viridicatol mittels semi-präparativer HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Penicillium chrysogenum* (Stamm HN-B2) isoliert. Anhand übereinstimmender ESI-Massenspektren, UV-Spektren sowie NMR-spectroskopischen Daten (Teuscher, 2005; Diesel, 2009) konnte die Identität der Verbindung mit Viridicatin bestimmt werden. Das UV-Spektrum der Substanz wies charakteristische Maxima bei 226, 240, 290, 318 und 330 nm auf. Mithilfe des ESI-MS-Spektrums ließ sich das Molekulargewicht auf 237 Da festlegen, da bei positiver Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  238  $[M+H]^+$  dominierte, wohingegen das entsprechende Spektrum bei negativer Ionisierung weniger aussagekräftig war und einen entsprechende Peak bei  $m/z$  237  $[M-H]^-$  nur erahnen liess.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte neun aromatische Protonen mit einer chemischen Verschiebung von 7.04 - 7.52 ppm, die sich auf zwei Spinsysteme verteilten, nämlich, wie im Falle des Viridicatols, ein ABCD-System für den Chinolinring sowie einen monosubstituierten Phenylring. Daneben wurden zwei Protonen im Tieffeld bei 9.20 und bei 12.23 ppm beobachtet, die einer OH-Gruppe bzw. einer NH-Gruppe zugeordnet wurden.

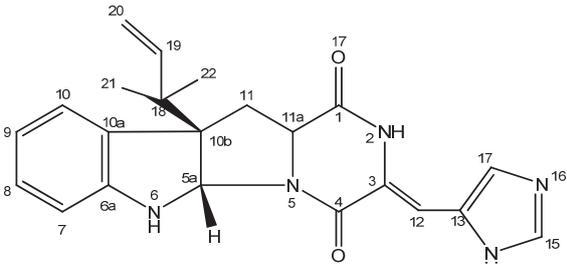
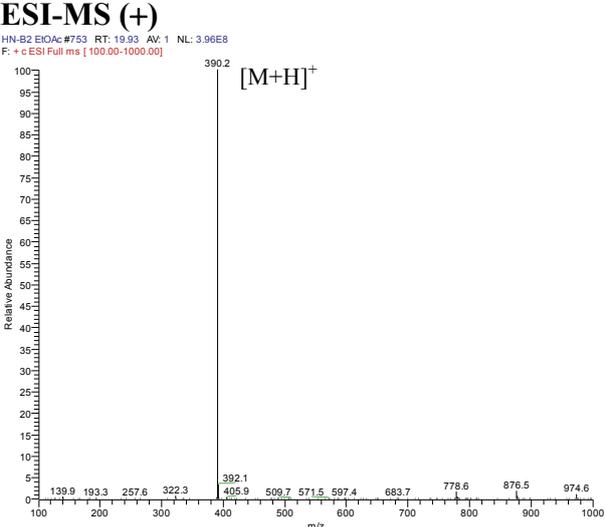
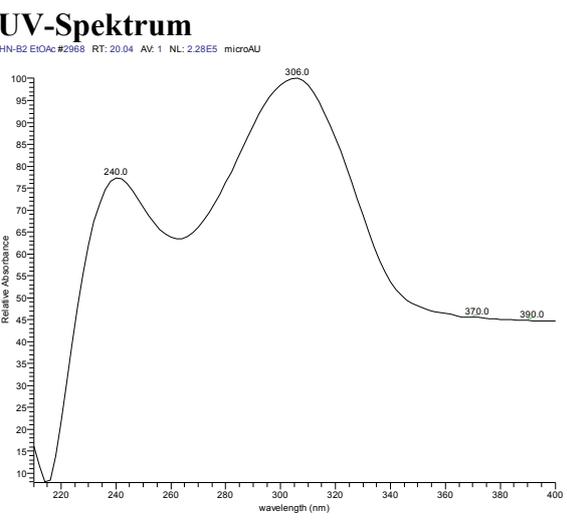
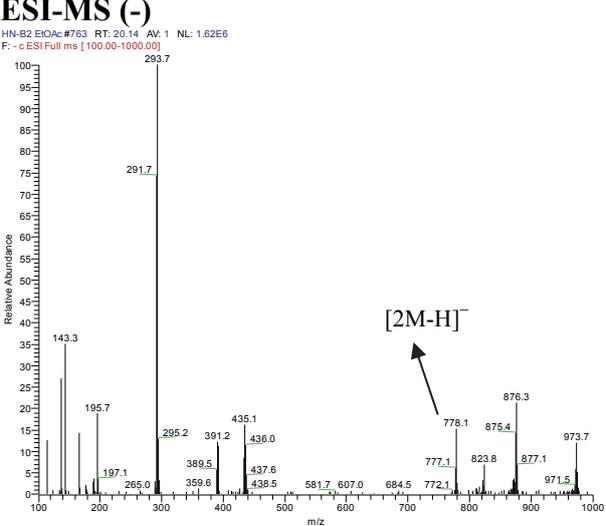
Auch hier wie bei Viridicatol bereiteten die Signalüberlappungen Schwierigkeiten hinsichtlich der Interpretation der Daten. Mit Hilfe von NMR-spectroskopischen Daten aus der Literatur (Diesel, 2009; Kobayashi und Harayama, 2009) konnten die Signale zugeordnet (Tab. 10) und die Identität der Verbindung als Viridicatin bestätigt werden. Da die Verbindung bereits durch vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis spektroskopisch eingehend charakterisiert worden war, wurde auf die Aufnahme von weiteren NMR-Spektren verzichtet.

Tabelle 10. NMR-Daten von Viridicatin

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz)
1	12.23, s	12.23, s
3	9.19, s	9.20, s
6	7.05 <sup>a</sup>	7.11-7.04, m <sup>a</sup>
7	7.32 <sup>b</sup>	7.36-7.28, m <sup>b</sup>
8	7.42, t (7.4)	7.44, t (7.4)
9	7.50 <sup>c</sup>	7.52, dd (7.6, 7.3) <sup>c</sup>
2'	7.32 <sup>b</sup>	7.36-7.28, m <sup>b</sup>
3'	7.32 <sup>b</sup>	7.36-7.28, m <sup>b</sup>
4'	7.50 <sup>c</sup>	7.52, dd (7.6, 7.3) <sup>c</sup>
5'	7.05 <sup>a</sup>	7.11-7.04, m <sup>a</sup>
6'	7.32 <sup>b</sup>	7.36-7.28, m <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Diesel, 2009<sup>a,b,c</sup> SignalüberlappungAbb. 27. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Viridicatin, gemessen in  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz)

## 3.2.4. Roquefortin C

<b>ROQUEFORTIN C</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	10b-(1,1-Dimethyl-allyl)-3-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-5aH-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-b]indol-1,4-dion
<b>Probencode:</b>	HN-B2E-P4
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> (aus <i>Corylus avellana</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	8.4 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	$C_{22}H_{23}N_5O_2$
<b>Molekulargewicht:</b>	389 g/mol
<b>Drehwert <math>[\alpha]_D^{20}</math>:</b>	$-385.6^\circ$ (c, 0.5 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	23.5 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> HN-B2 EIOAc #753 RT: 19.93 AV: 1 NL: 3.96E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b> HN-B2 EIOAc #2968 RT: 20.04 AV: 1 NL: 2.28E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> HN-B2 EIOAc #763 RT: 20.14 AV: 1 NL: 1.62E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Roquefortin C wurde aus dem Ethylacetat-Extrakt von *Penicillium chrysogenum* (Stamm HN-B2) mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Die gut in Chloroform löslichen, weißen Kristalle zeigten in ihrem UV-Spektrum Maxima bei 204, 240 und 306 nm, wobei die UV-Absorption bei 242 nm als typisch für ein Indol-Chromophor berichtet wird (Musuku *et al.*, 1994). Der Drehwert der Verbindung wurde als  $[\alpha]_D^{20} = -385.6^\circ$  (c, 0.5 in MeOH) bestimmt. Mittels ESI-MS unter positiver Ionisierung, das ein protoniertes Pseudomolekülion bei  $m/z$  390 aufwies, wurde das Molekulargewicht zu 389 g/mol bestimmt.

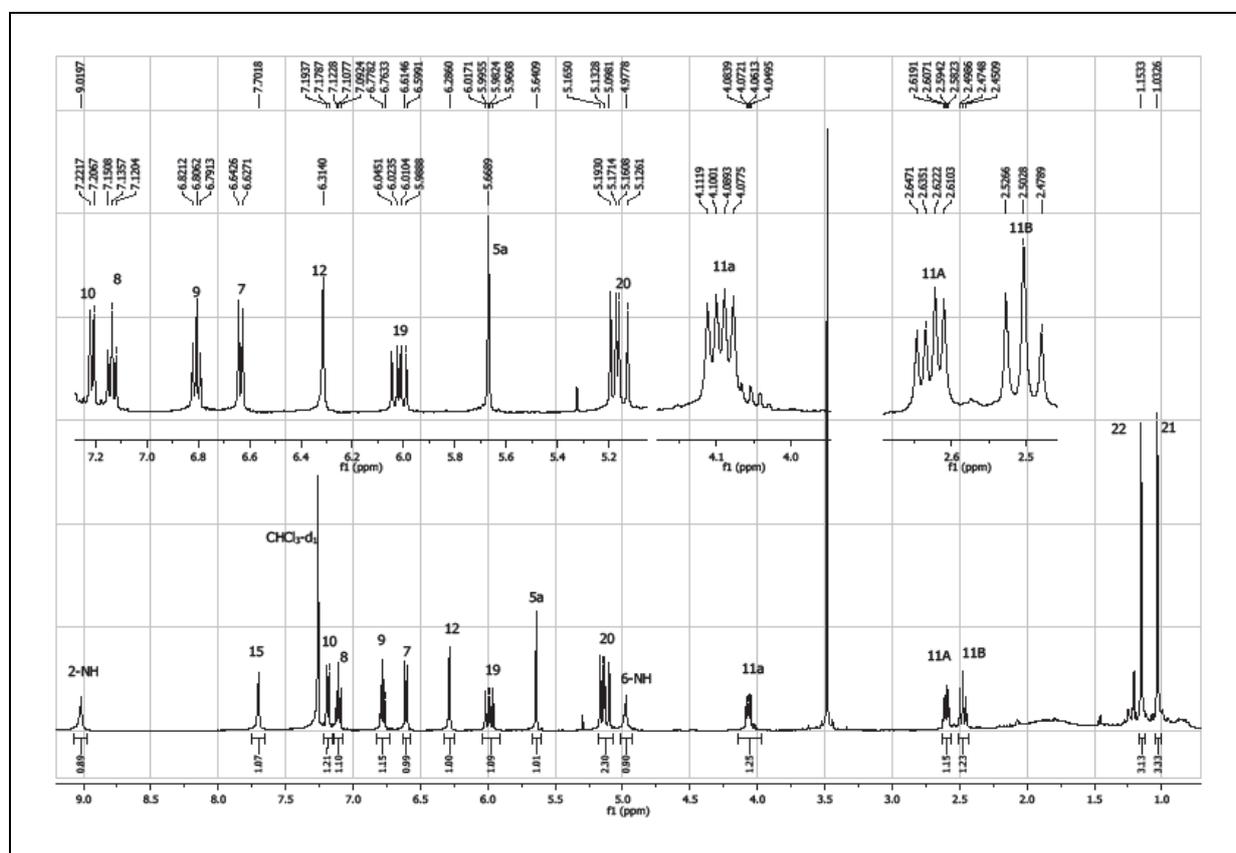
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Substanz setzte sich unter anderem aus einem Methinproton (5.64 ppm) und vier aromatischen Protonen des Indolkerns (6.61, 7.11, 6.78 und 7.19 ppm) sowie zwei breiten Singulets für zwei NH-Gruppen (4.98 und 9.02 ppm) zusammen (s. Tab. 11). Des Weiteren waren die vier Signale einer Dimethylallylfunktion - ein olefinisches Proton bei 5.99 ppm (H-19), eine Methylengruppe bei 5.13 ppm (H<sub>2</sub>-20) und zwei Methylgruppen bei 1.03 ppm (H<sub>3</sub>-21) und 1.15 ppm (H<sub>3</sub>-22) - zu erkennen. Schließlich konnten ein Singulett für H-5a bei 5.64 ppm sowie eines der beiden aromatischen Protonen des Imidazolringes bei 7.70 ppm (H-15) detektiert werden, wohingegen das zweite Signal für H-17 offensichtlich vom Lösungsmittelsignal (CDCl<sub>3</sub>, 7.26 ppm) verdeckt wurde. Der aus der Literatur entnommene Wert (Diesel, 2009) zeigte, das für H-17 in DMSO-*d*<sub>6</sub> eine chemische Verschiebung von 7.24 ppm beobachtet wurde.

Die im COSY-Spektrum (s. Abb. 29) beobachtete Korrelation zwischen H-11a und H<sub>2</sub>-11 zeigte die Zugehörigkeit des Methinprotons H-11a zu einer CH<sub>2</sub>-CH-CO-Gruppe. Auch das ABCD-Spinsystem des Indolkerns, sowie die Korrelation von H-19 zu H-20 ließen sich im COSY-Spektrum nachweisen.

Die Struktur der Verbindung konnte durch Vergleich der UV-, NMR-spektroskopischen Daten, sowie des Drehwertes mit aus der Literatur (Scott *et al.*, 1976; Musuku *et al.*, 1994; Diesel, 2009) entnommenen Daten als Roquefortin C bestätigt werden.

Tabelle 11. NMR-Daten von Roquefortin C

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	COSY (H→H)
5a	5.70, s	5.64, s	-
7	6.58-7.30	6.61, d (7.8)	-
8	6.58-7.30	7.11, t (7.6)	7, 9
9	6.58-7.30	6.78, t (7.5)	8, 10
10	6.58-7.30	7.19, d (7.5),	9
11A 11B	2.58, m	2.60, dd (12.4, 6.0) 2.47, t (11.9)	11a
11a	4.12, dd	4.07, dd (11.3, 5.9)	11A, 11B
12	6.40, s	6.29, s	-
15	7.73, s	7.70, s	-
17	6.58-7.30	- <sup>a</sup>	-
19	6.07, m	5.99, dd (17.3, 10.8),	20
20	5.04, dd 5.28, s	5.13, dd (19.4, 14.1)	19
21	1.06, s	1.03, s	-
22	1.17, s	1.15, s	-
2-NH	10.22, s	9.02, s	-
6-NH	5.10, s	4.98, s	-

<sup>1</sup>Scott *et al.*, 1976<sup>a</sup> Signal von  $\text{CDCl}_3$ -Peak verdecktAbb. 28.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Roquefortin C, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

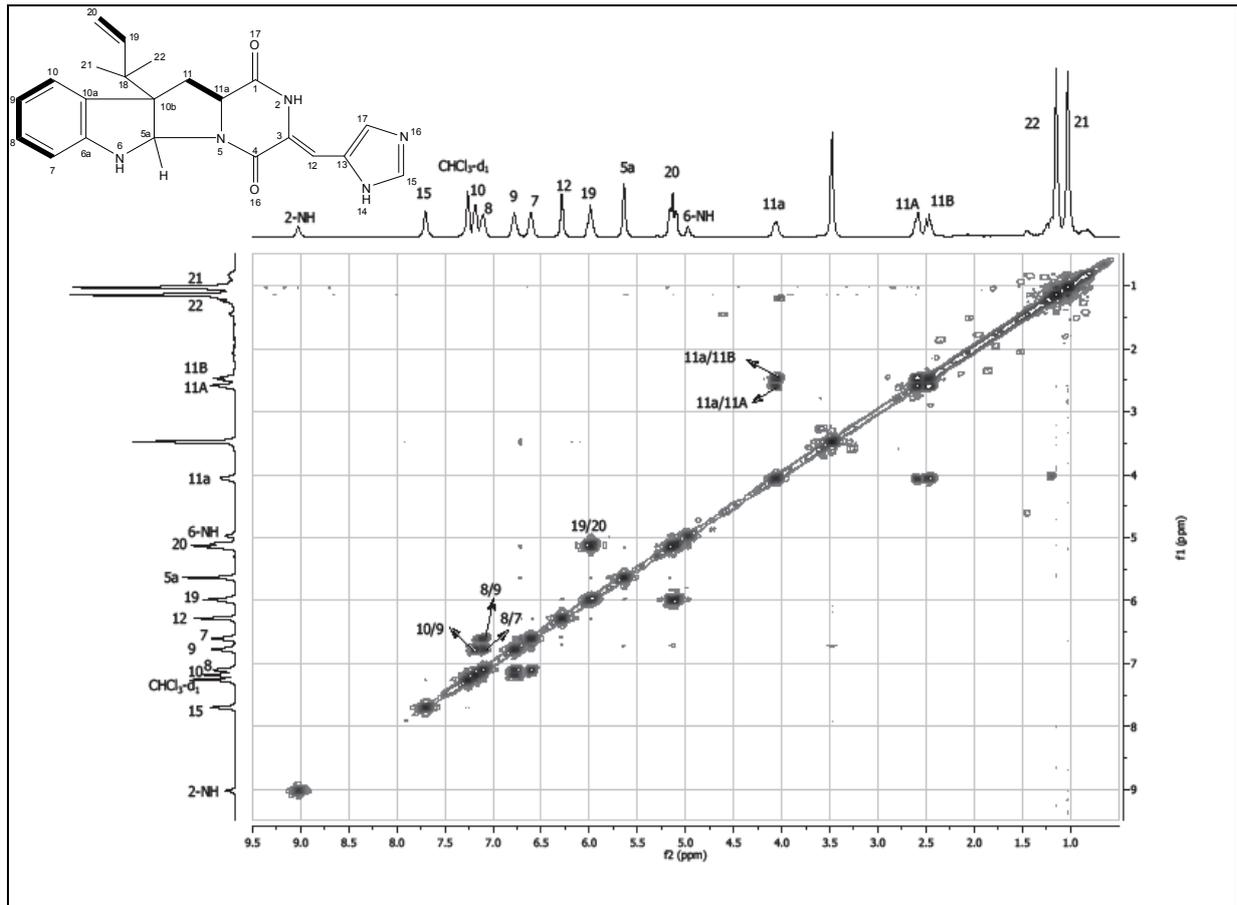
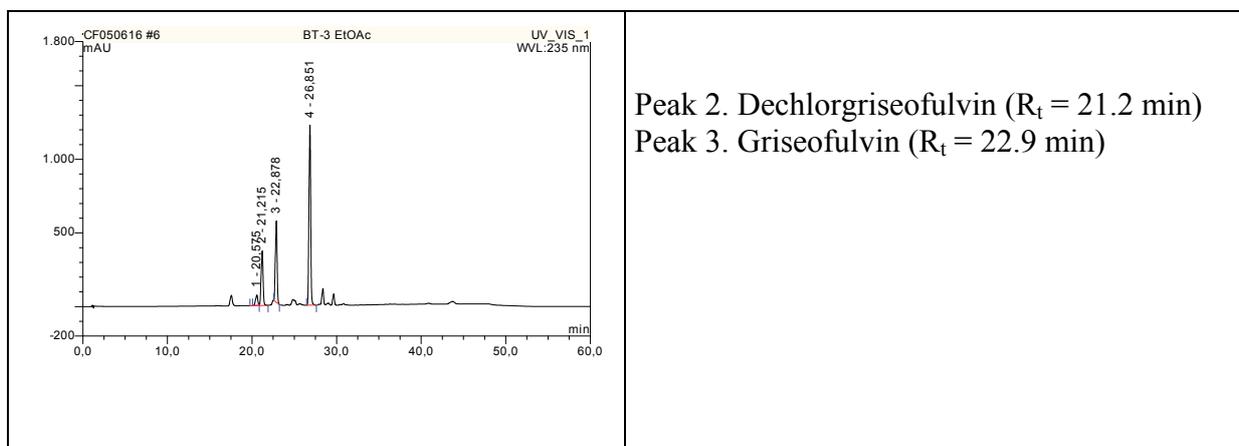


Abb. 29. COSY-Spektrum von Roquefortin C, gemessen in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

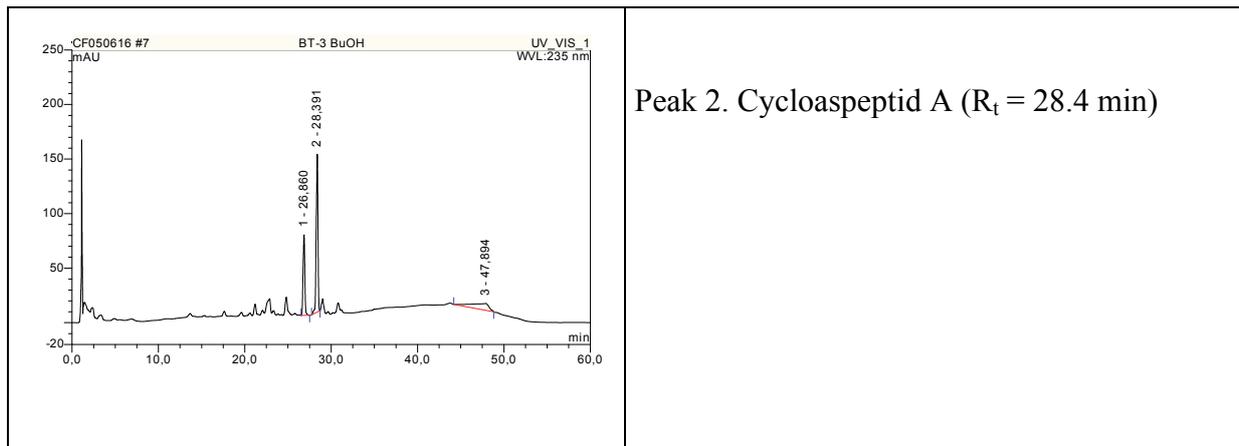
### 3.3. Inhaltsstoffe aus *Botryosphaeria rhodina* (BT-3)

Der Pilz *Botryosphaeria rhodina* (Anamorph: *Lasiodiplodia theobromae*) wurde aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* (Herkunft: Rheinbreitbach, Siebengebirge) isoliert. Nach der Kultivierung auf flüssigem Medium wurden aus dem EtOAc-Extrakt (56.4 mg) mittels semi-preparativer HPLC die zwei miteinander verwandten Benzofuran-Derivate Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin isoliert. Aus dem BuOH-Extrakt (219.7 mg) wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel das Peptid Cycloaspeptid A isoliert. Cycloaspeptid A, Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin konnten bereits anhand der UV-Spektren und ESI-Massenspektren durch Vergleich mit den authentischen Reinsubstanzen eindeutig identifiziert werden.

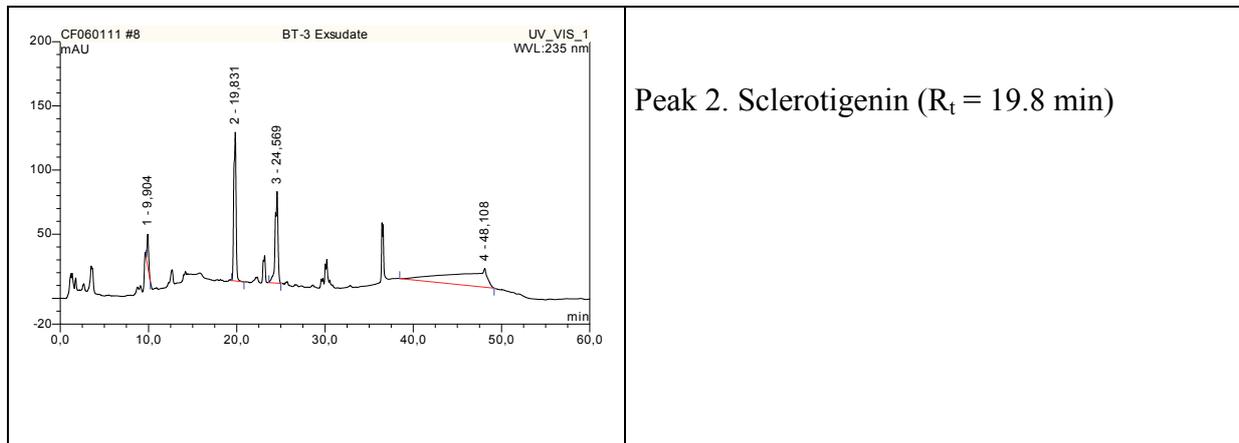
Dieser Stamm wurde auch in größerem Maßstab auf Reismedium kultiviert und extrahiert. Aus diesem Verfahren wurde 45.6 g EtOAc-Extrakt, 19.4 g MeOH-Extrakt und, da bei dieser Art der Kultivierung auffallende Exkrettropfen auf den Mycelien beobachtet wurden, die sich leicht mit einer Pipette „ernten“ liessen, insgesamt 1.0 g Exsudate gewonnen. Mit Hilfe der UV/Vis-Spektrenbibliothek konnte festgestellt werden, dass der EtOAc- und MeOH-Extrakt als Hauptkomponenten ebenfalls Cycloaspeptid A, Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin enthielt. Aus den Exsudaten wurde mittels Säulenchromatographie über Sephadex LH-20 die Hauptkomponente des Extraktes isoliert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden als Sclerotigenin identifiziert.



**Abb. 30. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Botryosphaeria rhodina***

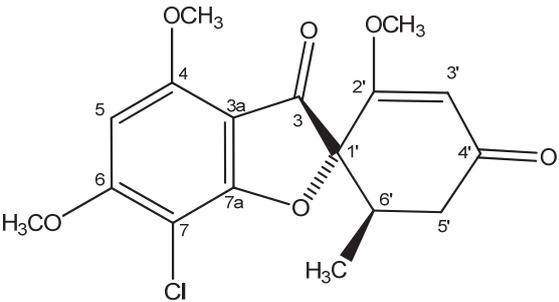
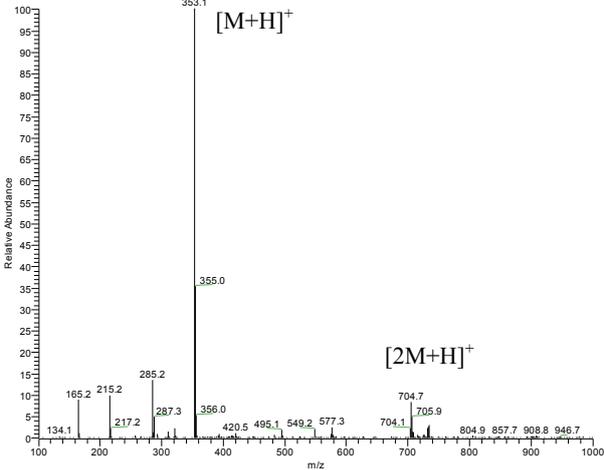
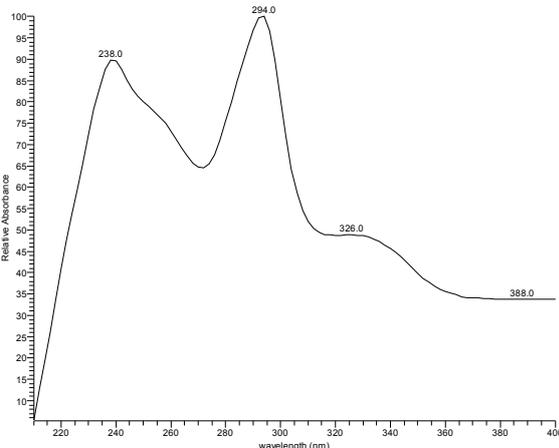
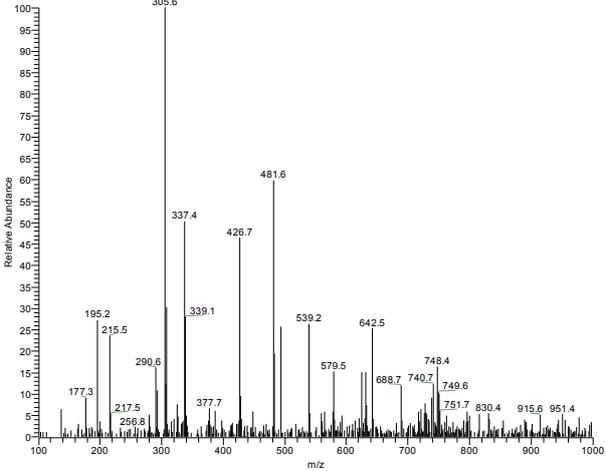


**Abb. 31. HPLC-Chromatogramm des BuOH-Extraktes von *Botryosphaeria rhodina***



**Abb. 32. HPLC-Chromatogramm des Exsudat-Extraktes von *Botryosphaeria rhodina* auf Reismedium**

## 3.3.1. Griseofulvin

<b>GRISEOFULVIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	7- Chloro-4,6-dimethoxy coumaran-3-on-2-spiro-1'- (2'-methoxy-6'-methylcyclohex-2'-en-3'-on)
<b>Probencode:</b>	BT-3E-P3
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Botryosphaeria rhodina</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	0.49 mg
<b>Beschreibung:</b>	weißes Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	352 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	+ 348° (c, 0.01 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	25.0 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> BT-3E #887 RT: 25.13 Av: 1 NL: 4.94E8 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b> BT-3E #3752 RT: 25.26 Av: 1 NL: 3.01E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> BT-3E #885 RT: 25.07 Av: 1 NL: 5.59E5 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
*Im negativen Modus konnte keine Ionisation erzielt werden	

Griseofulvin wurde mittels semi-präparativer HPLC aus dem EtOAc-Extrakt von *Botryosphaeria rhodina* Stamm BT-3 als weißes Pulver (0.49 mg) isoliert. Die Struktur dieser Verbindung wurde durch Abgleich des aufgezeichneten UV-Spektrums mit der internen UV/Vis-Spektrenbibliothek und anhand der ESI-Massenspektren identifiziert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 238, 294 und 326 nm. Das (+)-ESI-Spektrum zeigte einen Molekülionenpeak bei  $m/z$  353  $[M+H]^+$ , so dass sich ein Molekulargewicht von 352 Dalton ableiten liess. Ferner wies das typische Verhältnis von 3:1 für die beiden Peaks bei  $m/z$  353 und  $m/z$  355 auf das Vorhandensein eines Chloratoms im Molekül hin.

Das in deuteriertem Chloroform aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte die Anwesenheit einer Methylgruppe ( $6'$ -CH<sub>3</sub>) und dreier aliphatischer Protonen (H-5'a, H-6 und H-5'b). Drei Signale entsprechend den drei Methoxygruppen wurden zwischen 3.61 und 4.03 ppm ebenfalls beobachtet. Zusätzlich wurde im Tieffeldbereich ein olefinisches (H-3') und ein aromatisches Proton (H-5) identifiziert. Die ermittelten  $^1\text{H}$ -NMR-Daten (s. Tab. 12) stimmten mit denen des in der Literatur beschriebenen Griseofulvins überein und konnten entsprechend zugeordnet werden (Rønne<sup>1</sup> *et al.*, 2010).

Zur Absicherung der absoluten Konfiguration der Verbindung wurde der Drehwert bestimmt. Die experimentell ermittelte optische Drehung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 348^\circ$  (c, 0.01 in CHCl<sub>3</sub>) stimmte mit dem in der Literatur angegebenen Drehwert  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} + 337^\circ$  (c, 1.00 in Aceton) überein (Grove *et al.*, 1952).

**Tabelle 12. NMR-Daten von Griseofulvin**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in DMSO- $d_6$ , 300 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)
4-OCH <sub>3</sub>	3.94, s	3.98, s
5	6.50, s	6.13, s
6- OCH <sub>3</sub>	4.05, s	4.03, s
2'- OCH <sub>3</sub>	3.62, s	3.62, s
3'	5.60, s	5.54, s
5'a	2.67, dd (16.6, 13.3)	3.03, dd (16.6, 13.4)
5'b	2.35, dd (16.6, 4.8)	2.43, dd (16.7, 4.7)
6'	2.80, ddq (13.3, 6.6, 4.8)	2.85, m
6'-CH <sub>3</sub>	0.80, dd (6.6)	0.96, d (6.7)

<sup>1</sup>Rønne<sup>1</sup> *et al.*, 2010

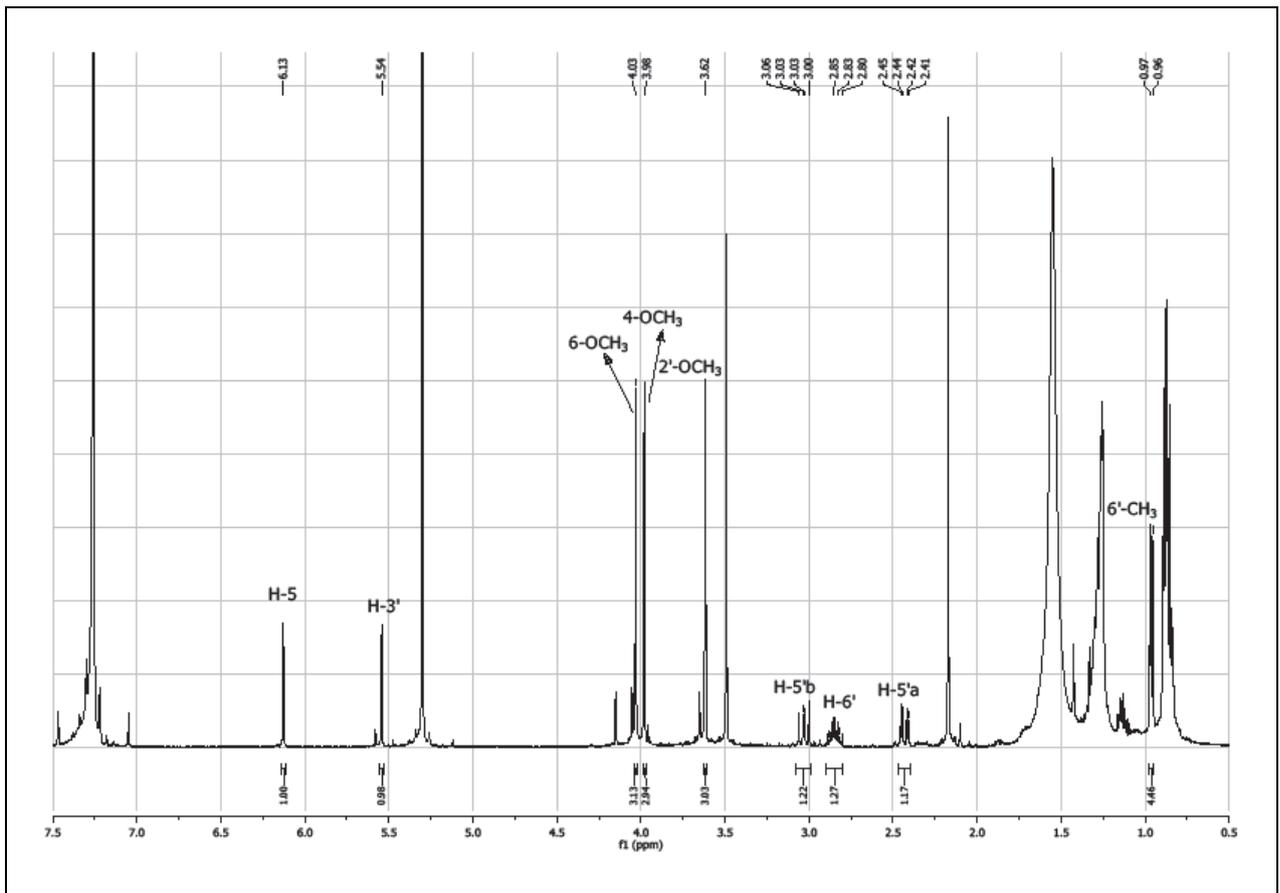
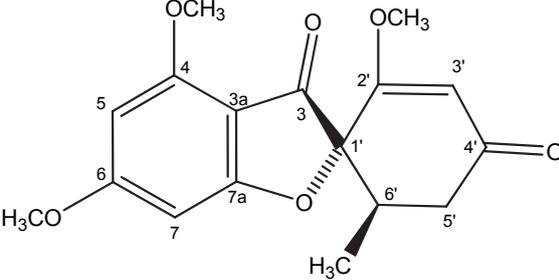
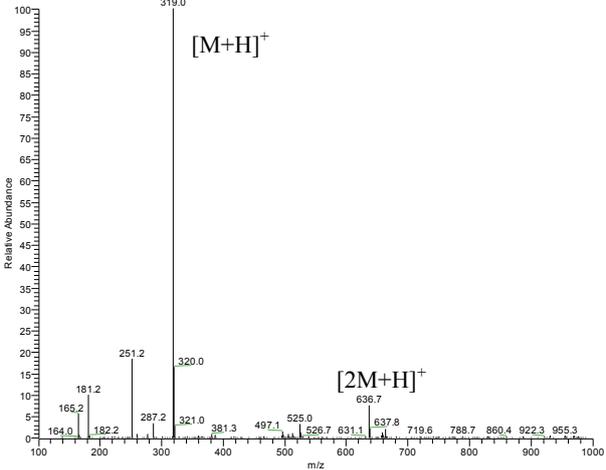
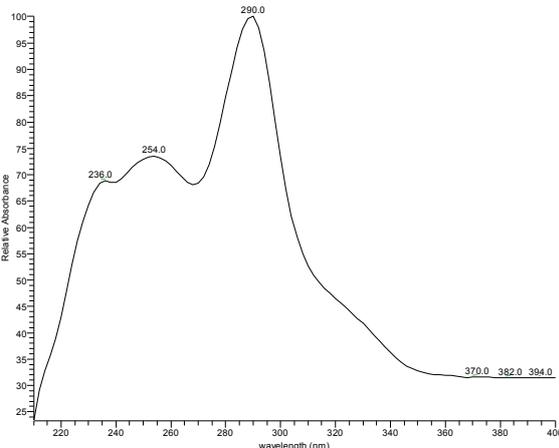
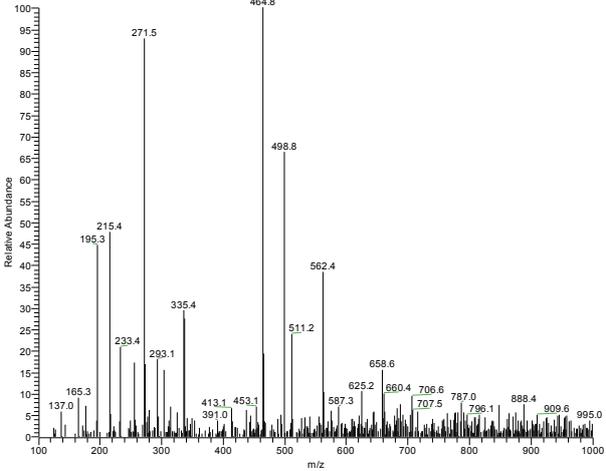


Abb. 33.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Griseofulvin, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

## 3.3.2. Dechlorgriseofulvin

<b>DECHLORGRISEOFULVIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	4,6-Dimethoxycoumaran-3-on-2-spiro-1'- (2-methoxy-6'-methylcyclohex-2'-en-4'-on)
<b>Probencode:</b>	BT-3E-P2
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Botryosphaeria rhodina</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.05 mg
<b>Beschreibung:</b>	weißes Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	318 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	+ 398° (c, 0.10 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	23.5 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>BT-3E #803 RT: 22.98 AV: 1 NL: 7.51E8 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>BT-3E #3429 RT: 23.11 AV: 1 NL: 3.22E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>BT-3E #801 RT: 22.93 AV: 1 NL: 4.30E5 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
*Im negativen Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.	

Mit den bei Griseofulvin beschriebenen Methoden (siehe 3.3.1) wurde neben dieser Verbindung noch Dechlorgriseofulvin erhalten, und dieses ebenfalls bereits anhand UV-Spektrum und HPLC-Retentionszeit sowie ESI-Massenspektrum identifiziert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 236, 254 und 290 nm. Das ESI-Spektrum zeigte bei positiver Ionisierung einen Pseudomolekülionenpeak bei  $m/z$  319 ( $[M+H]^+$ ) sowie die Abwesenheit des bei Griseofulvin beobachteten Chlor-spezifischen Ionenclusters an, woraus sich die Summenformel  $C_{17}H_{18}O_6$  ableiten liess. Die deutete auf den Ersatz eines Chloratoms durch ein Proton im Vergleich zu Griseofulvin hin. Die  $^1H$ -NMR-Daten bestätigten diesen Verlust (s. Tab. 13). Das  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte dementsprechend ein zusätzliches Signal als das  $^1H$ -NMR-Spektrum für Griseofulvin. Es handelte sich hierbei um das aromatisches Proton H-7 (6.04 ppm, d,  $J = 1.7$  Hz), das eine *meta*-Kopplung mit dem anderen aromatischen Proton H-5 (6.23 ppm, d,  $J = 1.7$  Hz) aufwies. Insgesamt ergab ein Vergleich mit Literaturdaten eine gute Übereinstimmung der NMR-Spektren mit denen des Dechlorgriseofulvins, und die Übereinstimmung des Drehwertes von  $[\alpha]_D^{20} + 398.0$  (c, 0.10 in  $CHCl_3$ ) mit dem Wert aus der Literatur machte deutlich, dass es sich auch um identische Stereoisomere handeln musste (MacMillan, 1953; Park *et al.*, 2005).

**Tabelle 13. NMR-Daten von Dechlorgriseofulvin**

Position	$\delta^1H$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $CDCl_3$ , 500 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1H$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $CDCl_3$ , 500 MHz)
4-OCH <sub>3</sub>	3.63, s	3.91, s
5	6.24, d (1.8)	6.23, d (1.7)
6-OCH <sub>3</sub>	3.90, s	3.90, s
7	6.05, d (1.7)	6.04, d (1.7)
2'-OCH <sub>3</sub>	3.91, s	3.62, s
3'	5.55, s	5.54, s
5'a	3.05, dd (16.8, 13.4)	3.06, dd (16.6, 13.6)
5'b	2.41, dd (16.8, 4.7)	2.40, dd (16.7, 4.7)
6'	2.75, m	2.75, m
6'-CH <sub>3</sub>	0.97, dd (6.7)	0.96, d (6.7)

<sup>1</sup> Park *et al.*, 2005

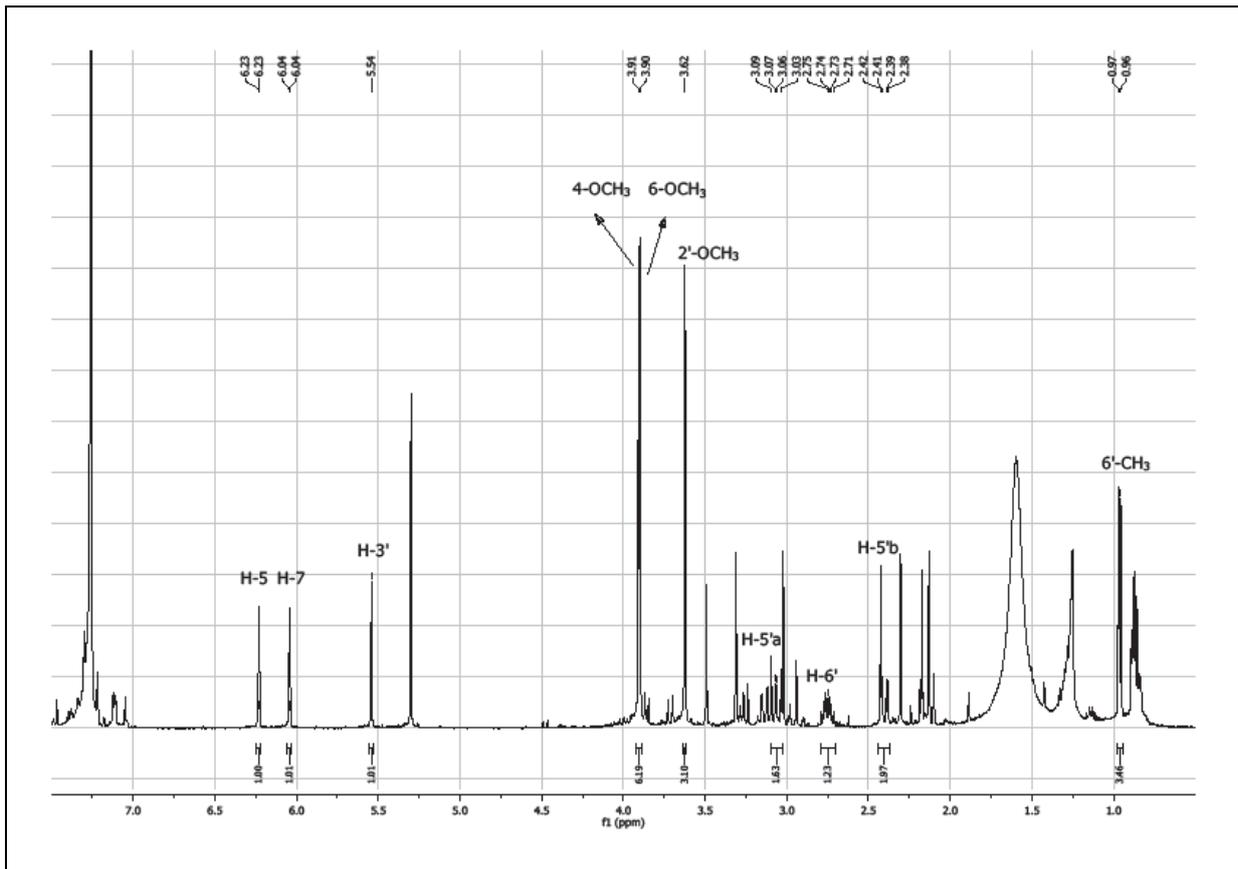
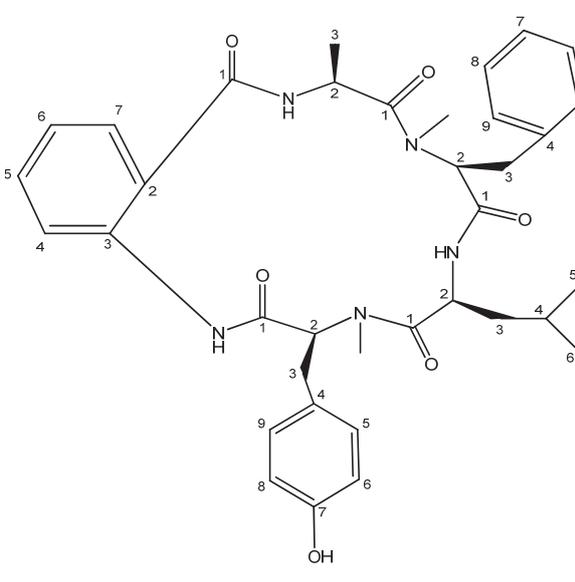
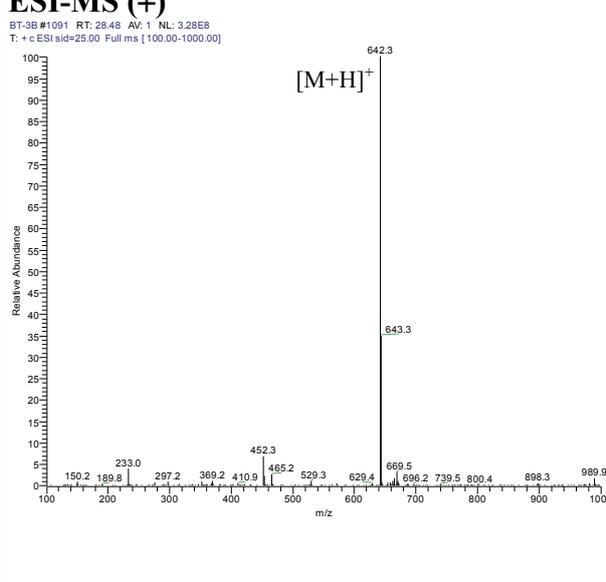
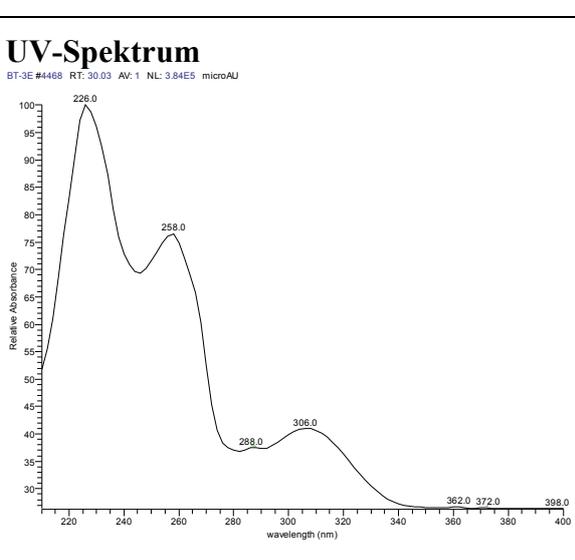
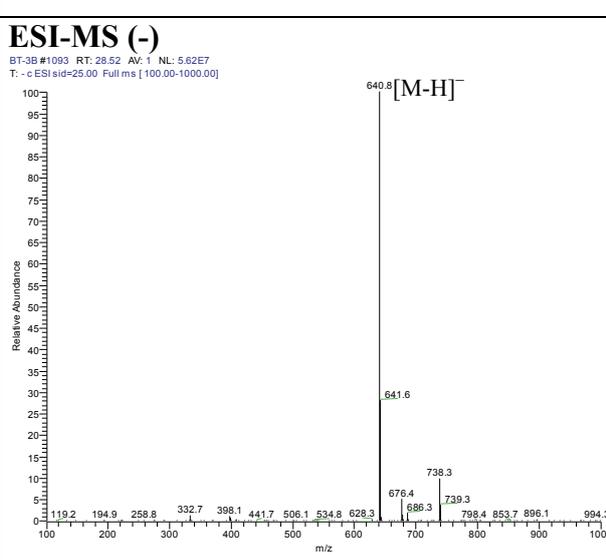


Abb. 34.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dechlorgriseofulvin, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

## 3.3.3. Cycloaspeptid A

<b>CYCLOASPEPTID A</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	13-Benzyl-7-(4-hydroxy-benzyl)-10-isobutyl-8,14,16-trimethyl-7,8,10,11,13,14,16,17-octahydro-5H-5,8,11,14,17-pentaaza-benzocyclohexadecen-6,9,12,15,18-pentaon
<b>Probencode:</b>	BT-3B-C13
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Botryosphaeria rhodina</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.5 mg
<b>Beschreibung:</b>	weißes Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O
<b>Molekulargewicht:</b>	641 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-213.0° (c, 0.10 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	29.0 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>BT-3B #1091 RT: 28.48 AV: 1 NL: 3.28E8 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>BT-3E #4468 RT: 30.03 AV: 1 NL: 3.84E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>BT-3B #1093 RT: 28.52 AV: 1 NL: 5.62E7 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 

Cycloaspeptid A wurde durch Abgleich des aufgezeichneten UV-Spektrums mit der internen UV/Vis-Spektrenbibliothek und anhand der ESI-Massenspektren identifiziert. Das Molekulargewicht ließ sich mit Hilfe des ESI-MS-Spektrums auf 641 g/mol festlegen, da bei positiver Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  642 ( $[M+H]^+$ ) und bei negativer Ionisierung bei  $m/z$  640 ( $[M-H]^-$ ) detektiert wurde. Das UV-Spektrum zeigte übereinstimmende Maxima bei 226, 258, 288 und 306 nm (Kobayashi *et al.*, 1987).

Aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte auf einige strukturelle Elemente geschlossen werden, die auf die Bausteine dieses cyclischen Pentapeptids hinwies (s. Tab. 14). Vier Signale mit chemischen Verschiebungen zwischen 3.79 und 5.20 ppm konnten mit Hilfe der Literaturdaten als die  $\alpha$ -Protonen der Aminosäuren Alanin (Ala), Leucin (Leu), *N*-Methylphenylalanin (Phe) und *N*-Methyltyrosin (Tyr) zugeordnet werden. Des Weiteren wurden in Tieffeldbereich ein Singulett bei 12.02 ppm für das amidische Proton und ein Dublett bei 8.91 ppm ( $J=8.8$  Hz) für das aromatische Proton H-7 der Anthranilsäure (ABA) identifiziert. Weiterhin wurden zwischen 6.73 und 7.50 ppm Signale für zwei amidischen Protonen sowie für drei aromatische Systeme, eine Phenylgruppe (Phe), einen *para*-substituierten Phenylrest (Tyr) und einen *ortho*-substituierten Phenylring (ABA) beobachtet. Ferner zeigte das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Signalen zwischen 1.35 und 3.52 ppm für insgesamt sieben aliphatische Protonen, zwei Singuletts bei 2.72 und 2.87 ppm für die *N*-Methylgruppen, zwei überlappenden Signalen für zwei aliphatische Methylgruppen bei 1.00 ppm sowie ein Dublett für eine Methylgruppe bei 0.41 ppm.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten sowie die Bestimmung der optischen Drehung der Substanz von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -213.0$  (c, 0.10 in  $\text{CHCl}_3$ ) zeigten ebenfalls Übereinstimmung mit dem in der Literatur angegebenen Werte (Kobayashi *et al.*, 1987). Dies wies darauf hin, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierte Verbindung auch hinsichtlich der absoluten Konfiguration mit Cycloaspeptid A identisch war.

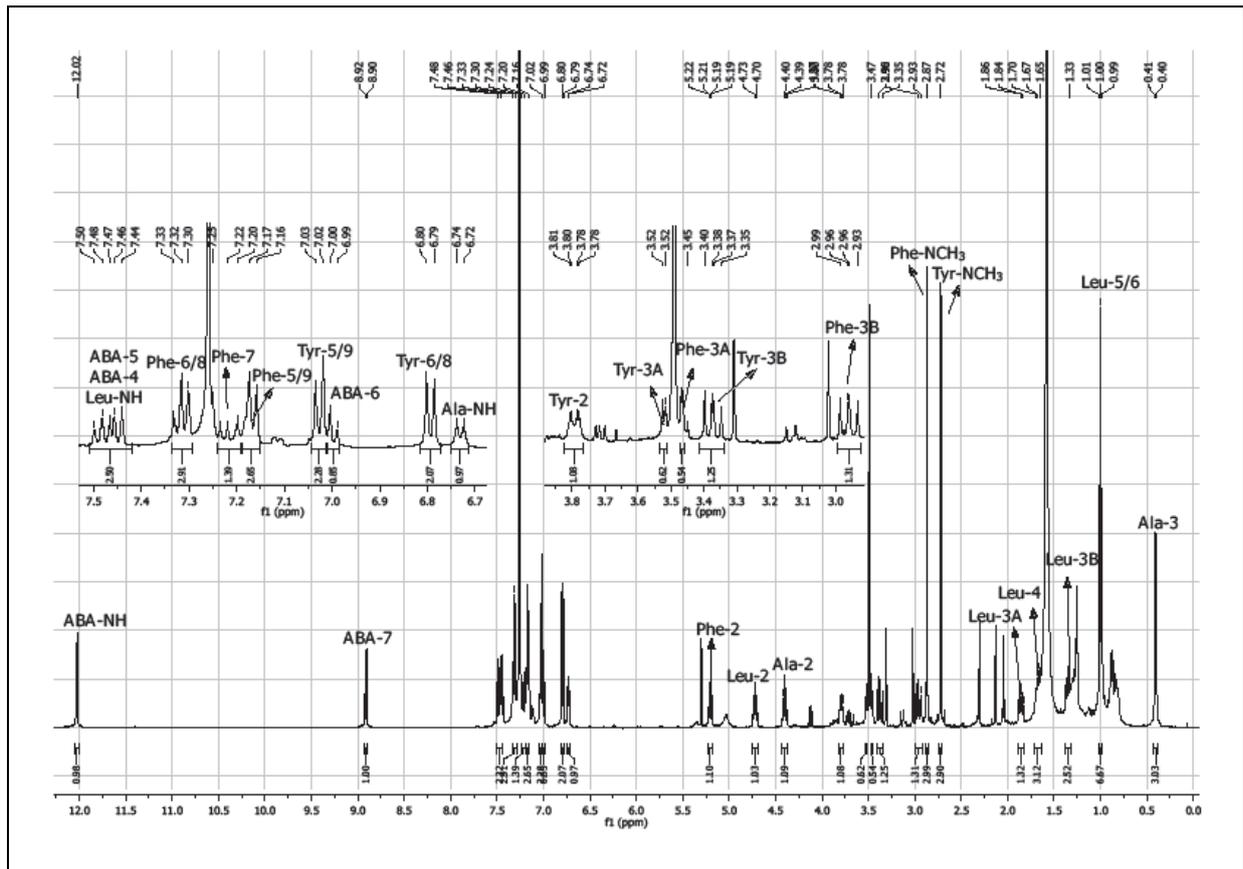


Abb. 35.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cycloaspeptid A, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

Tabelle 14. NMR-Daten von Cycloaspeptid A

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)
<b>ABA</b>		
4	7.43, dd (8.4, 2.0)	7.44-7.50, m <sup>b</sup>
5	7.48, ddd (8.5, 8.0, 2.0)	7.44-7.50, m <sup>b</sup>
6	6.96, br dd (8.4, 8.0)	7.00, d (7.9)
7	8.86, dd (8.5, 1.7)	8.91, d (8.8)
-NH	12.02, s	12.02
<b>Ala</b>		
2	4.41, qd (7.8, 6.6)	4.40, p (6.6)
3	0.41, d (6.6)	0.40, d (6.6)
-NH	7.03, d (7.8)	6.73, d (7.3)
<b>Phe</b>		
2	5.21, dd (12.0, 2.9)	5.20, dd (11.8, 3.0)
3A	3.50, dd (14.7, 2.9)	3.45-3.52, m <sup>c</sup>
3B	2.98, dd (14.7, 12.0)	2.96, dd (14.3, 12.5)
4	-	-
5/9	7.17, br d (8.0)	7.17, d (7.6)
6/8	7.32, t	7.32, t (7.7)
7	7.23, t	7.22, m
-NCH <sub>3</sub>	2.89, s	2.87, s
<b>Leu</b>		
2	4.72, ddd (8.5, 8.5, 5.5)	4.72, td (8.2, 8.2, 5.9)
3A	1.88, ddd (13.0, 8.5, 5.5)	1.86, m
3B	1.38, ddd (13.0, 8.0, 5.5)	1.35, m
4	1.72, m	1.67, m
5	1.00, d (6.6) <sup>a</sup>	1.00, t (6.3) <sup>d</sup>
6	1.01, d (6.6) <sup>a</sup>	1.00, t (6.3) <sup>d</sup>
-NH	7.38, d (8.5)	7.44-7.50, m <sup>b</sup>
<b>Tyr</b>		
2	3.78, dd (11.3, 4.3)	3.79, dd (11.1, 3.2)
3A	3.48, dd (14.0, 4.3)	3.45-3.52, m <sup>c</sup>
3B	3.37, dd (14.0, 11.3)	3.37, dd (14.2, 11.3)
5/9	7.00, d (8.3)	7.03, d (8.2)
6/8	6.79, d (8.3)	6.79, d (8.2)
-OH	6.03, s	-
-NCH <sub>3</sub>	2.69, s	2.72, s

<sup>1</sup> Kobayashi *et al.*, 1987<sup>a</sup> Signale austauschbar<sup>b,c,d</sup> Signalüberlappung

## 3.3.4. Sclerotigenin

<b>SCLEROTIGENIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	6,7-Dihydro-chinazolin[3,2-a][1,4]benzodiazepin-5,13-dion
<b>Probencode:</b>	BT-3RLS-Ex-DS8
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Botryosphaeria rhodina</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	2.91 mg
<b>Beschreibung:</b>	weißes Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	277 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	20.2 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>BT-3RLSExDS8#588 RT: 15.91 AM: 1 NL: 4.15E8 T: + c ESI sld=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>BT-3RLSExDS8#2359 RT: 15.82 AM: 1 NL: 5.20E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>BT-3RLSExDS8#587 RT: 15.88 AM: 1 NL: 6.78E4 T: - c ESI sld=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 

Sclerotigenin wurde aus dem Ethylacetatextrakt von dem auf Reismedium kultivierten *Botryosphaeria rhodina* Stamm BT-3 mittels präparativer HPLC isoliert. Die Struktur dieser aus einem Benzodiazepin und einem Chinazolinon bestehenden Substanz konnte mit Hilfe von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie dem COSY und dem HMBC-Spektrum, einer Datenbankrecherche im „Dictionary of Natural Products“ sowie dem Vergleich der spektroskopischen Daten mit aus der Literatur entnommenen Werten aufgeklärt werden. Das Molekulargewicht von 277 g/mol wurde anhand der Pseudomolekülionenpeaks in den ESI-MS-Spektren bei positiver bzw. bei negativer Ionisierung bestimmt. Das UV-Spektrum zeigte übereinstimmende Maxima bei 230, 270, 280 und 310 nm.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten zunächst zehn Protonen detektiert werden, acht davon bei einer chemischen Verschiebung zwischen 8.28 und 7.59 ppm, die somit Teil von aromatischen Systemen sein mussten (s. Tab 15.). Anhand ihrer Kopplungskonstanten und der Korrelationen im COSY-Spektrum konnten, trotz teilweiser Signalüberlappung, zwei 1,2-disubstituierte Benzolring-Spin-Systeme identifiziert werden. Die Protonen H-4, 5, 6 und 7 konnten einem gemeinsamen ABCD-System eines 1,2-disubstituierten Benzolrings zugeordnet werden, der zu einem kondensierten Benzodiazepingerüst gehörte. Die Protonen H-12, 13, 14 und 15 gehörten einem weiteren ABCD-Spin-Systems eines 1,2-disubstituierten Benzolrings an, der seinerseits ein Teil eines Chinazolingerüsts war. Weiterhin wurden die zu einer Methylenfunktion gehörende Protonen H<sub>2</sub>-19 (4.30 und 4.16 ppm) detektiert. Da ein protisches Lösungsmittel (MeOD) benutzt wurde, war das Signal der NH-Gruppe aufgrund des Austausches gegen Deuterium nicht detektierbar.

Die Analyse des HMBC-Spektrums zeigte unter anderen die Korrelationen zwischen dem aromatischen Proton H-4 (7.90 ppm) sowie der Methylengruppe H<sub>2</sub>-19 (4.30 und 4.16 ppm) mit dem Carbonylkohlenstoff C-2 (170.4 ppm). Die Methylengruppe H<sub>2</sub>-19 korrelierte ebenso mit dem  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoff C-18 (156.3 ppm) der Chinazolin-Substruktur. Das aromatische Proton H-12 (8.28 ppm) zeigte eine Korrelation zu der Carbonylgruppe C-10 (163.6 ppm), was auf die Verknüpfung von C-10 mit diesem aromatischen Ring an der Position C-11 (122.6 ppm) hindeutete.

Die Übereinstimmung sämtlicher erhaltener experimenteller Daten mit den Literaturangaben (Joshi *et al.*, 1999) führte zur Identifizierung dieser Verbindung als Sclerotigenin.

Tabelle 15. NMR-Daten von Sclerotigenin

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in MeOD, 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in MeOD, 125 MHz) <sup>2</sup>	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	7.19, br t (6.0)	-	-	-	-	-
2	-	-	168.2	170.4	-	-
3	-	-	129.8	129.6	-	-
4	7.95, br d (7.8)	7.90, m <sup>b</sup>	130.3	-	5	2, 6, 8
5	7.53, m	7.59, m <sup>c</sup>	129.1	-	4, 6	3
6	7.62, m <sup>a</sup>	7.68, m <sup>d</sup>	131.4	132.6	5	-
7	7.61, m <sup>a</sup>	7.68, m <sup>d</sup>	128.1	-	-	-
8	-	-	133.7	135.2	-	-
10	-	-	161.3	163.6	-	-
11	-	-	121.5	122.6	-	-
12	8.29, dd (8.0, 1.4)	8.28, dd (7.9, 1.4)	127.6	128.3	13	10, 12, 14, 16
13	7.52, m	7.63, m <sup>c</sup>	127.8	-	12, 14	11, 12
14	7.78, ddd (8.1, 8.1, 1.4)	7.87, m <sup>b</sup>	135.1	136.3	13, 15	12, 16
15	7.66, br d (8.1)	7.73, d (8.0)	127.3	-	14	11
16	-	-	146.2	147.8	-	-
18	-	-	153.6	156.3	-	-
19a	4.29, dd (15.0, 5.7)	4.30, d (15.1)	47.0	-	19b	2, 18
19b	4.21, dd (15.0, 6.9)	4.16, d (15.1)			19a	

<sup>1</sup>Joshi *et al.*, 1999<sup>2</sup>Werte aus dem HMBC entnommen <sup>a,b,c,d</sup>Signalüberlappung

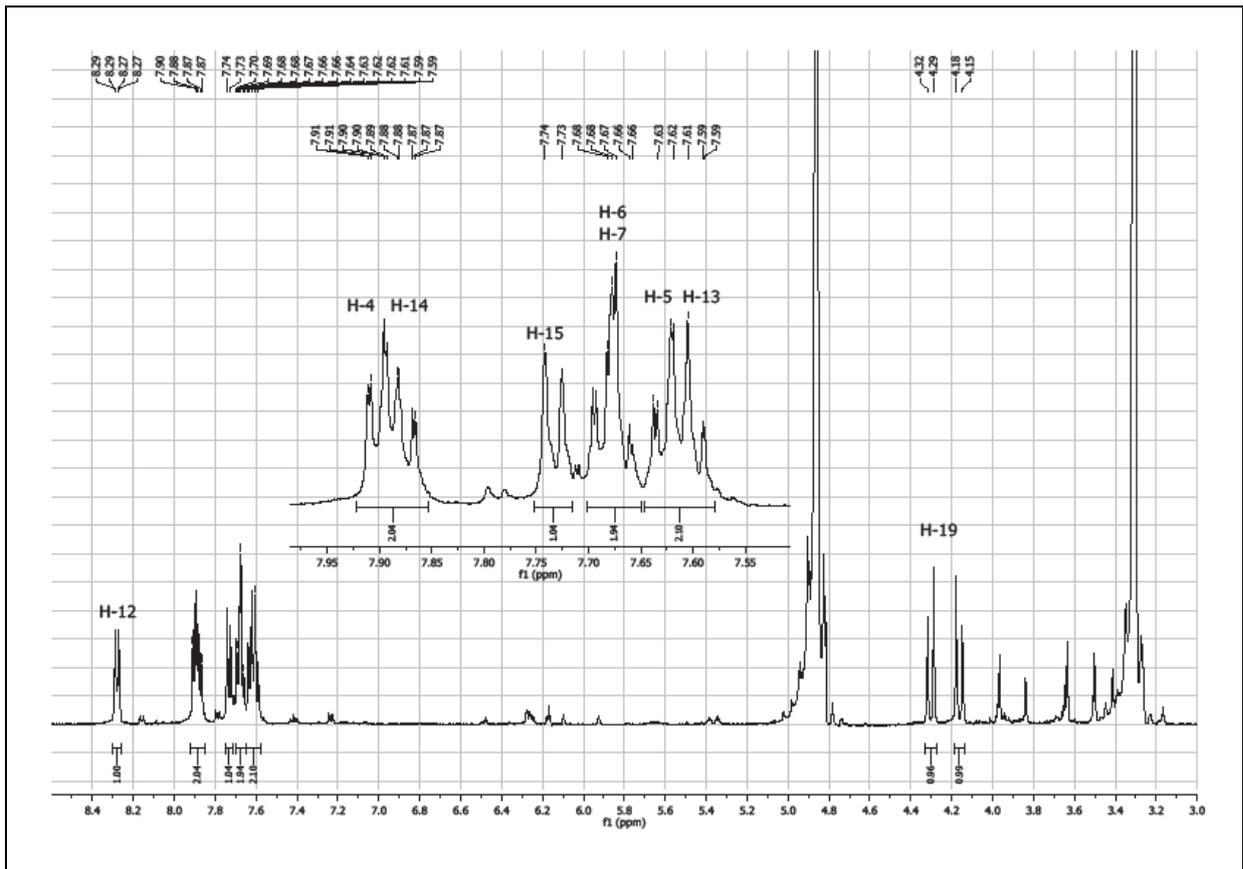


Abb. 36.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Sclerotigenin, gemessen in MeOD (500 MHz)

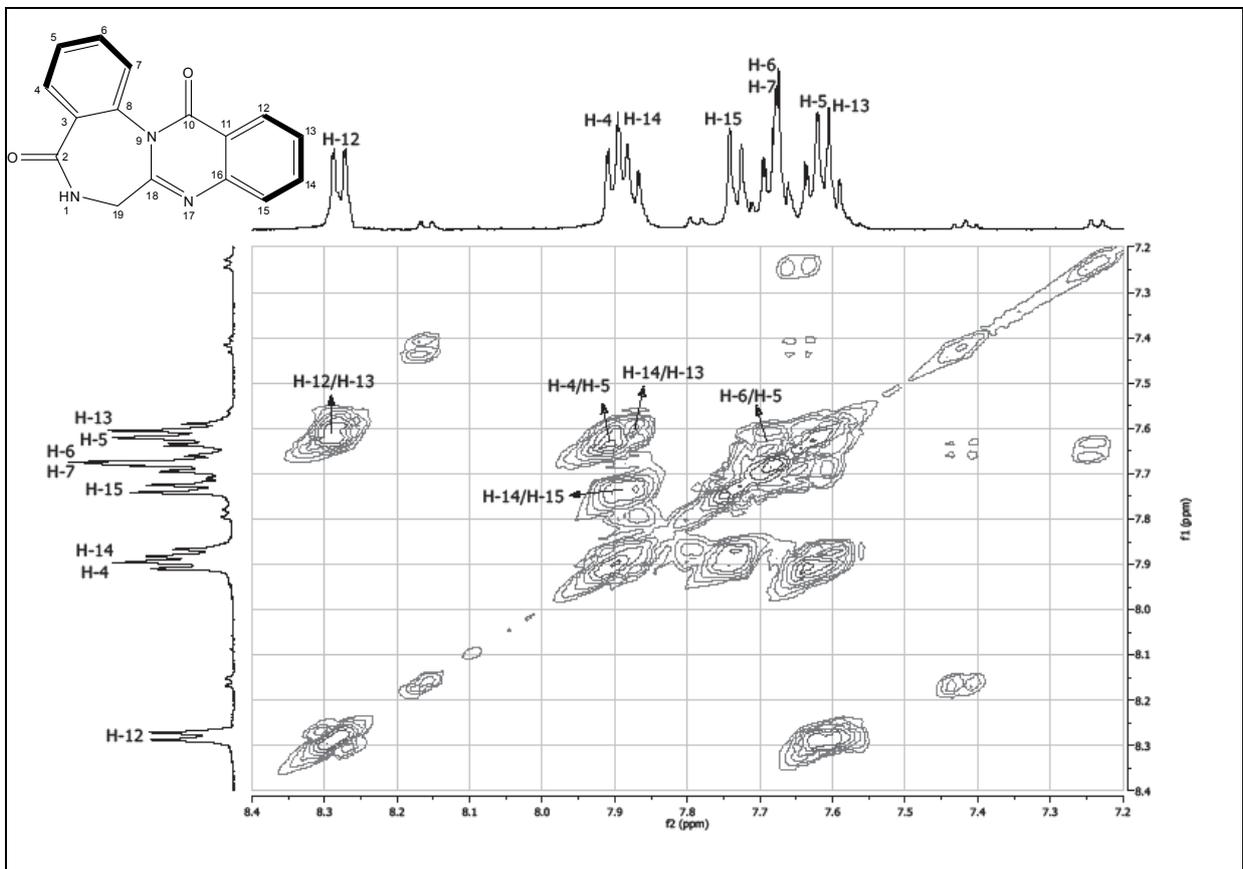


Abb 37. COSY-Spektrum von Sclerotigenin, gemessen in MeOD (500 MHz)

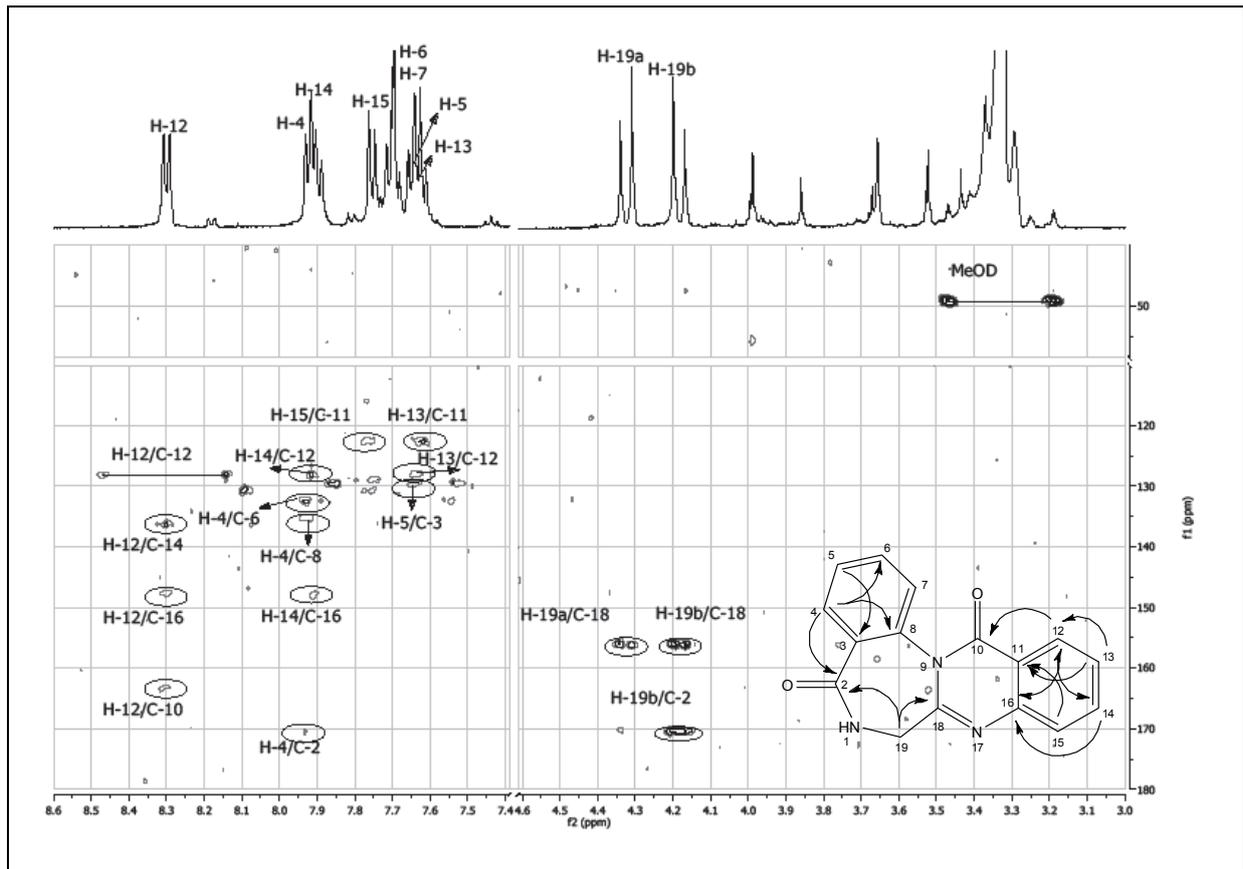


Abb. 38. HMBC-Spektrum von Sclerotigenin, gemessen in MeOD (500 MHz)

### 3.4. Inhaltsstoffe aus *Neurospora discreta* (NE-8)

Der Pilz *Neurospora discreta*, der aus der nigerianischen Bonko-Frucht (*Morinda lucida*) stammt, wurde in kleinerem Maßstab (300 ml) auf flüssigem Medium kultiviert. Aus dem EtOAc-Extrakt (91.2 mg) wurde mittels Säulenchromatographie über Sephadex LH-20 der Hauptmetabolit des Extraktes isoliert. Der Substanz wurde mit Hilfe spektroskopischer Methoden als Kojisäure identifiziert. Diese bekannte Verbindung wurde bereits mehrfach aus verschiedenen Pilzen beschrieben, darunter *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Lecytophora* sp. (Yabuta, 1916; Parrish *et al.*, 1966; Diesel, 2009).

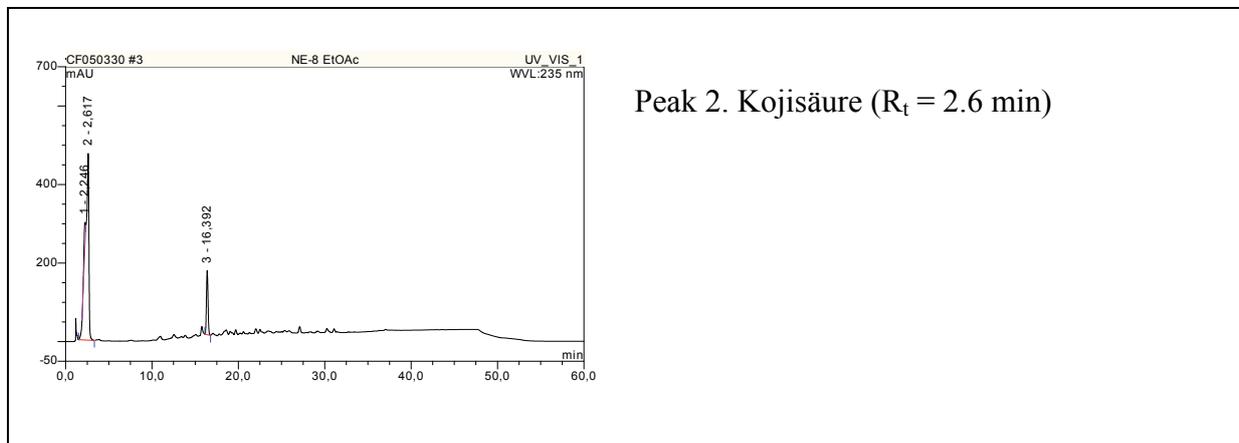
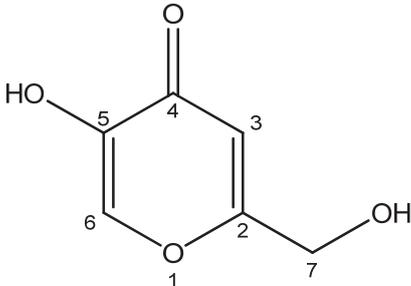
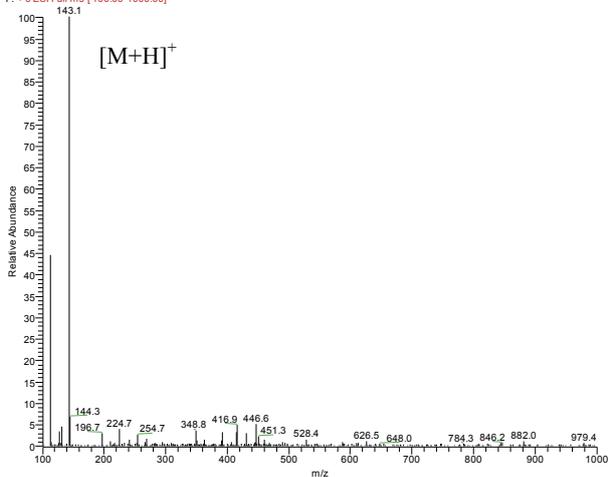
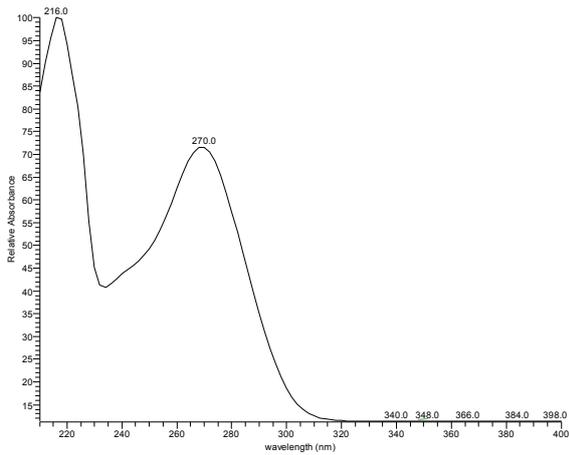
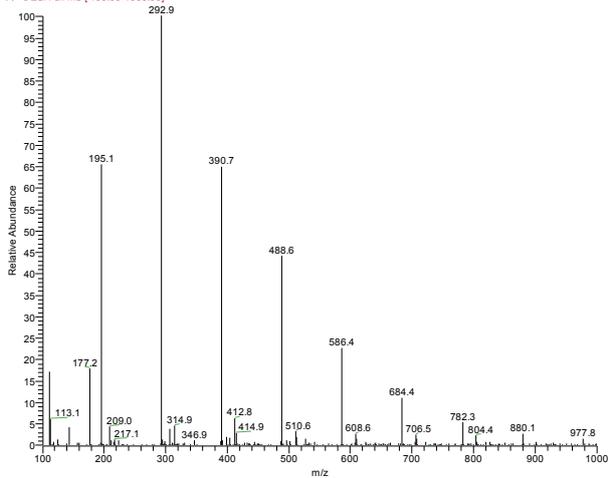


Abb. 39. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Neurospora discreta*

## 3.4.1. Kojisäure

<b>KOJISÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-on
<b>Probencode:</b>	NE-8E-S2
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora discreta</i> (aus <i>Morinda lucida</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	39.0 mg
<b>Beschreibung:</b>	bräunlich, dickflüssig
<b>Summenformel:</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	142 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	2.4 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>NE-8E-S2 #161 RT: 3.34 AV: 1 NL: 9.01E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>NE-8E-S2 #474 RT: 3.41 AV: 1 NL: 8.76E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>NE-8E-S2 #167 RT: 3.48 AV: 1 NL: 2.71E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</small> 
*Im negativen Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.	

Kojisäure wurde aus dem EtOAc-Extrakt von *Neurospora discreta* Stamm NE-8 als bräunliche, dickflüssige Substanz (39.0 mg) gewonnen, was auf Unreinheiten der Substanz zurückzuführen ist. Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigte Maxima bei 216, 270 nm. Durch ESI-Massenspektrometrie wurde die Molmasse zu 142 g/mol bestimmt.

Das in MeOD aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte die Signale von einer Methylengruppe H<sub>2</sub>-7 (4.41 ppm) und zwei Methingruppen H-3 und H-6 (6.50 und 7.96 ppm) (s. Tab. 16). Aufgrund der Verwendung des protischen Lösungsmittels wurden die austauschbaren Protonen nicht detektiert. Mithilfe des HMBC-Spektrums (s. Abb. 40) konnten die chemischen Verschiebungen aller Kohlenstoffatome abgeleitet werden. Neben den Direktkorrelationen der Methylengruppe C-7 (56.3 ppm) und der beiden Methingruppen C-3 und C-6 (106.0 und 136.4 ppm) waren im HMBC-Spektrum noch drei quartäre Kohlenstoffatome bei 142.7 (C-5, Korrelationen zu H-3 und H-6), 166.0 (C-2, Korrelationen zu H-3, H-6 und H<sub>2</sub>-7) und 172.5 ppm (C-4, Korrelationen zu H-3 und H-6) zu erkennen. Eine Datenbanksuche (Antibase, 2003) gefolgt von einem Vergleich mit den Literaturdaten (Aldrich, 1992) bestätigte, dass es sich bei der Hauptkomponente dieses Extraktes um Kojisäure handelte.

**Tabelle 16. NMR-Daten von Kojisäure**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in MeOD, 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in DMSO, 75 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in MeOD, 125 MHz) <sup>2</sup>	HMBC (H→C)
2	-	-	167.9	166.0	-
3	6.3	6.50, s	109.7	106.0	2, 3, 4, 5, 7
4	-	-	173.8	172.5	-
5	-	-	145.6	142.7	-
5-OH	9.0	-	-	-	-
6	8.0	7.96, s	139.1	136.4	2, 3, 4, 5, 6, 7
7	4.3	4.41, d (0.6)	59.4	56.5	2, 3, 7
7-OH	5.7	-	-	-	-

<sup>1</sup> Aldrich, 1992

<sup>2</sup> Werte aus dem HMBC-Spektrum entnommen

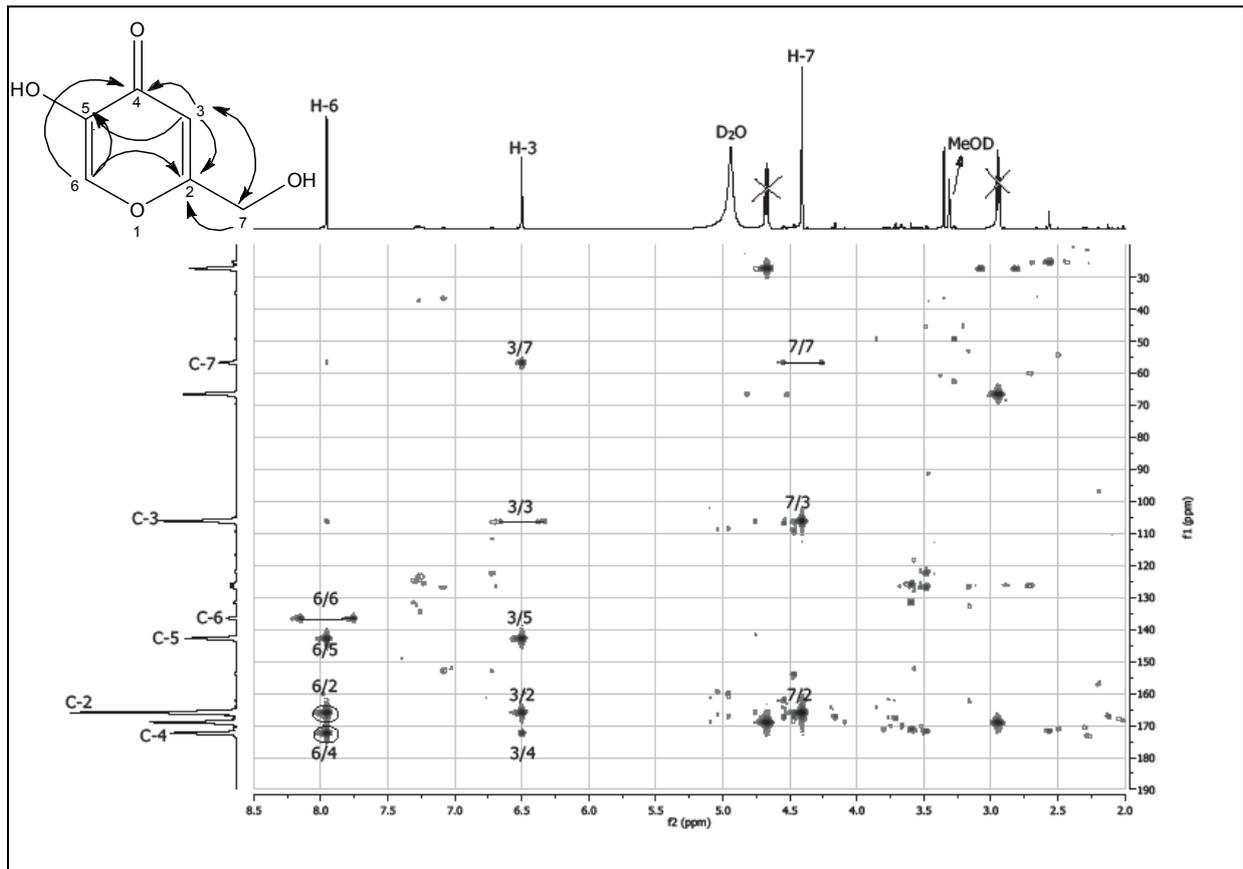


Abb. 40. HMBC-Spektrum von Kojisäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

### 3.5. Inhaltsstoffe aus *Fusarium incarnatum* (MGC-1.3)

Der Pilz *Fusarium incarnatum* Stamm MGC-1.3 wurde aus dem Blatt der chinesischen Mangrovepflanze *Hertiera littoralis* isoliert und in kleinerem Maßstab auf Wickerham-Flüssigmedium kultiviert und extrahiert. Aus diesem Verfahren wurde 100.4 mg EtOAc-Extrakt und 300.2 mg MeOH-Extrakt erhalten. Aus dem EtOAc-Extrakt wurden mittels semi-präparativer HPLC die Toxine Fusapyron und Desoxyfusapyron gewonnen. Der MeOH-Extrakt wurde mit Hexan extrahiert. Aus dieser apolaren Fraktion (90.7 mg) des MeOH-Extraktes wurde mittels Kieselgel-Säulenchromatographie das Mykotoxin Equisetin isoliert.

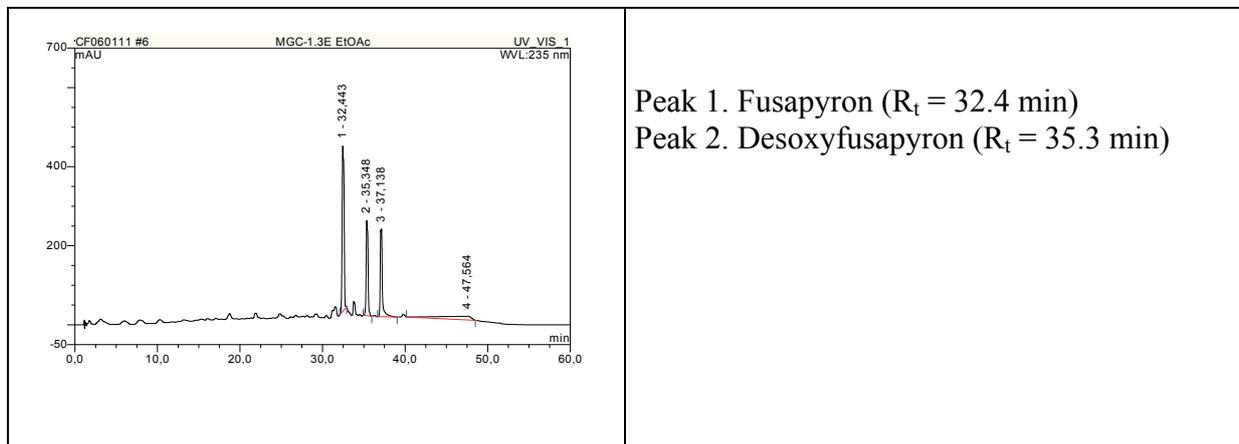


Abb. 41. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Fusarium incarnatum*

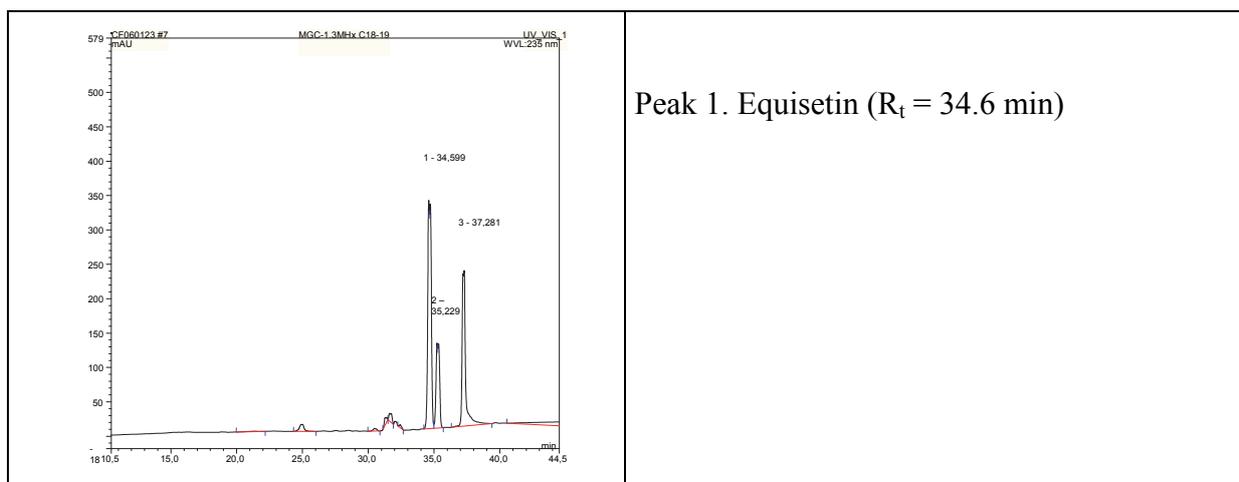
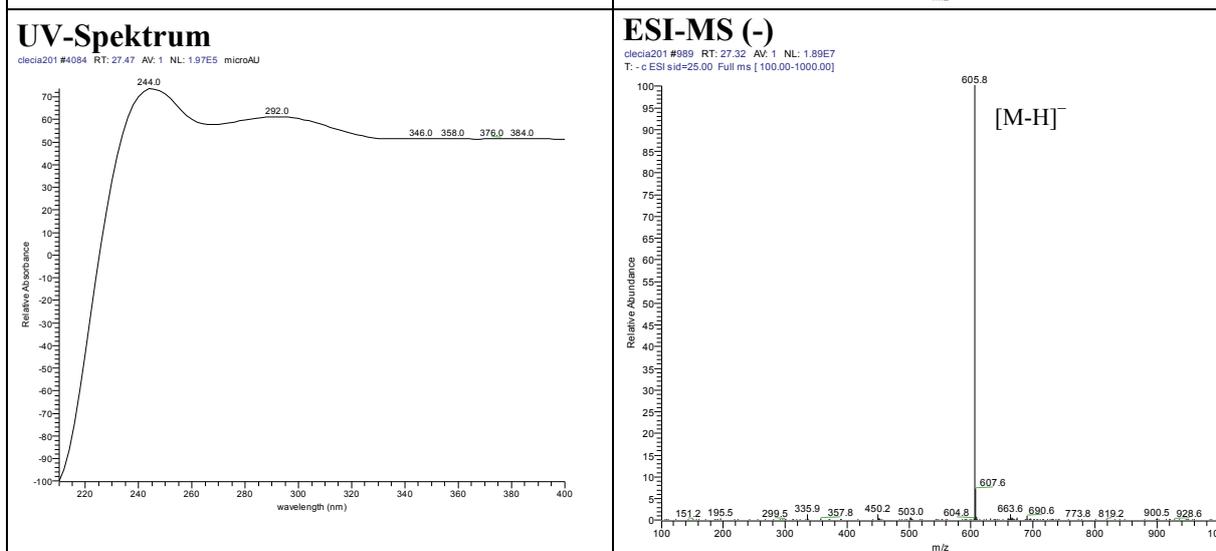
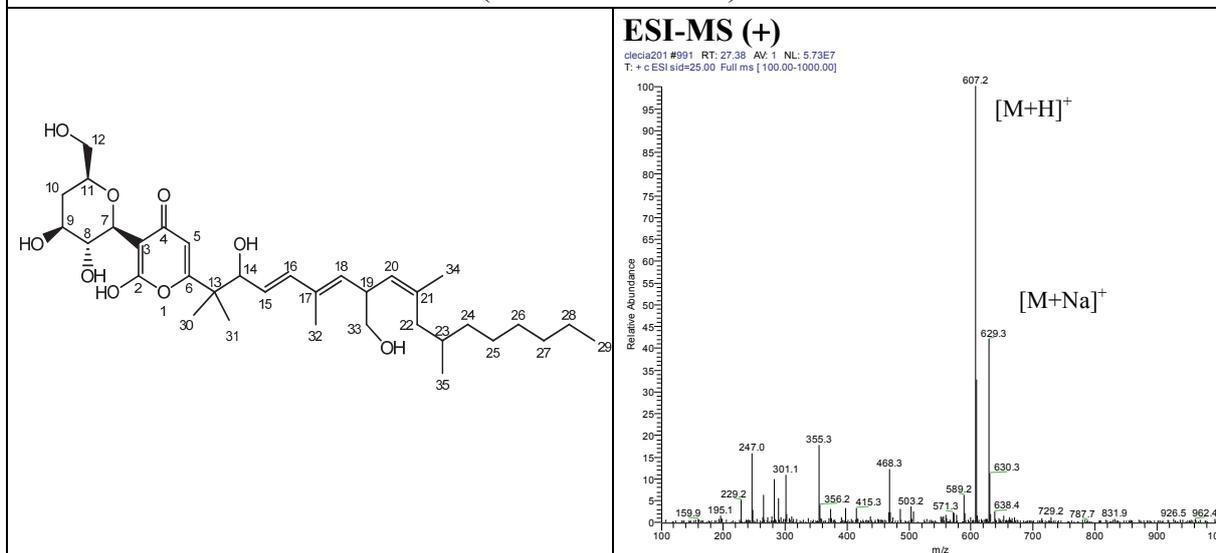


Abb. 42. HPLC-Chromatogramm der Hx-Fraktion des MeOH-Extraktes von *Fusarium incarnatum*

## 3.5.1. Fusapyron

<b>FUSAPYRON</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-(Tetrahydro-3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-2-yl)-4-hydroxy-6-((4E,6E)-3,9-dihydroxy-2,6-dimethyl-8-((Z)-2,4-dimethyldec-1-enyl)nona-4,6-dien-2-yl)-2H-pyran-2-on
<b>Probencode:</b>	MGC-1.3EE-PA
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Fusarium incarnatum</i> (aus <i>Heritiera littoralis</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	6.8 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>34</sub> H <sub>54</sub> O <sub>9</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	606 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	- 15.3° (c, 0.25 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	32.4 min (Standard-Gradient)



Die Substanz wurde mittels semi-präparativer HPLC aus dem Ethylacetatextrakt von *Fusarium incarnatum* isoliert. Durch Abgleich des aufgezeichneten UV-Spektrums mit der internen UV/Vis-Spektrenbibliothek wurde sie als Fusapyron identifiziert. Das UV-Spektrum zeigte charakteristische Maxima bei 244 und 292 nm. Mit Hilfe der ESI-Massenspektroskopie konnte das Molekulargewicht von 606 g/mol bestimmt werden. Zur Bestätigung der Struktur wurden das  $^1\text{H-NMR}$ - sowie das COSY-Spektrum herangezogen und die NMR-Daten mit den aus der Literatur entnommenen Werten verglichen (Evidente, *et al.* 1994; Hiramatsu *et al.*, 2006).

Das in  $\text{DMSO-d}_6$  gemessene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte die Anwesenheit von sechs Methylgruppen (0.81, 0.85, 0.94, 1.04, 1.60 und 1.68 ppm). Noch im aliphatischen Bereich wurde eine Anzahl von Protonensignalen (H-22 bis H-28) detektiert, die auf eine lange Seitenkette hindeuteten. Mit Hilfe des COSY-Spektrums konnte die Position dieser Protonen in der Seitenkette bestätigt werden, hierfür waren die Korrelationen von H<sub>2</sub>-28 zu H<sub>3</sub>-29, H<sub>3</sub>-35 zu H-23, H<sub>3</sub>-34 zu H-20, H<sub>2</sub>-22 zu H-23, sowie H<sub>3</sub>-32 zu H-18 von Bedeutung. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen H-15 (5.50 ppm), H-16 (6.14 ppm), H-18 (5.27 ppm) und H-20 (5.03 ppm) wiesen auf mehrere Doppelbindungssysteme hin. Die aus dem COSY-Spektrum entnommenen Korrelationen von H-15 zu H-14 und H-16 sowie von H-18 zu H-19 und H-20 bestätigten die Anordnung des Doppelbindungssystems und die weitere Abfolge der Seitenkette. Weiterhin deuteten die Tieffeldverschiebungen der Protonen H-7 (4.15 ppm), H-8 (3.86 ppm), H-9 (3.38 ppm) und H-11 (3.34 ppm) auf ihre Nähe zu Sauerstoffsubstituenten hin. Aus dem COSY-Spektrum war zu entnehmen, dass diese Protonen zum Spin-System einer C-glykosylisch gebundenen 4-Desoxyhexose gehörten. Die Übereinstimmung der spektroskopischen Daten mit den in der Literatur beschriebenen Daten führte zur Bestätigung der Substanz als Fusapyron (Evidente, *et al.* 1994; Hiramatsu *et al.*, 2006).

Fusapyron wurde zunächst als  $\alpha$ -Pyron beschrieben (Evidente *et al.*, 1994), ihre Struktur später (Hiramatsu *et al.*, 2006) zu  $\gamma$ -Pyron revidiert, als mit Neofusapyron ein weiteres Derivat isoliert wurde, das von der Struktur her dem ursprünglichen Fusapyron entsprach, das aber deutlich andere  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten aufwies.

Tabelle 17. NMR-Daten von Fusapyron und Neofusapyron

Position	Neofusapyron $\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in MeOD, 400) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in MeOD, 500 MHz) <sup>2</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in DMSO- $d_6$ , 500 MHz)	COSY (H→H)
5	6.07, s	5.82, s	5.38, s	-
7	4.48, d (9.7)	4.50, d (9.3)	4.15, d (9.8)	8
8	4.12, t (9.7)	4.12, dd (9.5, 9.3)	3.86, t (9.1)	7, 9, 11
9	3.59-3.68, m <sup>a</sup>	3.65, m	3.38, m	8, 10B
10A	1.85-1.94, m	1.90, m	1.90, m	12
10B	1.59-1.61, m <sup>b</sup>	1.70, m	1.71, m	9
11	3.59-3.68, m <sup>a</sup>	3.51, m	3.34, m	8
12	3.59-3.68, m <sup>a</sup>	3.65, m	3.30, m	10A
14	4.37, d (7.2)	4.37, d (7.2)	4.18, d (6.3)	15
15	5.58, dd (15.6, 7.2)	5.60, dd (15.5, 7.2)	5.50, dd (15.6, 6.1)	14, 16
16	6.26, d (15.6)	6.26, d (15.5)	6.14, dd (15.4, 10.1)	15
18	5.29, d (9.2)	5.31, bd (9.3)	5.27, d (9.1)	19, 32
19	3.47-3.53, m	3.51, m	3.37, m	18, 20
20	5.04, d (9.0)	5.05, bd (9.3)	5.03, dd (13.7, 9.4)	19, 34
22	A 2.05, dd (13.3, 6.5) B 1.92, dd (13.3, 8.0)	A 2.07, dd (13.4, 6.5) B 1.93, dd (13.4, 8.0)	1.90, m	23
23	1.59-1.61, m <sup>b</sup>	1.65, m	1.56, m	22, 35
24	A 1.10-1.19, m B 1.27-1.33 <sup>c</sup>	1.30, m <sup>c</sup>	1.13-1.33, m <sup>c</sup>	-
25	1.27-1.33 <sup>c</sup>	1.30, m <sup>c</sup>	1.13-1.33, m <sup>c</sup>	-
26	1.27-1.33 <sup>c</sup>	1.30, m <sup>c</sup>	1.13-1.33, m <sup>c</sup>	-
27	1.27-1.33 <sup>c</sup>	1.30, m <sup>c</sup>	1.13-1.33, m <sup>c</sup>	-
28	1.27-1.33 <sup>c</sup>	1.30, m <sup>c</sup>	1.23, m	29
29	0.89, t (6.5)	0.90, t (7.0)	0.85, t (7.2)	28
30	1.11, s	1.12, s <sup>d</sup>	1.04, s <sup>d</sup>	-
31	1.19, s	1.20, s <sup>d</sup>	0.94, s <sup>d</sup>	-
32	1.67, s	1.78, d (1.3)	1.68, s	18
33	3.33-3.43, m	3.3, m	3.21, m	34
34	1.77, s	1.68, d (1.5)	1.60, s	20, 33
35	0.86, d (6.5)	0.87, d (6.6)	0.81, t (6.1)	23

<sup>1</sup>Hiramatsu *et al.*, 2006 <sup>2</sup>Evidente. *et al.*, 1994 <sup>a,b,c</sup> Signalüberlappung <sup>d</sup> austauschbare Signale

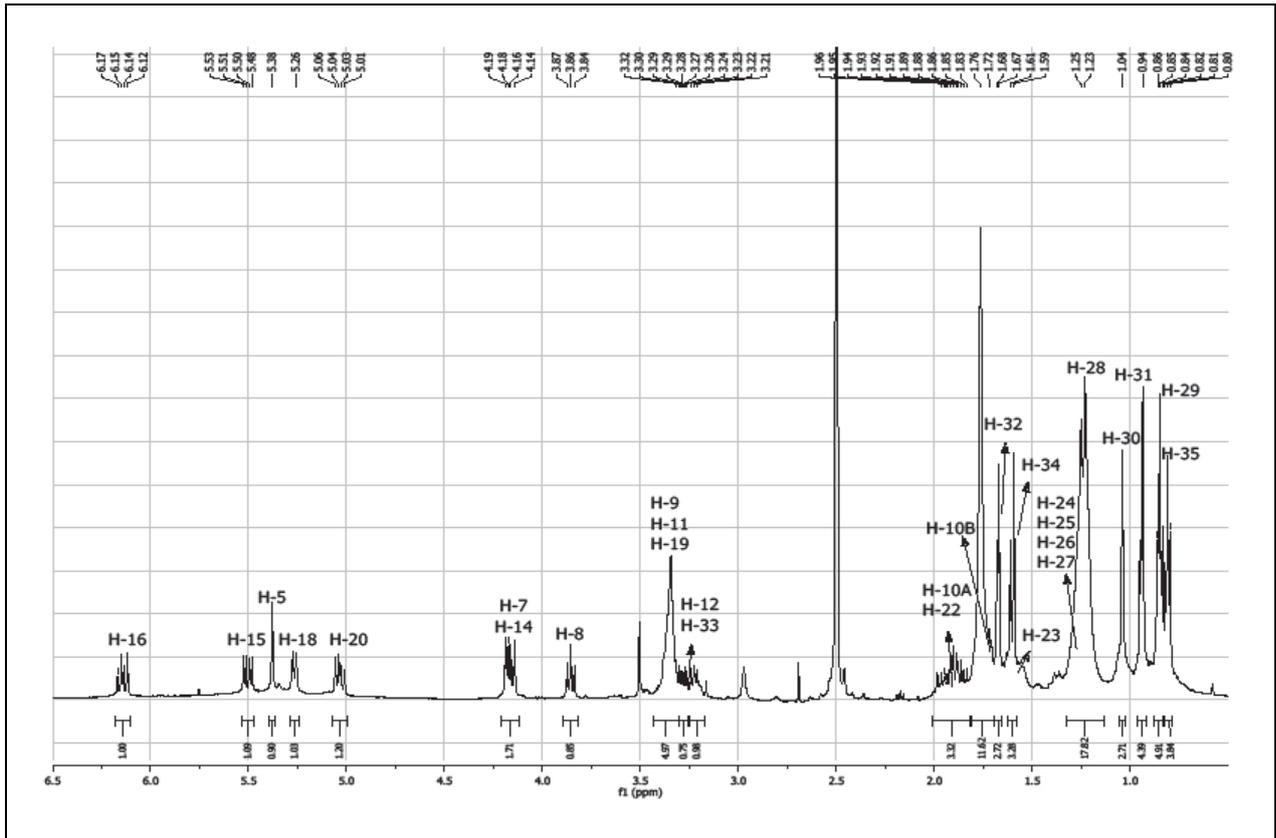


Abb. 43.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Fusapyron, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

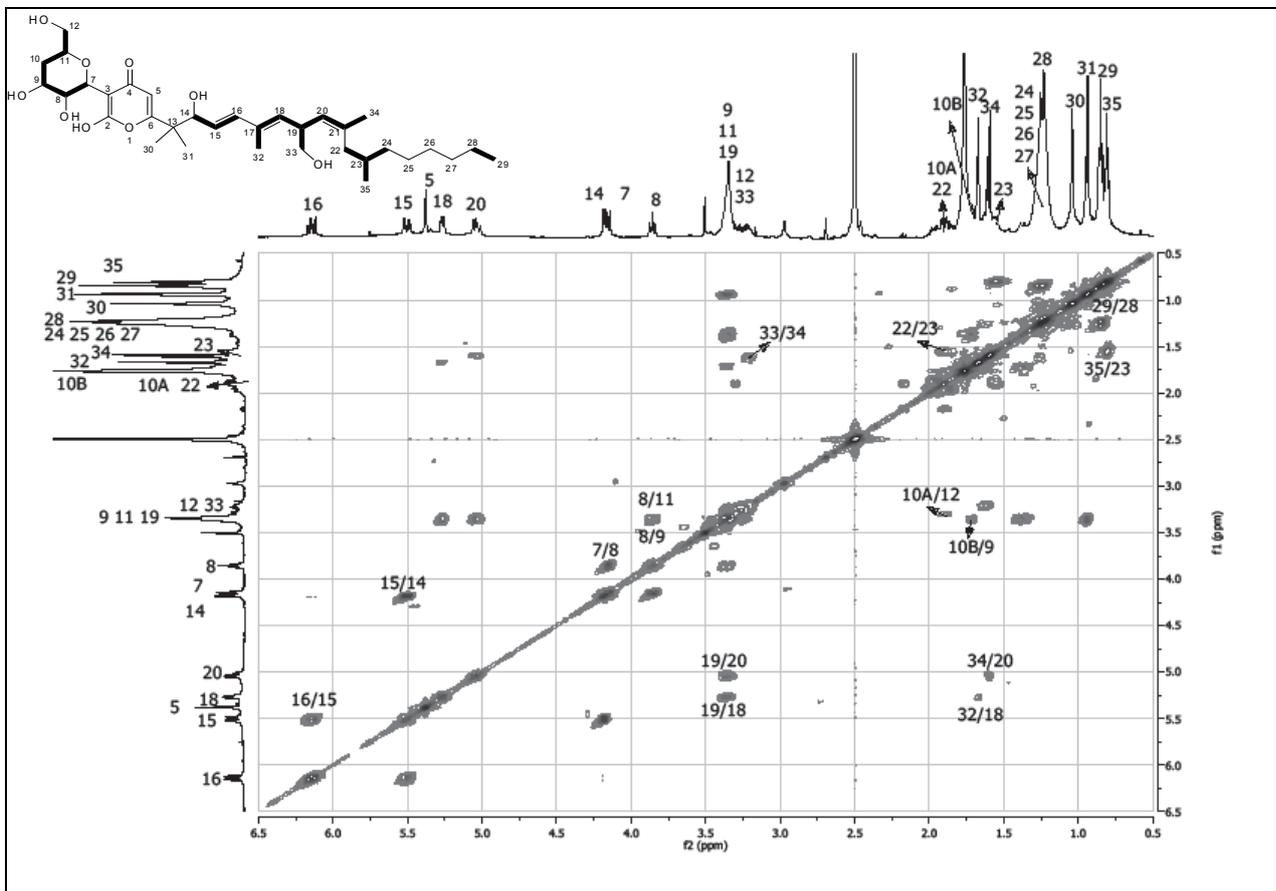
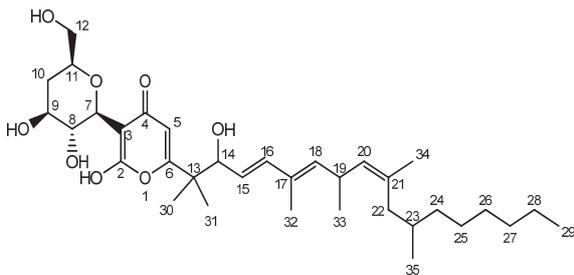
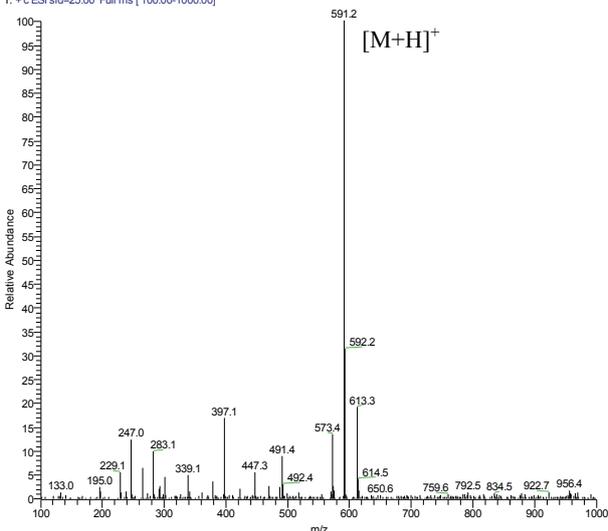
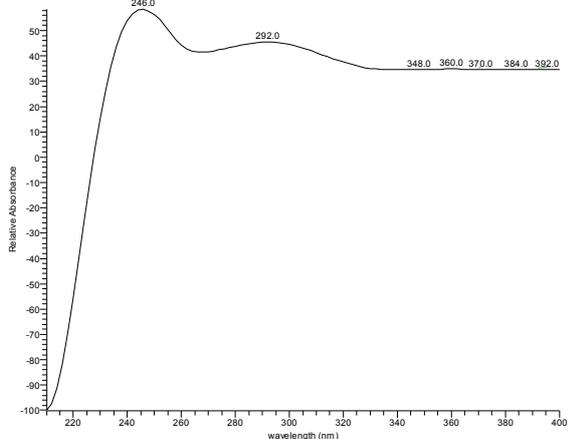
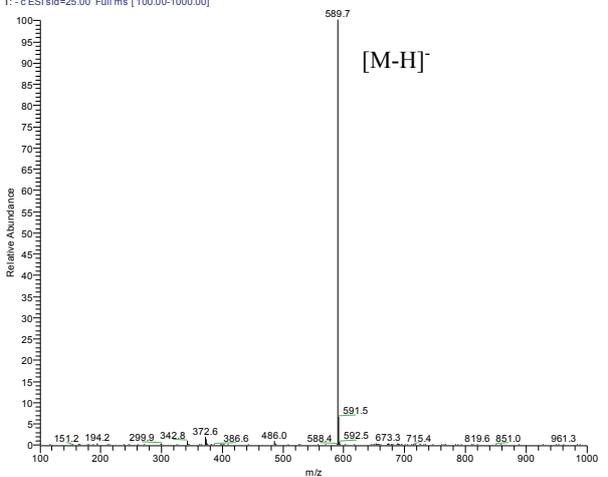


Abb. 44. COSY-Spektrum von Fusapyron, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

## 3.5.2 Desoxyfusapyron

<b>DESOXYFUSAPYRON</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-(Tetrahydro-3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-2-yl)-4-hydroxy-6-((4E,6E,9Z)-3-hydroxy-2,6,8,10,12-pentamethyloctadeca-4,6,9-trien-2-yl)-2H-pyran-2-on
<b>Probencode:</b>	MGC-1.3EE-PD
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Fusarium incarnatum</i> (aus <i>Heritiera littoralis</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	0.6 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>34</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	590 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	± 0° (c, 0.01 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	35.3 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b>  <small>deia204 #1289 RT: 36.20 AV: 1 NL: 4.09E7  T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 
<p><b>UV-Spektrum</b>  <small>deia204 #5408 RT: 36.30 AV: 1 NL: 2.92E5 microAU</small></p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b>  <small>deia204 #1291 RT: 36.25 AV: 1 NL: 2.54E7  T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 

Desoxyfusapyron wurde zusammen mit Fusapyron mittels semi-präparativer HPLC aus dem EtOAc-Extrakt von *F. incarnatum* isoliert und bereits anhand der ESI-Massenspektren und UV-Spektren durch Vergleich mit der authentischen Reinsubstanz (Teuscher, 2005) identifiziert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 246 und 292 nm. Das über ESI-MS bestimmte Molekulargewicht von 509 Daltons wies im Vergleich zu Fusapyron eine Massendifferenz von  $m/z = 16$  auf, was den Verlust einer OH-Gruppe widerspiegelte. Das wurde auch durch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt, das eine Methyl-Gruppe an der Position H-33 (1.00 ppm) zeigte. Die spektroskopische Daten wurden mit den Literaturwerten verglichen und zeigten eine gute Übereinstimmung. Desoxyfusapyron wurde ebenso wie Fusapyron (siehe 3.5.1.) zuerst als  $\alpha$ -Pyrone beschrieben (Evidente *et al.*, 1994) bis in 2010 durch die Isolierung des neuen Derivates Desoxyneofusapyron ihre  $\gamma$ -Pyronstruktur bestätigt wurde (Honma *et al.*, 2010).

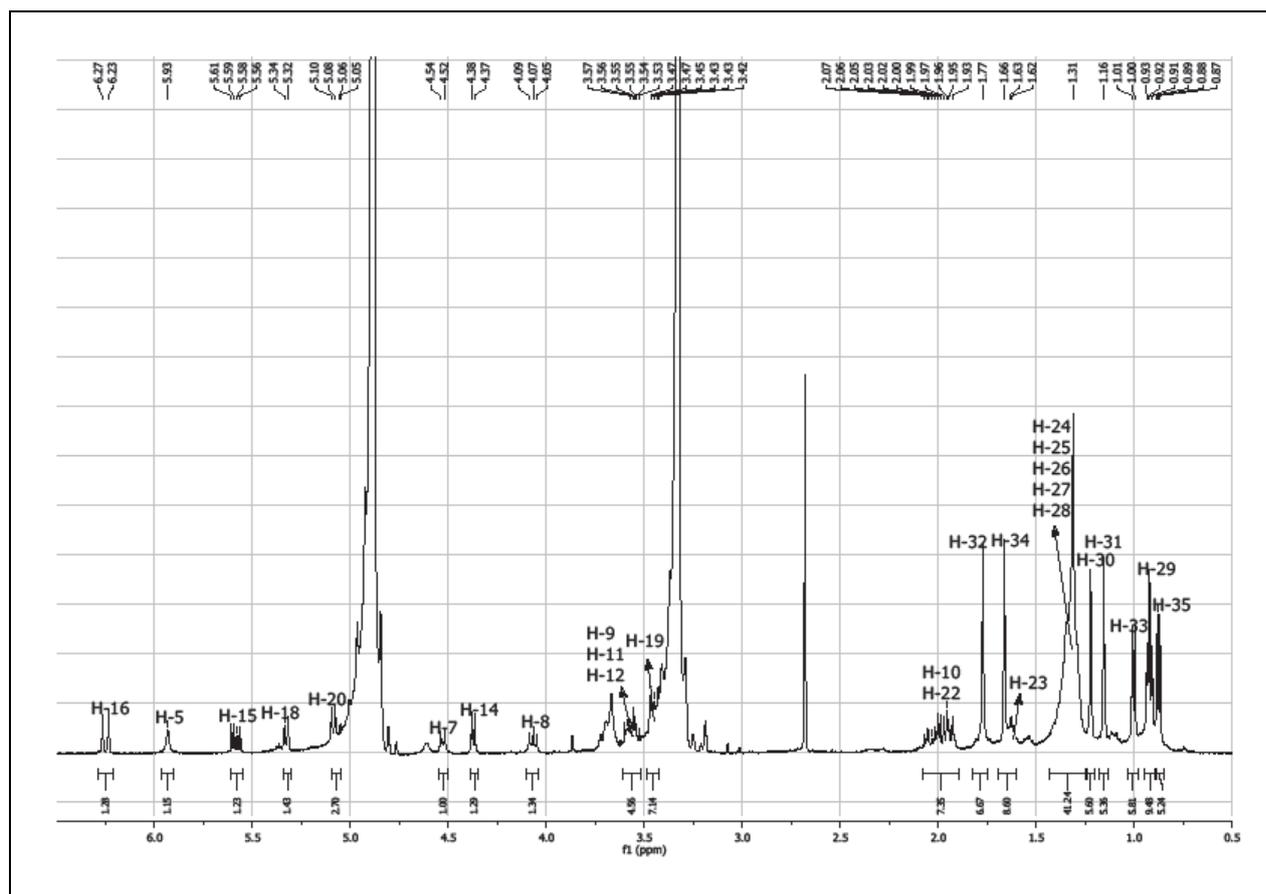


Abb. 45.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Desoxyfusapyron, gemessen in MeOD (500 MHz)

Tabelle 18. NMR-Daten von Desoxyfusapyron

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in MeOD, 500 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in MeOD, 500 MHz)
5	5.82, s	5.93, s
7	4.48, d (9.3)	4.53, d (9.5)
8	4.16, dd (9.5, 9.3)	4.07, t (9.5)
9	3.65, m	3.52-3.60, m <sup>a</sup>
10A 10B	1.90, m 1.70, m	1.89-2.08, m <sup>b</sup>
11	3.55, m	3.52-3.60, m <sup>a</sup>
12	3.65, m	3.52-3.60, m <sup>a</sup>
14	4.37, d (7.2)	4.37, d (7.3)
15	5.56, dd (15.5, 7.2)	5.59, dd (15.4, 7.3)
16	6.22, d (15.5)	6.26, d (15.8)
18	5.29, bd (9.3)	5.33, d (9.1)
19	3.41, m	3.44, m
20	5.06, bd (9.3)	5.09, d (9.1)
22	A 2.05, dd (13.4, 6.5) B 1.90, dd (13.4, 8.0)	1.89-2.08, m <sup>b</sup>
23	1.65, m	1.62, m
24	1.30, m <sup>a</sup>	1.24-1.44, m <sup>c</sup>
25	1.30, m <sup>a</sup>	1.24-1.44, m <sup>c</sup>
26	1.30, m <sup>a</sup>	1.24-1.44, m <sup>c</sup>
27	1.30, m <sup>a</sup>	1.24-1.44, m <sup>c</sup>
28	1.30, m <sup>a</sup>	1.24-1.44, m <sup>c</sup>
29	0.90, t (7.0)	0.92, t (6.8)
30	1.12, s <sup>b</sup>	1.22, s <sup>d</sup>
31	1.19, s <sup>b</sup>	1.16, s <sup>d</sup>
32	1.74, d (1.3)	1.77, s
33	0.98, d (6.6)	1.00, d (6.6)
34	1.64, d (1.5)	1.66, s
35	0.85, d (6.6)	0.88, d (6.6)

<sup>1</sup>Evidente *et al.*, 1994<sup>a,b,c</sup> Signalüberlappung<sup>d</sup> austauschbare Signale

## 3.5.3. Equisetin

<b>EQUISETIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	(3Z)-3-((1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-2-((E)-prop-1-nyl)naphthalen-1-yl)(hydroxy)methylene)-5-(hydroxymethyl)-1-methylpyrrolidine-2,4-dion
<b>Probencode:</b>	MGC-1.3MHx-C18-19
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Fusarium incarnatum</i> (aus <i>Heritiera littoralis</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	3.6 mg
<b>Beschreibung:</b>	Farbloses Öl
<b>Summenformel:</b>	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	373 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-250.3° (c, 0.5 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	34.6 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>MGC-1.3MHx-C18-19 #1241 RT: 35.50 Av: 1 NL: 8.82E6 T: +c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>MGC-1.3MHx-C18-19 #5293 RT: 35.38 Av: 1 NL: 3.92E5 microAU</p>	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>MGC-1.3MHx-C18-19 #1243 RT: 35.54 Av: 1 NL: 5.16E7 T: -c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]</p>

Diese Verbindung aus der Familie der Acyl-Tetransäuren wurde mittels Kieselgel-Säulenchromatographie aus einer apolaren Fraktion (90.7 mg) des MeOH-Extraktes des Pilzes *F. incarnatum* Stamm MGC-1.3 gewonnen. Die Substanz wurde aufgrund der UV/Vis-Spektrenbibliothek, des Molekulargewichts sowie übereinstimmender  $^1\text{H-NMR}$ -Daten als Equisetin identifiziert (Phillips *et al.*, 1989). Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 242 und 296 nm. Im ESI-MS wurde bei negativer Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  372 ( $[\text{M-H}]^-$ ) detektiert, so dass sich das Molekulargewicht auf 373 g/mol festlegen ließ.

Das in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte partiell überlappende Resonanzen für vier Vinyl-Protonen bei 5.40 (H-4/H-5) und 5.25 ppm (H-13/H-14), drei Protonen in direkter Nachbarschaft zu einem elektronegativen Substituenten mit chemischen Verschiebungen bei 4.02 (H-6'A), 3.86 (H-6'B) und 3.63 ppm (H-5'), eine N-Methyl-Gruppe bei 3.05 ppm und eine Methyl-Gruppe bei 0.92 ppm (H<sub>3</sub>-16). Bei einer chemischen Verschiebung von 1.97 - 0.91 ppm wurden mehrere überlappende Signale beobachtet, die mit Hilfe der Literaturdaten (Phillips *et al.*, 1989) zugeordnet werden konnten.

Die zusätzliche Übereinstimmung des Drehwertes von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -250.3° (c, 0.5 in  $\text{CHCl}_3$ ) mit dem in der Literatur angegebenen Wert  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -278.0° (c, 0.77 in  $\text{CHCl}_3$ ) machte deutlich, dass es sich auch um identische Stereoisomere handelte (Singh *et al.*, 1998).

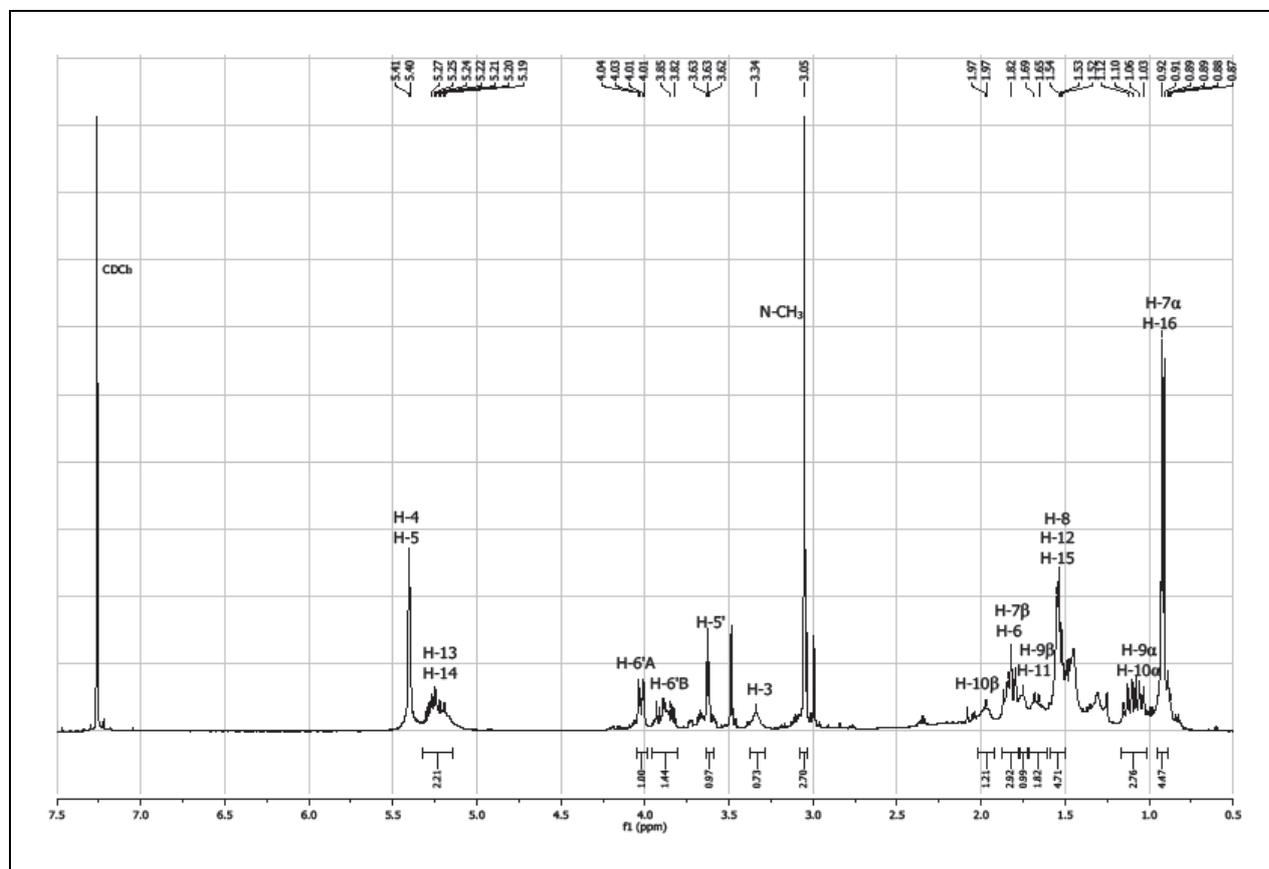


Abb. 46.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Equisetin, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

Tabelle 19. NMR-Daten von Equisetin

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz bei -20 °C) <sup>1</sup>	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)
<b>3</b>	3.32, bd (9.0), eq	3.34, m
<b>4</b>	5.40, bs <sup>a</sup>	5.40, bs <sup>a</sup>
<b>5</b>	5.40, bs <sup>a</sup>	5.40, bs <sup>a</sup>
<b>6</b>	1.84, bt (12.0), ax	1.83, m <sup>b</sup>
<b>7<math>\alpha</math></b>	0.90, q (12.0), ax	0.91, m
<b>7<math>\beta</math></b>	1.81, bd (12.0) eq	1.83, m <sup>b</sup>
<b>8</b>	1.48, m, ax	1.53, m <sup>c</sup>
<b>9<math>\alpha</math></b>	1.11, q (12.0), ax	1.10, m <sup>d</sup>
<b>9<math>\beta</math></b>	1.76, bd (12.0), eq	1.75, m
<b>10<math>\alpha</math></b>	1.04, q (12.0), ax	1.10, m <sup>d</sup>
<b>10<math>\beta</math></b>	1.96, bd (12.0), eq	1.97, m
<b>11</b>	1.66, bt (11.0), ax	1.67, m
<b>12</b>	1.46, s	1.53, m <sup>c</sup>
<b>13</b>	5.17, dd (15.0, 9.0)	5.25, m <sup>e</sup>
<b>14</b>	5.25, dq (6.5, 15.0)	5.25, m <sup>e</sup>
<b>15</b>	1.56, d (6.5)	1.53, m <sup>c</sup>
<b>16</b>	0.92, d (6.5)	0.92, d (6.6)
<b>5'</b>	3.67, dd (3.5, 5.0)	3.63, t (4.4)
<b>6'A</b>	4.07, dd (12.0, 3.5)	4.02, dd (11.4, 3.8)
<b>6'B</b>	3.90, dd (12.0, 5.0)	3.86, m
<b>7'</b>	3.07, s	3.05, s
<b>OH-1</b>	17.3, s	-

<sup>1</sup> Phillips *et al.*, 1989<sup>a,b,c,d,e</sup> Signalüberlappung

### 3.6. Inhaltsstoffe aus *Neurospora terricola* (MGC-5.1)

Der Pilzstamm MGC-5.1 aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Bruguiera gymnorhiza* wurde als *Neurospora terricola* identifiziert. Aus dem EtOAc-Extrakt (149.5 mg) wurden mittels semi-preparativer HPLC drei Verbindungen isoliert. Es handelt sich um die miteinander verwandten Substanzen Diaportinsäure, Diaportinol und 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol. Letztere Substanz stellt einen neuen Naturstoff dar. Die Strukturen dieser Isocoumarine konnten mittels ESI-MS,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR sowie COSY, HMBC und ROESY festgelegt werden.

Des Weiteren wurden Dichlordiaportin, Indol-3-carbaldehyd und p-Hydroxybenzaldehyd bereits anhand der UV-Spektren und ESI-Massenspektren (siehe Anhang) im EtOAc-Extrakt identifiziert. Alle drei Substanzen wurden im Rahmen anderer Doktorarbeit in unserem Arbeitskreis bereits isoliert. Dichlordiaportin, das erstmals aus *Penicillium nalgiovense* isoliert wurde (Larsen und Breinholt, 1999), wurde in unserer Arbeitsgruppe von Hassan (2007) aus dem endophytischen Pilz *Ampelomyces* sp. gewonnen. Indol-3-carbaldehyd wurde von Ibrahim (2005) aus dem Schwamm *Diacarnus megaspinorhabdosa* und von Diesel (2009) aus dem Pilz *Nodulisporium* sp. erhalten. Das p-Hydroxybenzaldehyd wurde von Effendi (2004) aus *Verticillium cf cinnabarium* und *Lecanicillium evansii* sowie von Diesel (2009) aus einem nicht identifizierbaren Pilz AB2-1 isoliert.

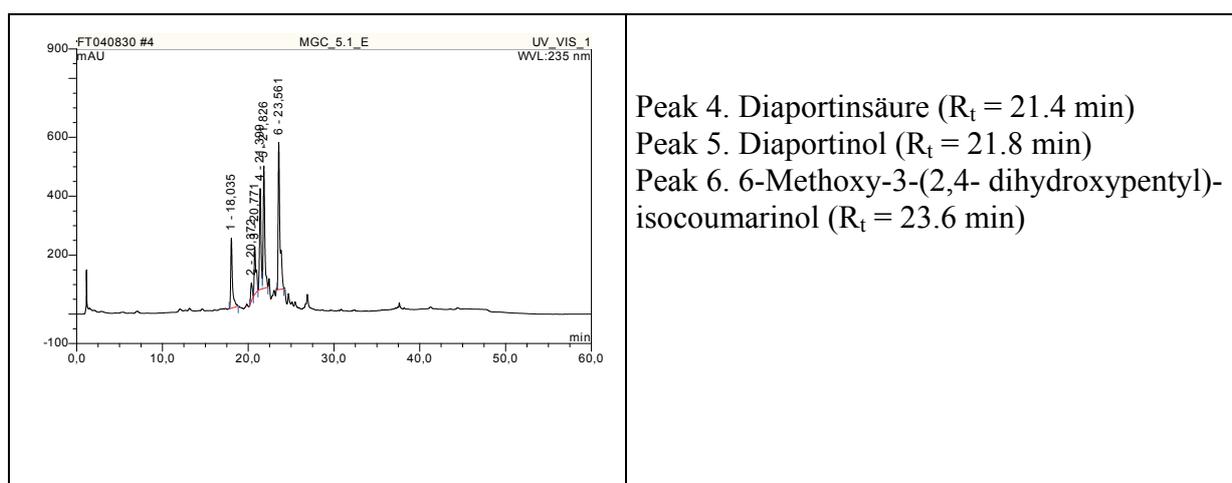
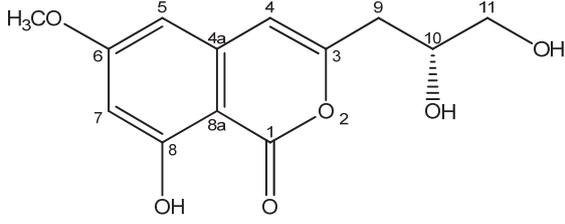
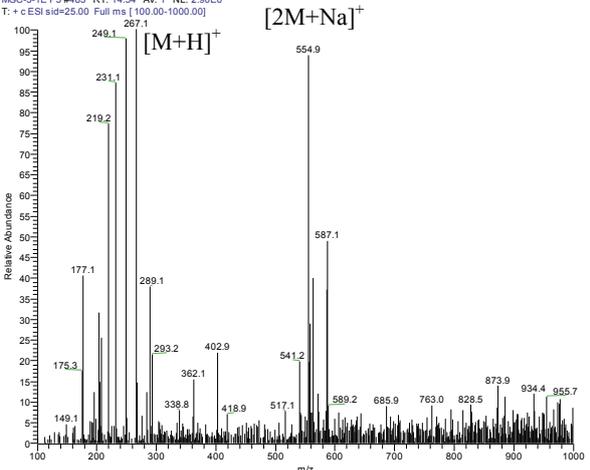
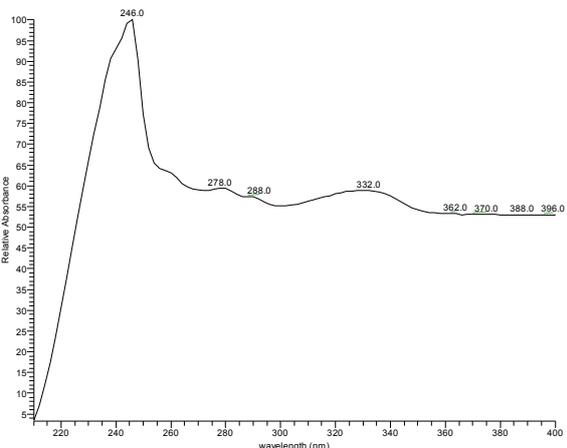
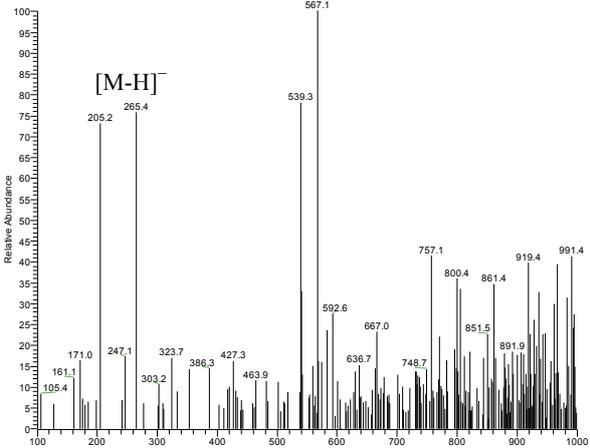


Abb. 47. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Neurospora terricola*

## 3.6.1. Diaportinol

<b>DIAPORTINOL</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	8-Hydroxy-3-(2,3-dihydroxypropyl)-6-methoxy-1H-isochromen-1-on
<b>Probencode:</b>	MGC-5.1E-P5
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora terricola</i> (aus <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.2 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	266 g/mol
<b>Drehwert <math>[\alpha]_D^{20}</math>:</b>	+36.9° (c, 0.1 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	22.2 min (Standard-Gradient)
 <p>The chemical structure of Diaportinol is shown as a 1H-isochromen-1-one derivative. It features a benzene ring fused to a pyrone ring. The benzene ring has a methoxy group (H<sub>3</sub>CO-) at position 6 and a hydroxyl group (-OH) at position 8. The pyrone ring has a carbonyl group (=O) at position 1 and a 2,3-dihydroxypropyl side chain at position 3. The side chain consists of a propyl chain with hydroxyl groups at positions 10 and 11. The positions on the benzene ring are numbered 5, 6, 7, and 8. The positions on the pyrone ring are numbered 1, 2, 3, 4, and 4a. The positions on the side chain are numbered 9, 10, and 11.</p>	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>MGC-5-1E P5 #483 RT: 14.54 AV: 1 NL: 2.90E6 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>The ESI-MS (+) mass spectrum shows relative abundance versus m/z. The base peak is at m/z 554.9, corresponding to the [2M+Na]<sup>+</sup> ion. Other significant peaks are labeled at m/z 177.1, 219.2, 231.1, 249.1, 267.1, 289.1, 293.2, 338.8, 362.1, 402.9, 418.9, 463.9, 517.1, 541.2, 587.1, 589.2, 685.9, 763.0, 828.5, 873.9, 934.4, and 955.7.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>MGC-5-1E P5 #2143 RT: 14.54 AV: 1 NL: 1.91E5 microAU</p>  <p>The UV spectrum shows relative abundance versus wavelength (nm). The maximum absorption is at 246.0 nm. Other labeled peaks are at 278.0, 288.0, 332.0, 362.0, 370.0, 388.0, and 396.0 nm.</p>	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>MGC-5-1E P5 #482 RT: 14.51 AV: 1 NL: 7.12E4 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>The ESI-MS (-) mass spectrum shows relative abundance versus m/z. The base peak is at m/z 567.1, corresponding to the [M-H]<sup>-</sup> ion. Other significant peaks are labeled at m/z 161.1, 195.4, 171.0, 205.2, 247.1, 265.4, 303.2, 323.7, 386.3, 427.3, 463.9, 539.3, 567.1, 592.6, 636.7, 667.0, 748.7, 757.1, 800.4, 851.5, 861.4, 891.9, 919.4, and 991.4.</p>

Die Verbindung wurde aus dem EtOAc-Extrakt von *Neurospora terricola* (Stamm MGC-5.1) mithilfe der semi-preparativen HPLC isoliert. Das Molekulargewicht von 266 g/mol konnte durch ESI-MS anhand eines deutlichen Pseudomolekülionpeaks bei  $m/z$  267  $[M+H]^+$  festgelegt werden. Das UV-Spektrum zeigt Maxima bei 246, 278, 288 und 332 nm. Die Struktur der Substanz ließ sich mithilfe der  $^1\text{H-NMR}$ - und COSY-Spektren festlegen (Tab. 20).

Das in MeOD gemessene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wies zunächst zwei aromatische, *meta*-koppelnde Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 6.48 (H-7) und 6.50 (H-5) ppm auf. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zusätzlich bei 6.48 ppm, entsprechend der Integration, ein Singulett eines Vinylprotons (H-4), das von einem Signal der aromatischen Protonen überlagert wurde. Diese charakteristischen Signale deuten auf einen 3,6,8-trisubstituierten Isocoumarinring hin. Weiterhin ließ das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf das Vorhandensein einer Methoxygruppe (H<sub>3</sub>-6) bei 3.91 ppm sowie von fünf tieffeldverschobenen aliphatischen Protonen (H<sub>2</sub>-9, H-10 und H<sub>2</sub>-11) zwischen 3.56 und 2.55 ppm schließen. Aufgrund der Korrelationen im COSY-Spektrum konnten H-9A, H-9B, H-10 und H<sub>2</sub>-11 dem gemeinsamen Spinsystem einer 2,3-Dihydroxypropyl-Seitenkette zugeordnet werden. Über die long-range-Korrelation von H-9A zu H-4 wurde die Verknüpfung der Seitenkette zu dem Isocoumarinring an die Position 3 gezeigt. Durch den Vergleich der gemessenen optischen Drehung für Diaportinol mit dem Wert von  $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$  (c, 0.07 in  $\text{CHCl}_3$ ) für die analoge Isocoumarine Dichlordiaportin konnte eine *S*-Konfiguration an C-10 festgelegt werden (Larsen und Breinholt, 1999). Weiterhin stimmten die NMR-spektroskopischen Daten überein mit den in der Literatur für Diaportinol angegebenen Werten (Larsen und Breinholt, 1999).

**Tabelle 20. NMR-Daten von Diaportinol**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz)	COSY (H→H)
4	6.46, s	6.48, s <sup>a</sup>	9A
5	6.53, s	6.50, d (2.5)	-
6-OCH <sub>3</sub>	3.91, s	3.88, s	-
7	6.53, s	6.48, d (2.2) <sup>a</sup>	-
9A	2.79, dd (14.7, 3.4)	2.78, dd (14.7, 3.9)	9A, 10
9B	2.56, dd, (14.7, 8.8)	2.55, dd (14.8, 8.8)	4, 9B, 10
10	4.04, m	4.02, m	9A, 9B, 11
11	3.58, d (5.4)	3.56, d (5.4)	10

<sup>1</sup>Larsen und Breinholt, 1999

<sup>a</sup>Signalüberlappung

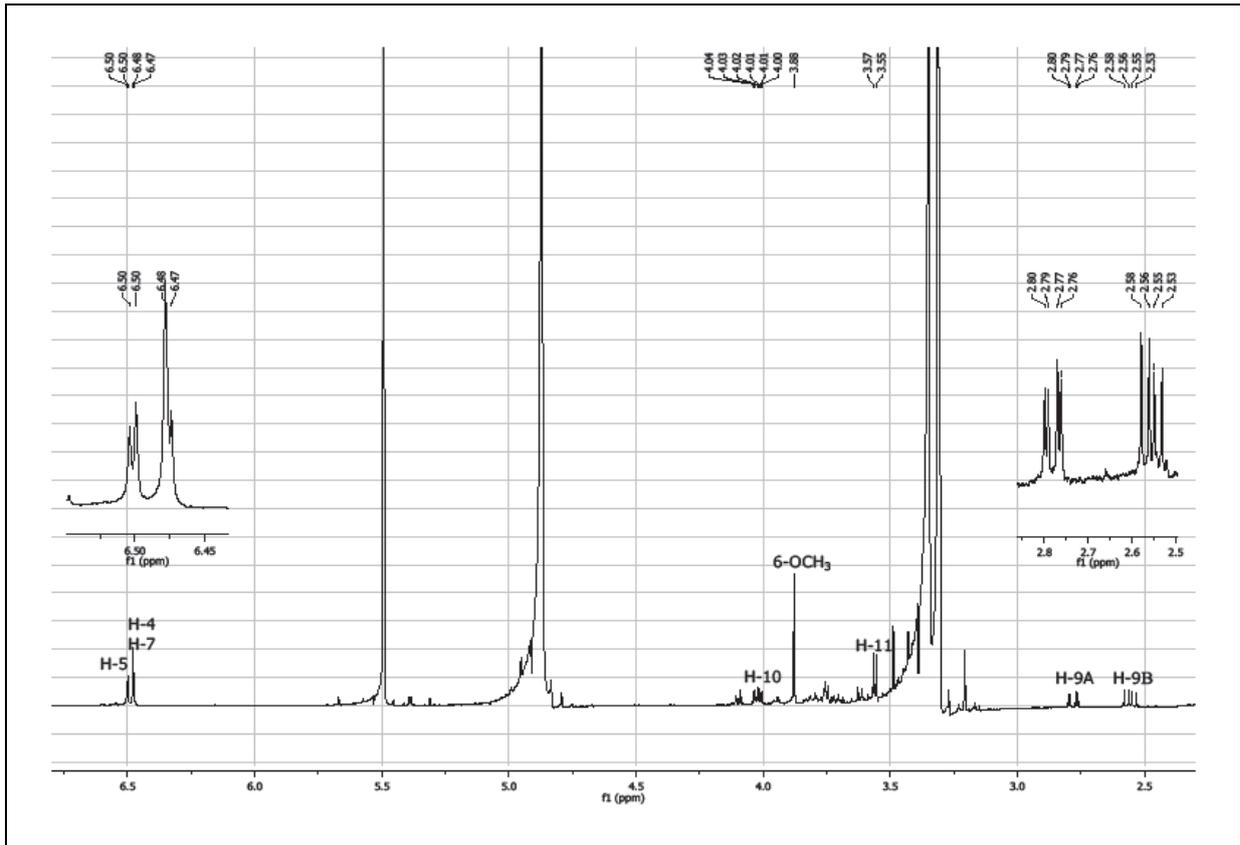


Abb. 48.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Diaportinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

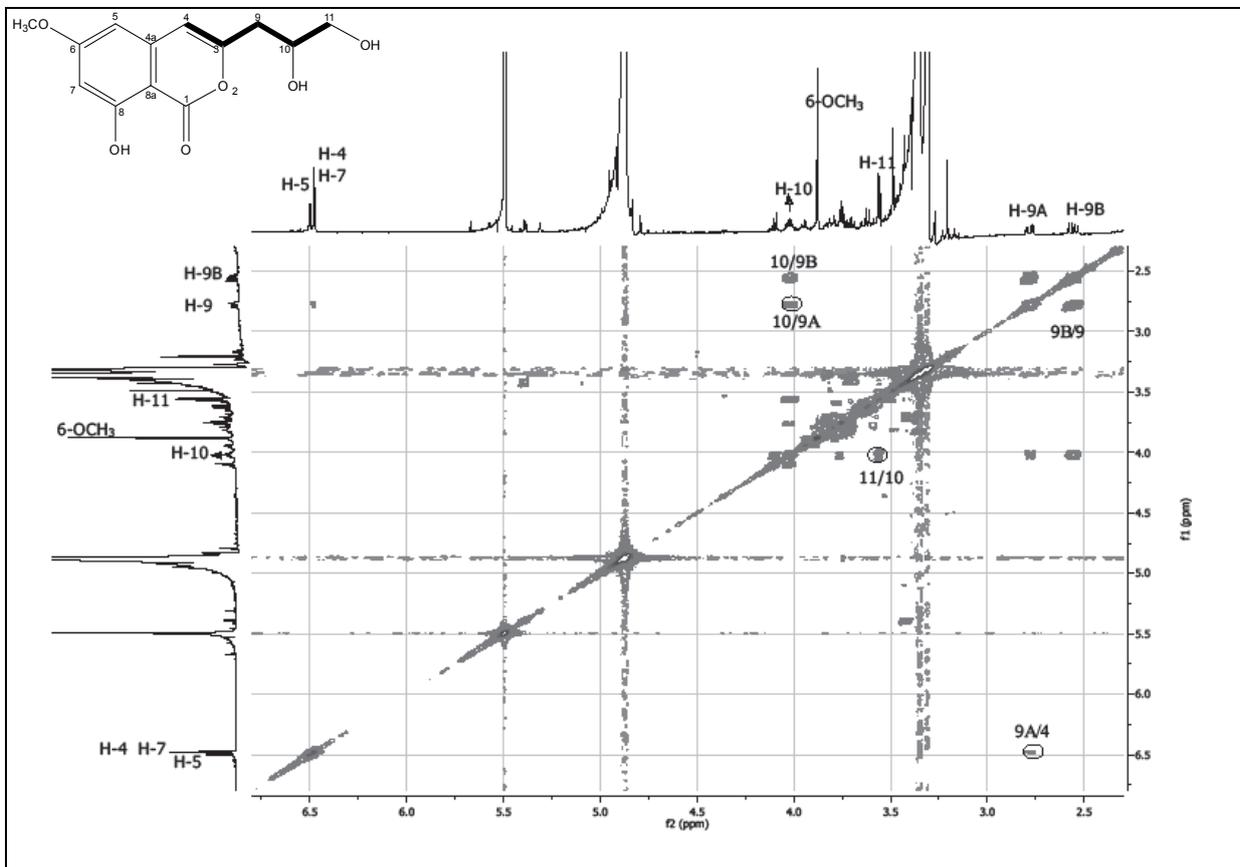
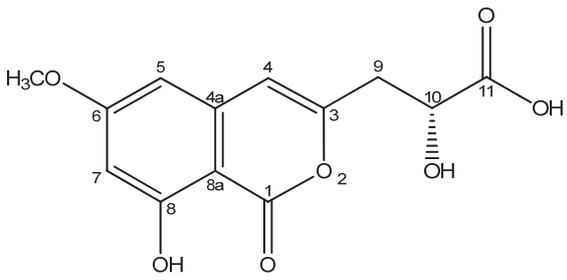
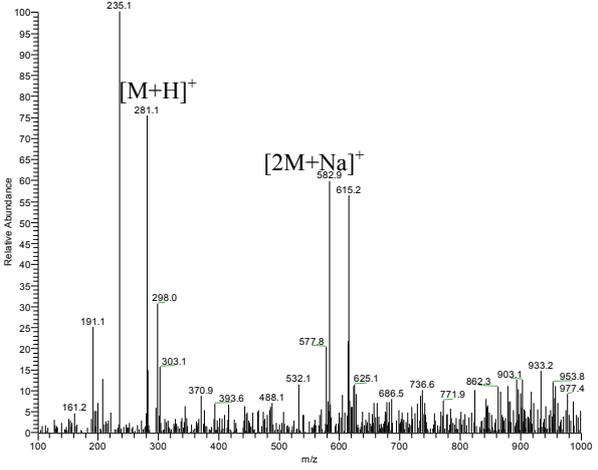
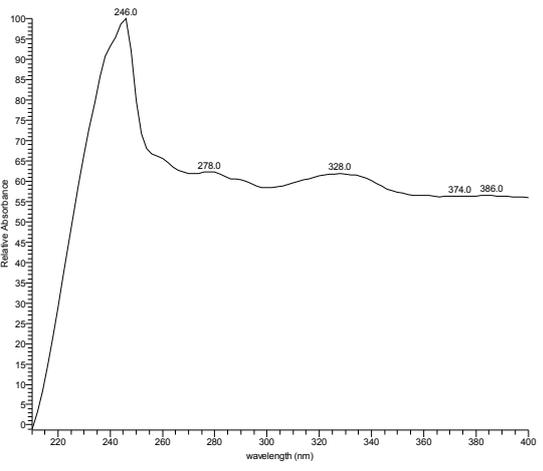
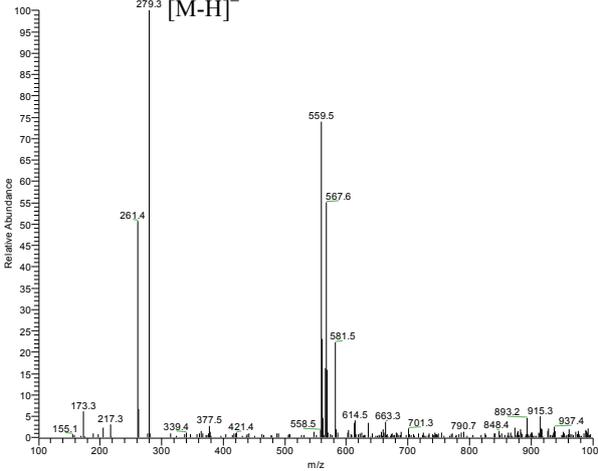


Abb. 49. COSY-Spektrum von Diaportinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

## 3.6.2. Diaportinsäure

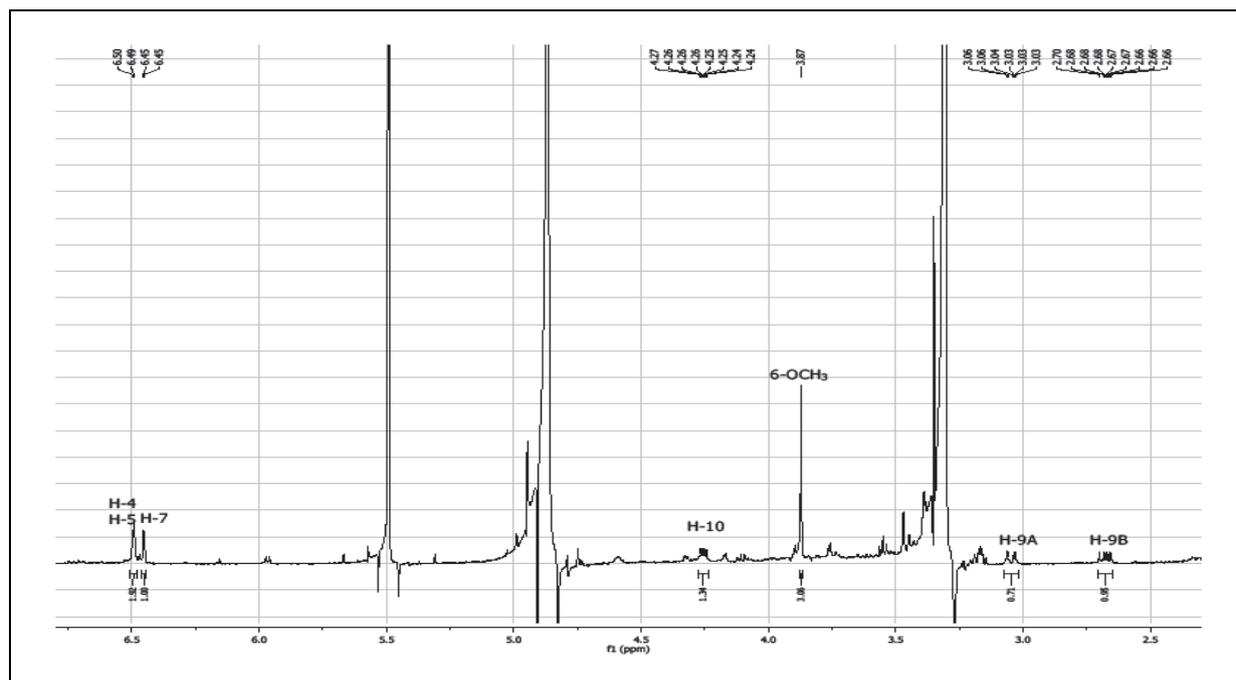
<b>DIAPORTINSÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	(R)-2-Hydroxy-3-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-isochromen-3-yl) propancarbonsäure
<b>Probencode:</b>	MGC-5.1E-P3
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora terricola</i> (aus <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.2 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	280 g/mol
<b>Drehwert</b> $[\alpha]_D^{20}$ :	+45.3° (c, 0.1 in CHCl <sub>3</sub> )
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	22.4 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> <small>MGC-5-1E P3 #498 RT: 14.92 AV: 1 SB: 7 14.72-15.42 NL: 1.82E6 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>MGC-5-1E P3 #2223 RT: 15.07 AV: 1 NL: 1.80E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-)</b> <small>MGC-5-1E P3 #498 RT: 14.96 AV: 1 NL: 1.00E6 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 

Diaportinsäure wurde ebenso aus dem EtOAc-Extrakt von *Neurospora terricola* (Stamm MGC-5.1) mittels semi-preparativer HPLC isoliert. Die Struktur des Moleküls konnte neben Bestimmung des Molekulargewichtes von 280 Da durch ESI-MS mithilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Tab. 21) und durch Vergleich mit den Literaturdaten festgelegt werden (Larsen und Breinholt, 1999). Die Substanz wies damit eine Massendifferenz von 14 Da gegenüber Diaportinol auf. Die UV-Spektren der beiden Substanzen waren praktisch identisch mit Maxima bei 246, 278 und 328 nm. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen mit den für Diaportinol gemessenen. Lediglich an Position 11 befand sich bei Diaportinsäure eine Carbonylgruppe anstelle der für Diaportinol beschriebenen Methylengruppe, was durch das Fehlen des Signals für H<sub>2</sub>-11 bestätigt werden konnte. Weiterhin zeigte sich das Signal für H-10 (4.26 ppm) der Seitenkette durch die benachbarte Carboxygruppe ins Tieffeld verschoben.

Tabelle 21. NMR-Daten von Diaportinsäure

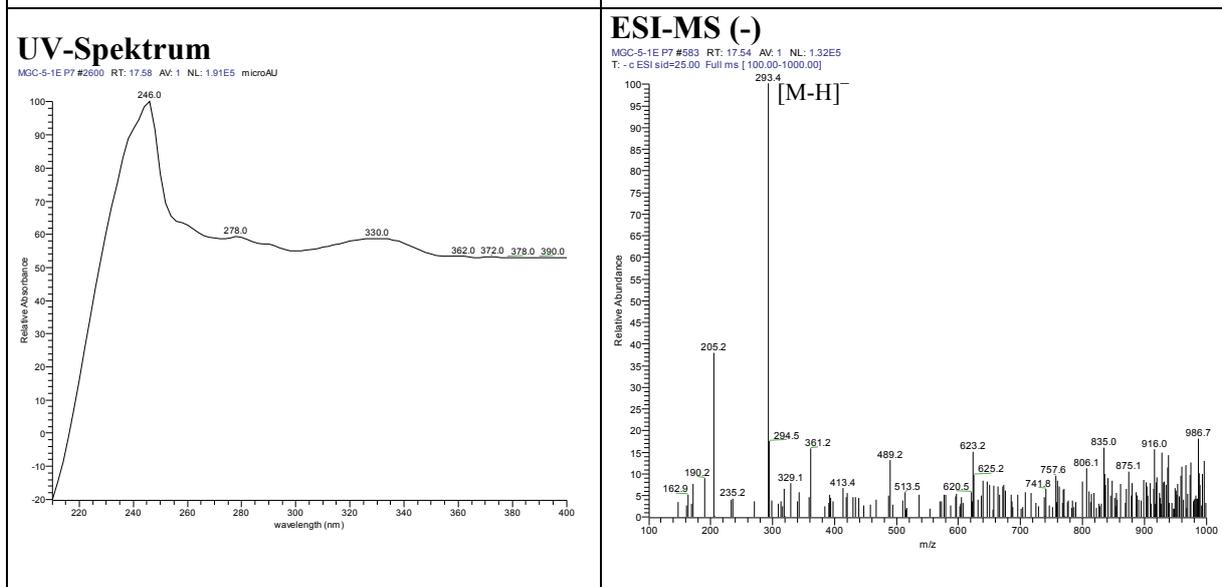
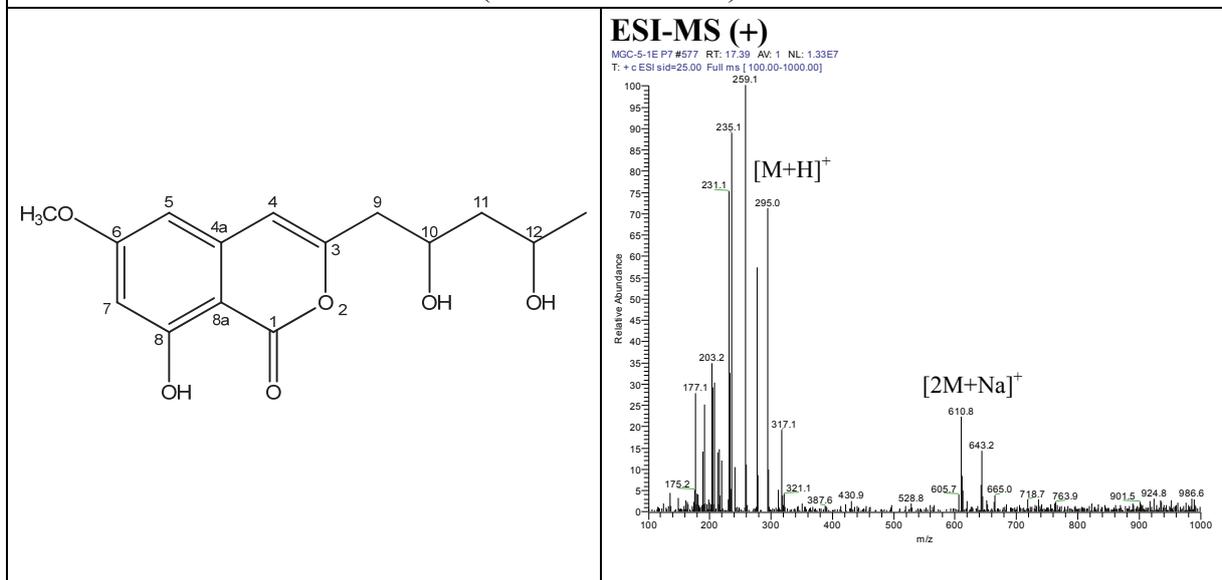
Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (Aceton- $d_6$ , 400 MHz)*	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 500 MHz)
4	6.47, s	6.49, s <sup>a</sup>
5	6.55, s	6.49, d (2.5) <sup>a</sup>
6-OCH <sub>3</sub>	3.91, s	3.87, s
7	6.55, s	6.45, d (2.2)
9A	3.05, m	3.04, m
9B	2.84, m	2.67, m
10	4.54, m	4.26, m

\*Larsen und Breinholt, 1999

<sup>a</sup>SignalüberlappungAbb. 50.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Diaportinsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

### 3.6.3. 8-Hydroxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-6-methoxyisochromen-1-on (neuer Naturstoff)

8-HYDROXY-3-(2,4-DIHYDROXYPENTYL)-6-METHOXY-1H-ISOCHROMEN-1-ON	
<b>Systematischer Name:</b>	8-Hydroxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-6-methoxy-1H-isochromen-1-on
<b>Probencode:</b>	MGC-5.1E-P7
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora terricola</i> (aus <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.7 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	294 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-1.6° (c, 0.25 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	24.5 min (Standard-Gradient)



Dieser neue Naturstoff wurde ebenso wie die anderen Isocoumarine aus dem EtOAc-Extrakt von *Neurospora terricola* (Stamm MGC-5.1) mittels semi-preparativen HPLC isoliert. Eine mögliche strukturelle Verwandtschaft zu Diaportinol und Diaportinsäure ließ bereits das UV-Spektrum mit den Maxima von 246, 278 und 330 nm vermuten. Das hochaufgelöste TOF-Massenspektrum zeigte bei positiver Ionisierung den Basispeak bei  $m/z$  317.1000  $[M+Na]^+$  (berechneter Wert von 317.0996,  $\Delta$  1.2 ppm), so dass sich das Molekulargewicht auf 294 Da und die Summenformel als  $C_{15}H_{18}O_6$  festlegen ließ. Im Vergleich zum Diaportinol stellte die neue Verbindung somit ein Dihomologes dar.

Das in MeOD gemessene  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte im aromatischen Bereich drei Protonen zwischen 6.50 und 6.47 ppm, im aliphatischen Bereich sechs Protonen zwischen 4.15 und 1.60 ppm, eine Methoxygruppe bei 3.88 ppm und eine Methylgruppe bei 1.20 ppm. Die zwei *meta*-koppelnden aromatischen Protonen H-5 (6.50 ppm) bzw. H-7 (6.47 ppm) und das Vinylproton H-4 (6.47 ppm) bildeten einen 3,6,8-trisubstituierten Isocoumarinring, was sich aufgrund ihrer Kopplungskonstanten im  $^1H$ -NMR-Spektrum, sowie der entsprechenden Korrelationen im HMBC bestimmen ließ. Aus den Korrelationen von 6-OCH<sub>3</sub> zu C-6 im HMBC-Spektrum sowie zu H-5 und H-7 im NOE-Spektrum war die Verknüpfung der Methoxygruppe mit dem aromatischen System an der Position 6 zu entnehmen. Mithilfe der Korrelationen im COSY-Spektrum konnten die aliphatischen Protonen H<sub>2</sub>-9, H-10, H<sub>2</sub>-11, H-12 und H<sub>3</sub>-13 dem gemeinsamen Spinsystem einer 2,4-Dihydroxypentyl-Seitenkette zugeordnet werden. Über die long-range-Korrelation von H<sub>2</sub>-9 zu H-4 im HMBC- sowie NOESY-Spektrum wurde die Anordnung der Seitenkette zu dem Isocoumarinring an der Position 3 bestätigt.

Die Verbindung zeigte weitgehende Übereinstimmung der spektroskopischen Daten (s. Tab. 22) mit den aus der Literatur für Citreisocoumarinol entnommenen Werten (Lai *et al.*, 1991). Lediglich an Position 6 befand sich anstelle der für Citreisocoumarinol beschriebenen Hydroxygruppe eine Methoxygruppe. Die optische Drehung wurde mit  $[\alpha]_D^{20}$  -1.6° bestimmt und wich damit von dem Literaturwert von +20.2° für Citreisocoumarinol (Lai *et al.*, 1991) ab. Dies könnte in der geringen Substanzmenge oder einer möglichen Verunreinigung begründet liegen, oder aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die neue Substanz in der absoluten Konfiguration der Seitenkette von der des Citreisocoumarinols abweicht. Da die Seitenkette relativ flexibel sein dürfte, liessen die erhaltenen Korrelationen im NOESY-Spektrum (s. Abb. 55) keine eindeutigen Schlüsse hinsichtlich der relativen Konfiguration der beiden Stereozentren an C-10 und C-12 zu. Aufgrund der sehr geringen vorhandenen Substanzmenge war es nicht möglich, weitere Versuche zur Ermittlung der

absoluten oder relativen Konfiguration der neuen Verbindung (z. B. Mosher-Derivatisierung) vorzunehmen.

**Tabelle 22. NMR-Daten von 8-Hydroxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-6-methoxyisochromen-1-on**

Position	Citreoisocoumarinol $\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 500 MHz)	Diaportinol $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (Aceton- $d_6$ , 100 MHz) <sup>2</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (MeOD, 125 MHz) <sup>3</sup>	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	-	-	167.1	-	-	-
3	-	-	156.7	155.2	-	-
4	6.30, s	6.47, s <sup>a</sup>	106.6	107.3	9A	3, 4, 5, 7, 8a
4a	-	-	140.9	-	-	-
5	6.37, d (2.2)	6.50, d (2.2)	101.9	-	-	5
6	-	-	168.0	168.6	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	-	3.88, s	56.3	56.1	-	6, 6-OCH <sub>3</sub>
7	6.30, d (2.2)	6.47, d (2.2) <sup>a</sup>	101.0	101.9	9A, 9B, 11	8, 8a
8	-	-	164.2	164.9	10	-
8a	-	-	100.6	100.81	-	-
9A	2.69, dd (14.4, 4.4)	2.72, dd (14.7, 4.3)	38.7	-	9B	3, 4, 10
9B	2.55, dd (14.4, 8.3)	2.58, dd (14.7, 8.4)			9A	
10	4.13, m	4.15, m	70.3	68.3	9A, 9B, 11A, 11B	-
11A	1.70, ddd (13.7, 8.3, 7.3)	1.71, m	66.6	46.5	11B	10, 12
11B	1.60, ddd (13.7, 5.4, 4.4)	1.60, m			11A	
12	3.98, m	3.99, m	-	66.9	11A, 13	-
13	1.19, d (5.9)	1.20, d (6.0)	-	23.3	11B	11, 12, 13

<sup>1</sup>Lai *et al.*, 1991  
entnommen

<sup>2</sup>Larsen und Breinholt, 1999  
<sup>a</sup> Signalüberlappung

<sup>3</sup>Werte aus dem HMBC

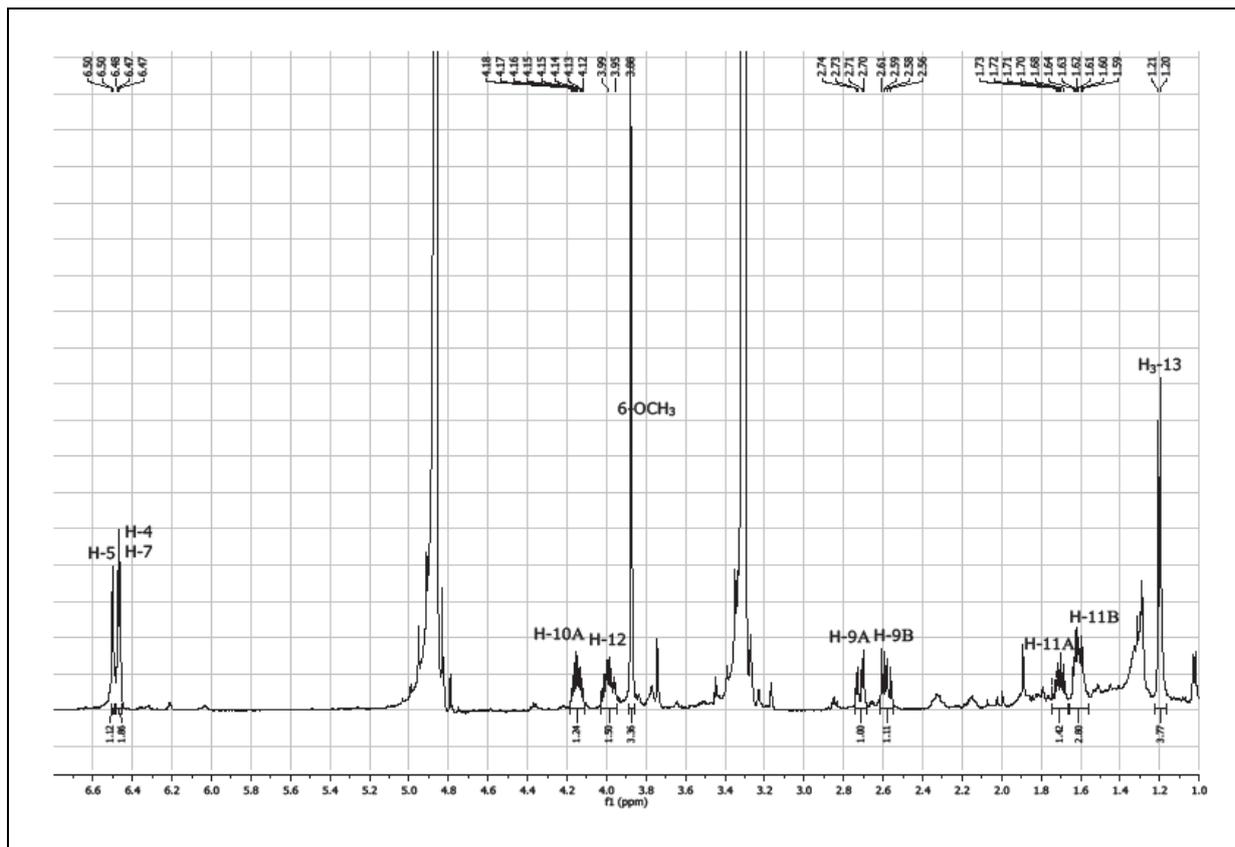


Abb. 51.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

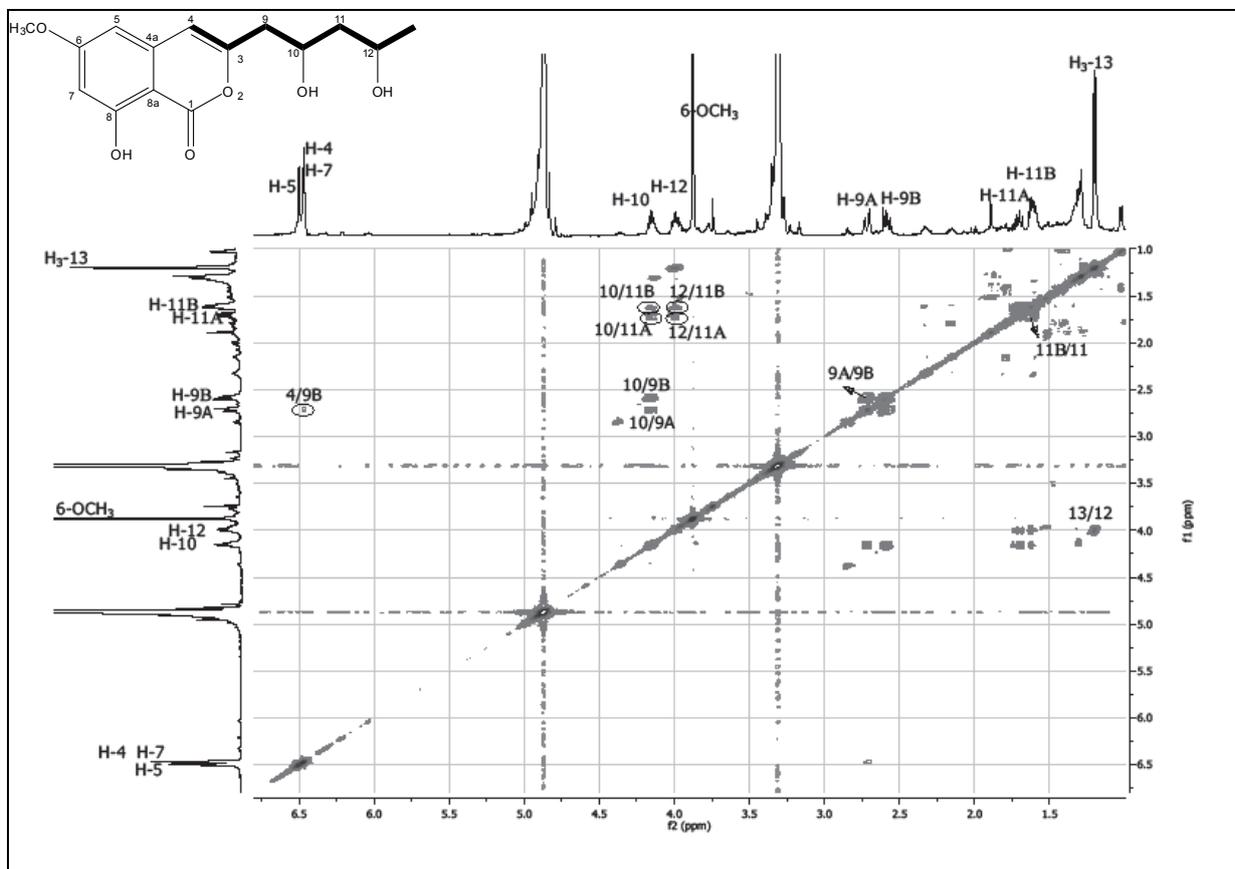


Abb. 52. COSY-Spektrum von 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

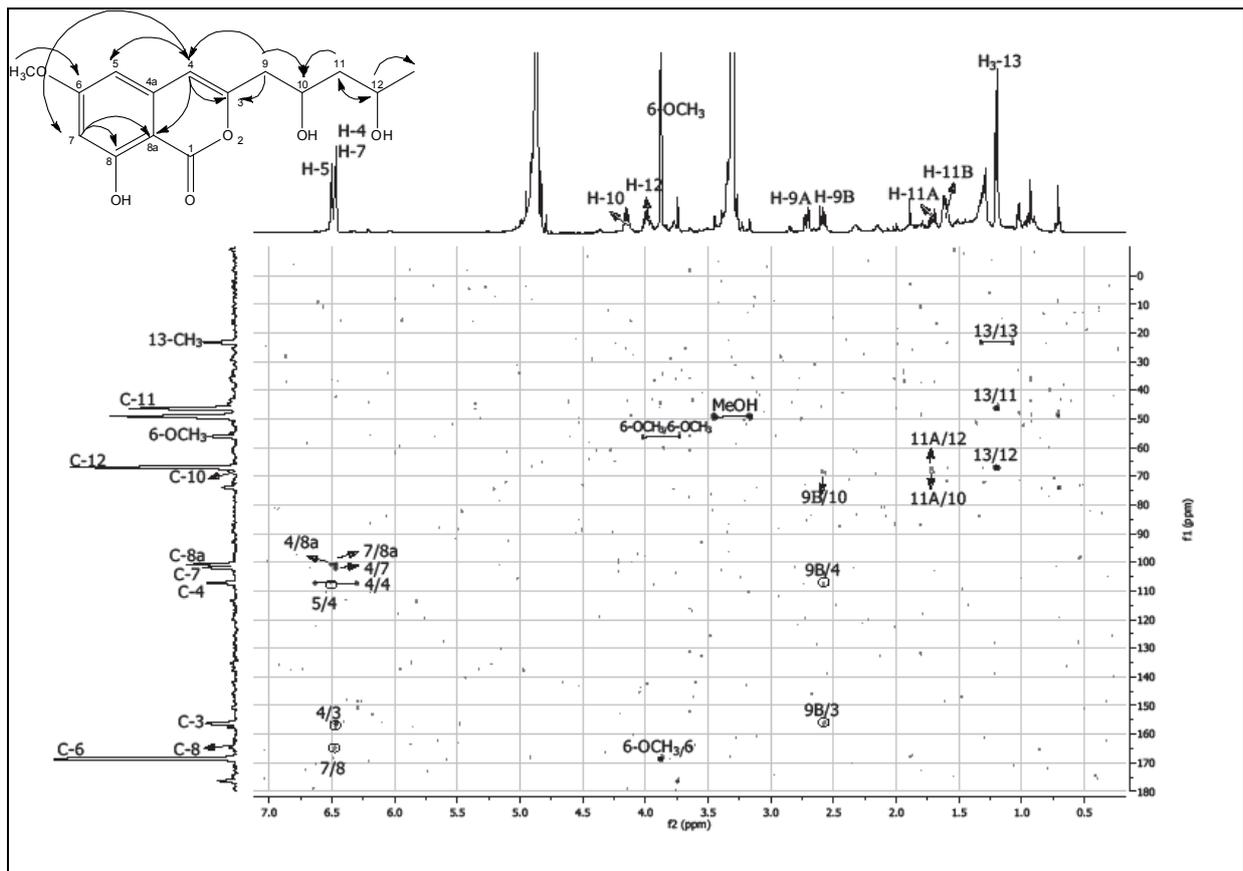


Abb. 53. HMBC-Spektrum von 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

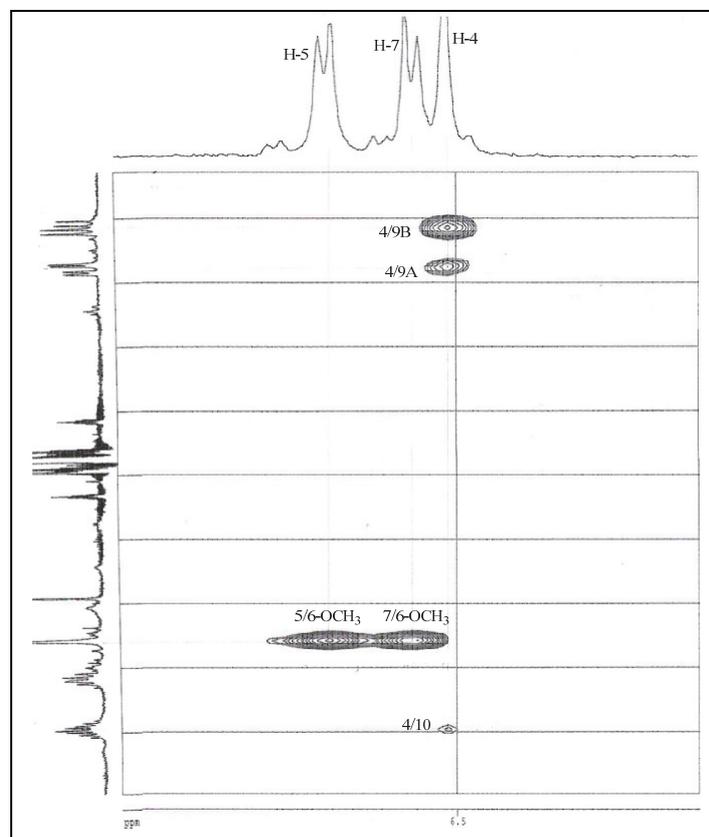


Abb. 54. NOESY-Spektrum von 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (600 MHz)

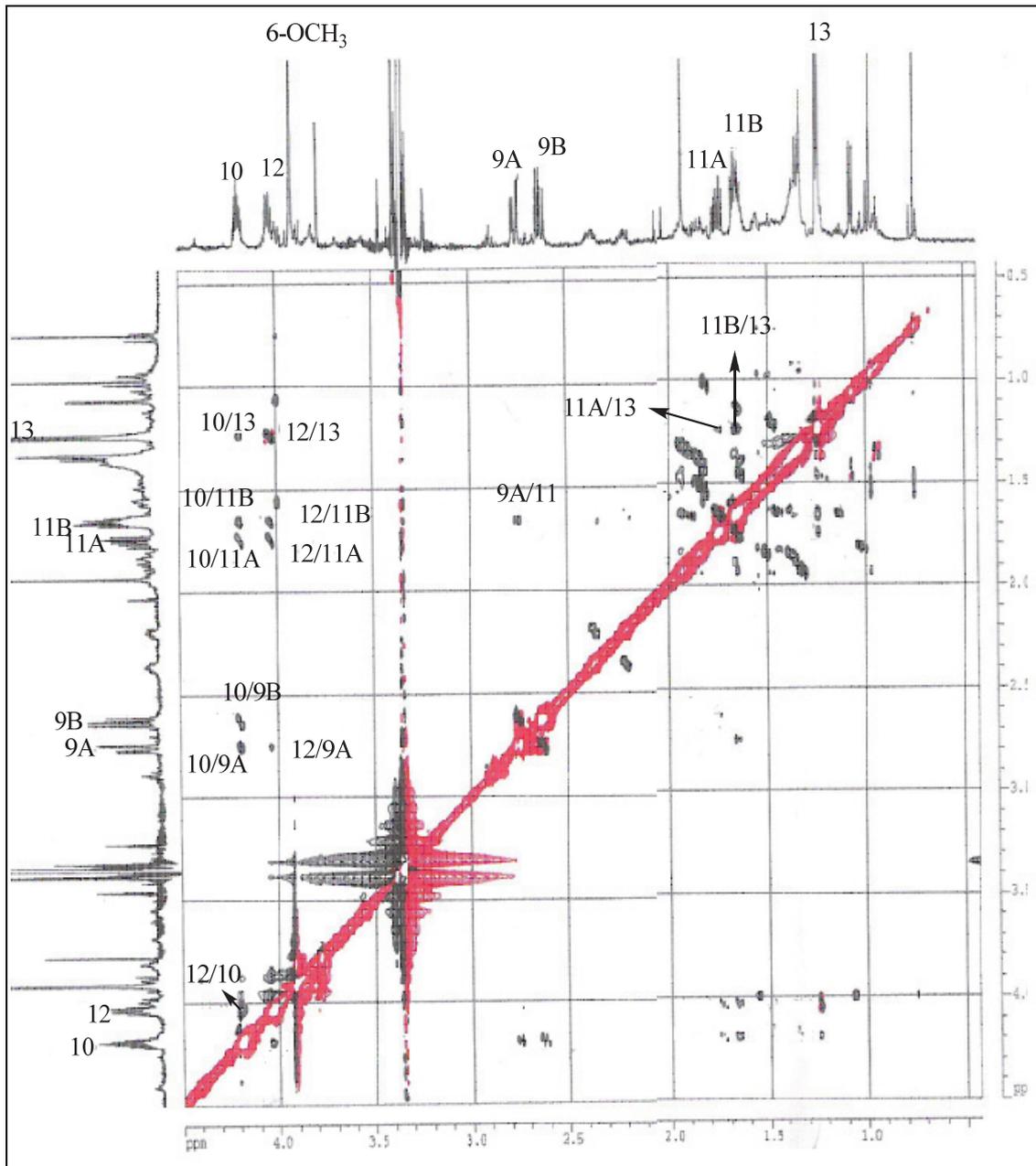


Abb. 55. NOESY-Spektrum von 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (600 MHz)

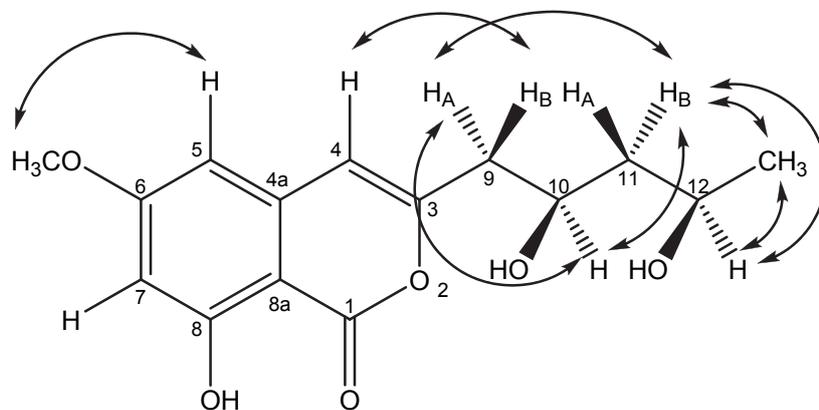


Abb. 56. NOESY-Korrelationen und relative Konfiguration von 6-Methoxy-3-(2S,4S)-dihydroxypentyl)-isocoumarinol, gemessen in MeOD (600 MHz)

### 3.7. Inhaltsstoffe aus *Xylaria* sp. (MGC-12.3)

Der Pilz *Xylaria* sp. wurde aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Aegiceras cornilatum* isoliert. Der EtOAc-Extrakt (4.5 g) aus der Reiskultivierung wurde mit Hexan ausgeschüttelt. Aus dieser Hexan-Fraktion (109.9 mg) wurde ein Ester (17 mg) durch Präzipitation nach Zugabe von Wasser gewonnen. Die Verbindung konnte mit Hilfe von NMR-Daten als Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat identifiziert werden. Durch Auftrennung über VLC und nachfolgende Säulenchromatographie wurden zusätzlich die Verbindungen Cytochalasin E und 5-Carboxymellein gewonnen. Aus dem MeOH-Extrakt wurde mittels VLC, Sephadex-Säulenchromatographie und preparativen HPLC der neue Naturstoff 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure isoliert.

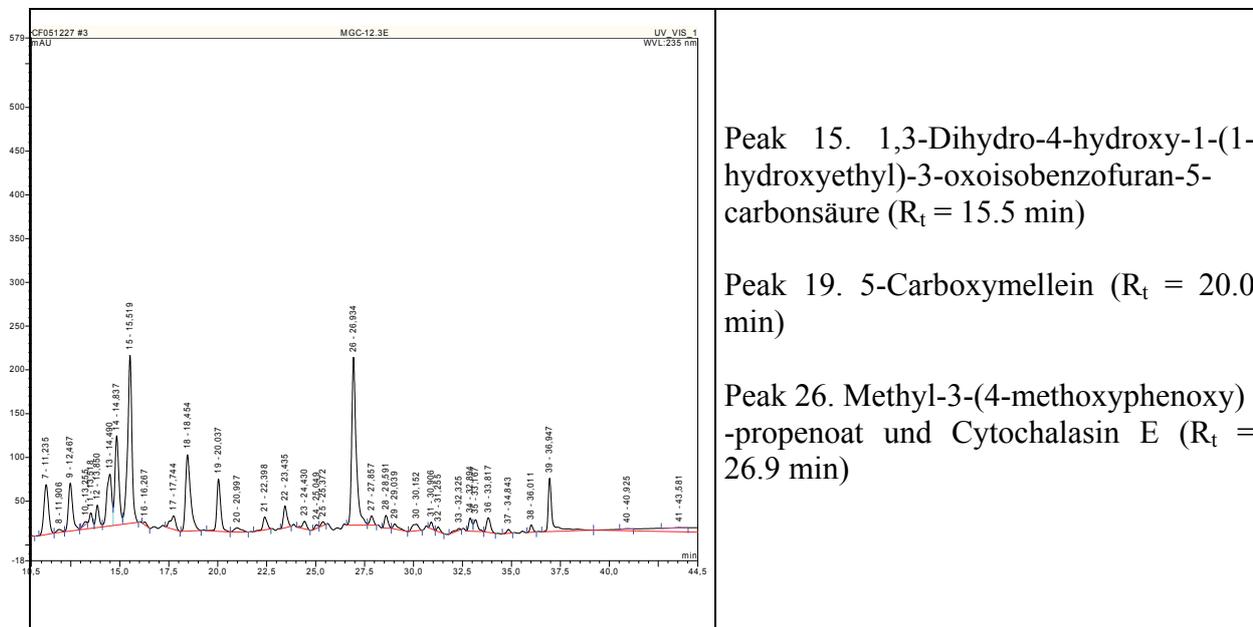
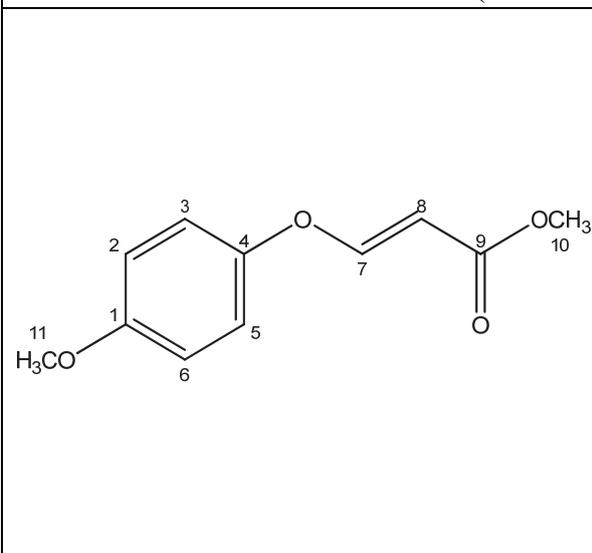
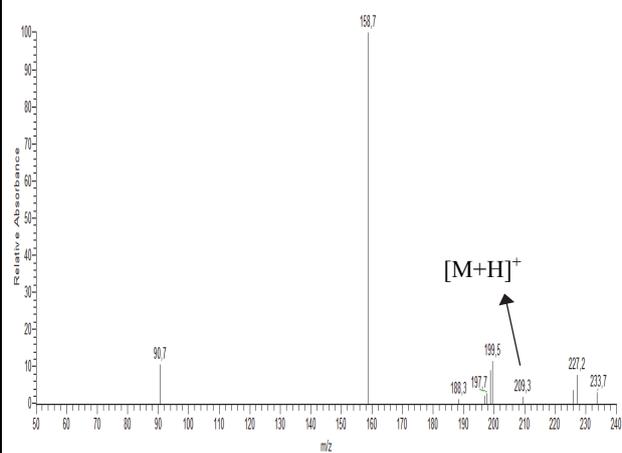


Abb. 57. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Xylaria* sp. auf Reismedium

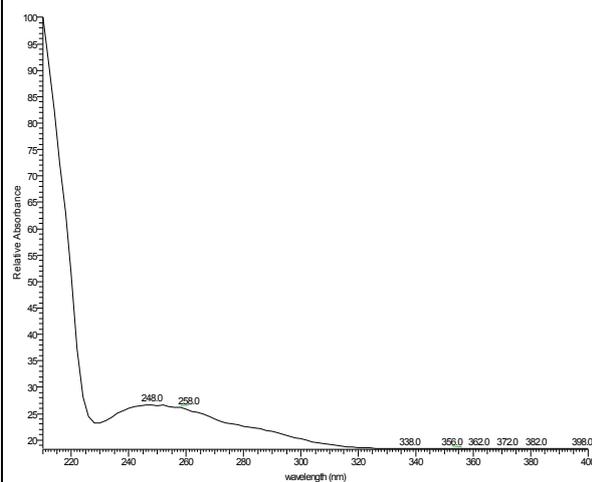
## 3.7.1. (E)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat

**(E)-METHYL-3-(4-METHOXYPHENOXY)PROPENOAT****Systematischer Name:** (E)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)acrylat**Probencode:** MGC-12.3E**Quellorganismus:** *Xylaria* sp. (aus *Aegiceras cornilatum*)**Substanzmenge:** 17.0 mg**Beschreibung:** gelbliches Öl**Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>**Molekulargewicht:** 208 g/mol**Retentionszeit HPLC:** 26.9 min (Standard-Gradient)**ESI-MS (+)**

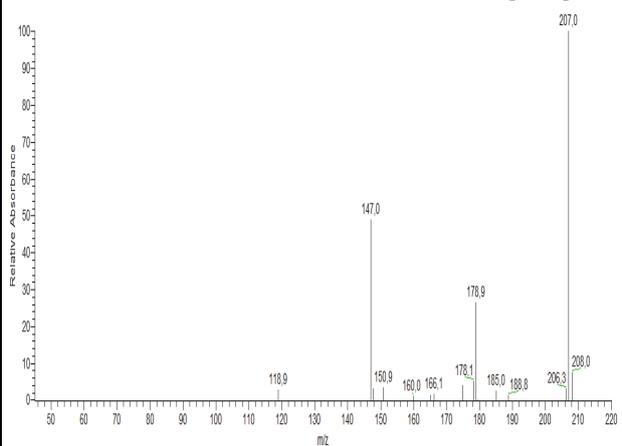
MGC-12.3E/LS.gelb.# RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.49E4 microAU

**UV-Spektrum**

MGC-12.3E/LS.gelb.#406 RT: 22.80 AV: 1 NL: 5.49E5 microAU

**ESI-MS (-)**

MGC-12.3E/S11-13.# RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.75E4 microAU



Der Ester (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat wurde aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Xylaria* sp. (Stamm MGC-12.3) gewonnen. Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Maxima bei 210, 248 und 258 nm. Mittels ESI-MS konnte das Molekulargewicht als 208 g/mol festgelegt werden. Das in CDCl<sub>3</sub> aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte zwei Methoxygruppen bei 3.72 und 3.80 ppm (H<sub>3</sub>-10 und H<sub>3</sub>-11), zwei Dubletts bei 5.46 und 7.75 ppm (H-7 und H-8), sowie zwei Dubletts für vier aromatische Protonen bei 6.88 und 6.99 ppm (H-2/H-6 und H-3/H-5). Anhand der <sup>1</sup>H-NMR-, COSY- und HMBC-Spektren ließ sich das AA'XX'-Spinsystem eines 1,4-disubstituierten aromatischen Ringes nachweisen. Die Konfiguration der Doppelbindung wurde anhand der Kopplungskonstante (<sup>3</sup>J<sub>7,8</sub>=12.3 Hz) als *E* festgelegt, obwohl dieser Wert unter dem normalerweise zu erwartenden Bereich von 15 – 18 Hz (für *trans*-Doppelbindungen) liegt. Diese Abweichung dürfte in der Substitution der Doppelbindung mit zwei elektronenziehenden Substituenten, d.h. Ether und Ester, begründet sein. Jedenfalls führte die Übereinstimmung der spektroskopischen Daten mit aus der Literatur entnommenen Werten zur Identifizierung dieses Metaboliten als (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat (Anderson *et al.*, 1988 und Abate *et al.*, 1991).

**Tabelle 23. NMR-Daten von (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat**

Position	δ <sup>1</sup> H (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) <sup>1</sup>	δ <sup>1</sup> H (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)	δ <sup>13</sup> C (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) <sup>2</sup>	δ <sup>13</sup> C (ppm) (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	-	-	156.9	157.0	-	-
2	6.76, d (6.0)	6.88, d (9.1)	115.0	115.1	5	1, 4, 6
3	6.76, d (6.0)	6.99, d (9.1)	119.4	119.6	6	1, 4
4	-	-	149.6	149.7	-	-
5	6.76, d (6.0)	6.99, d (9.1)	119.4	119.6	2	1, 4
6	6.76, d (6.0)	6.88, d (9.1)	115.0	115.1	3	1, 2, 4
7	7.58, d (12.0)	7.75, d (12.3)	160.5	160.7	8	4, 7, 8, 9
8	5.32, d (12.0)	5.46, d (12.3)	110.9	101.2	7	7, 8
9	-	-	167.8	168.1	-	-
10	3.62, s	3.72, s	51.3	51.5	-	9, 10
11	3.68, s	3.80, s	55.7	55.8	-	1

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

<sup>2</sup>Abate *et al.*, 1991

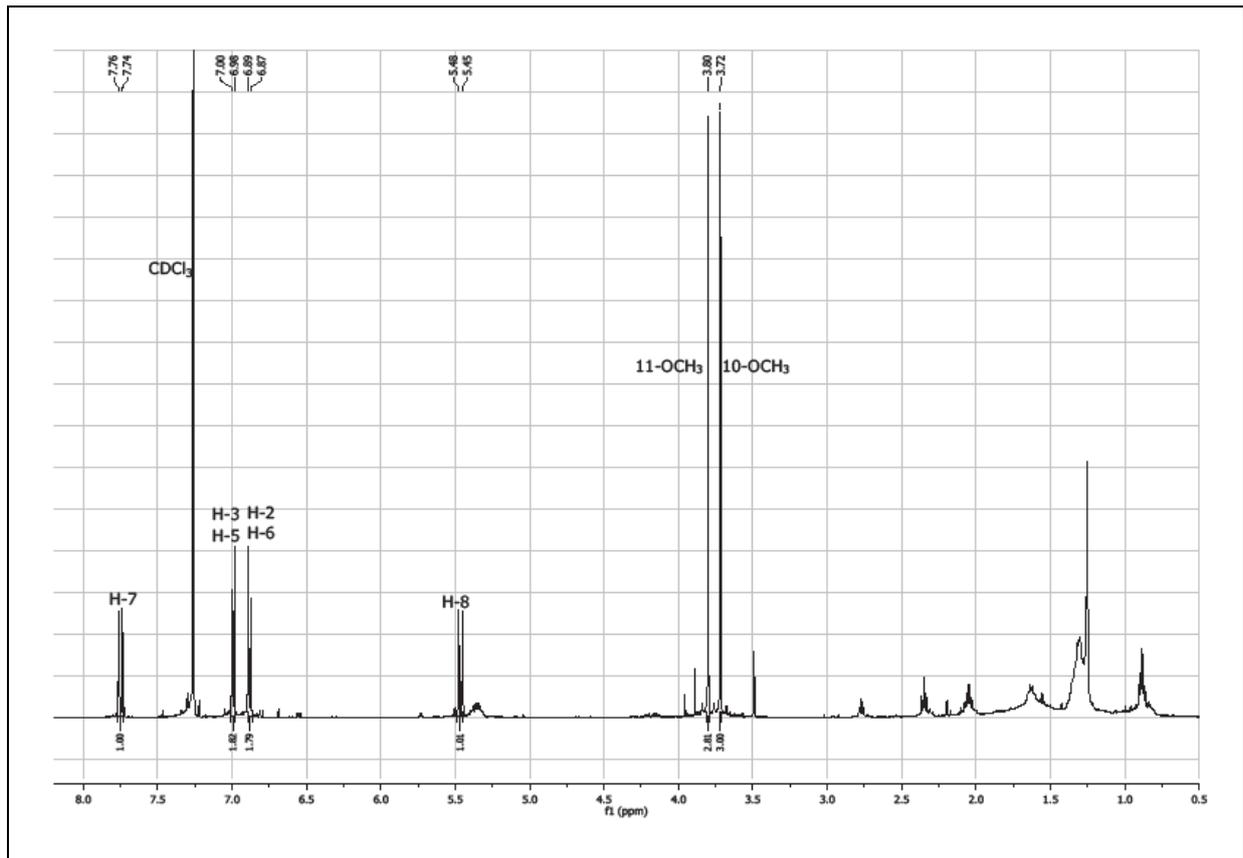


Abb. 58.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

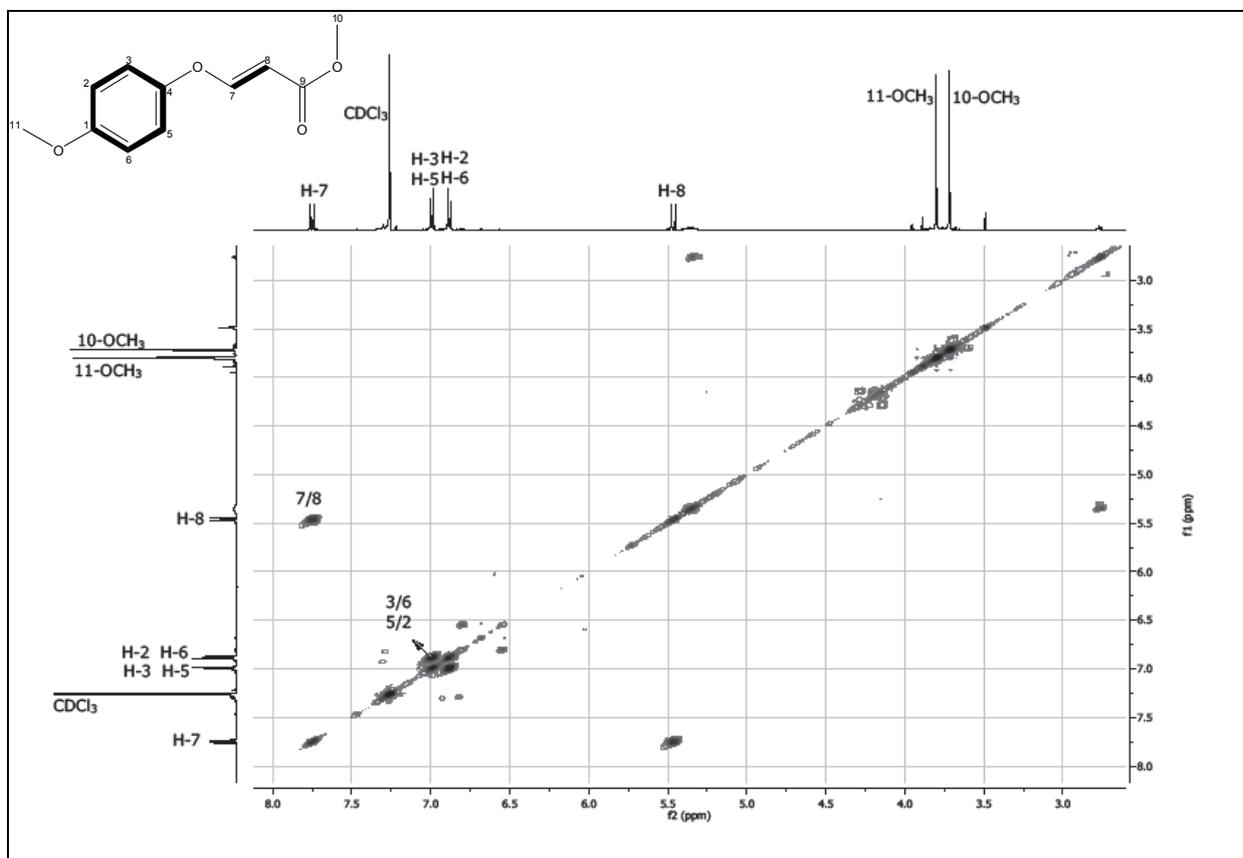


Abb. 59. COSY-Spektrum von (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

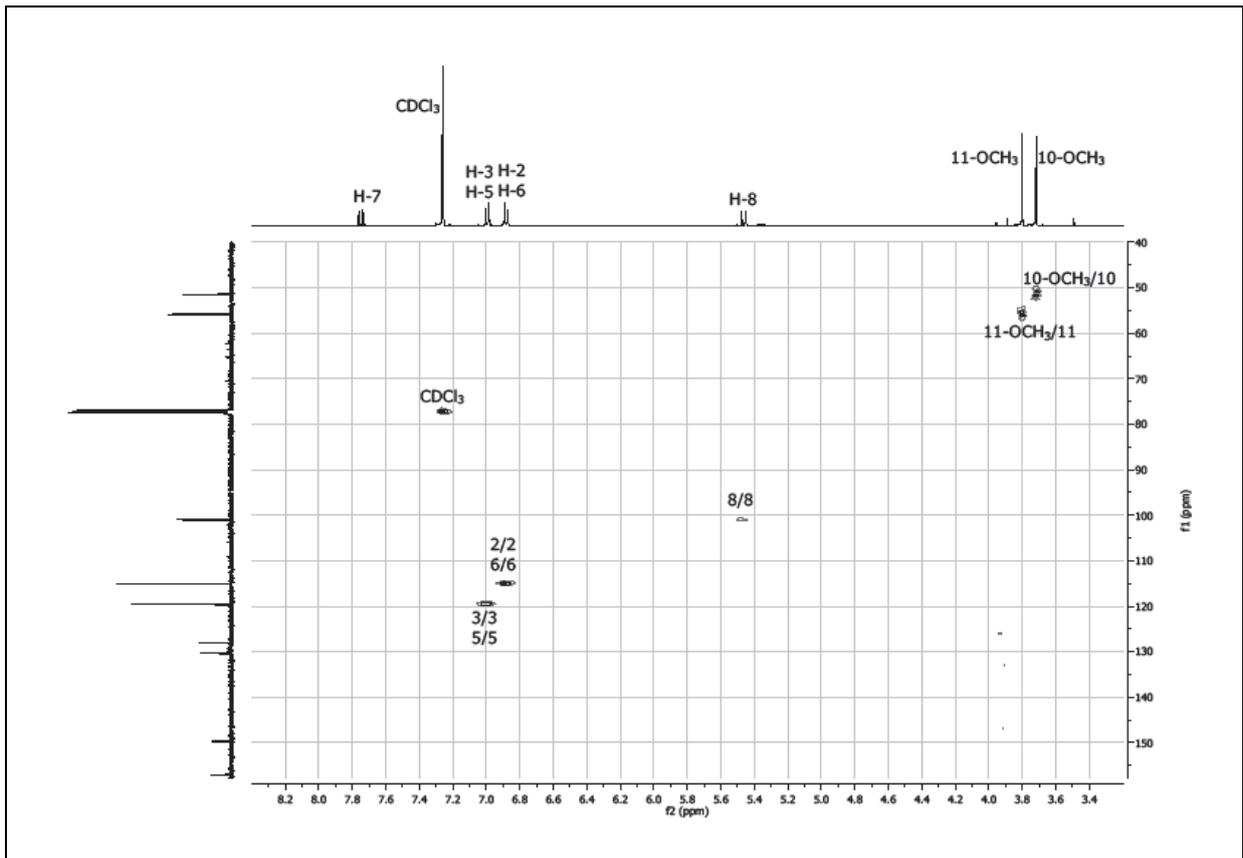


Abb. 60. HMQC-Spektrum von (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

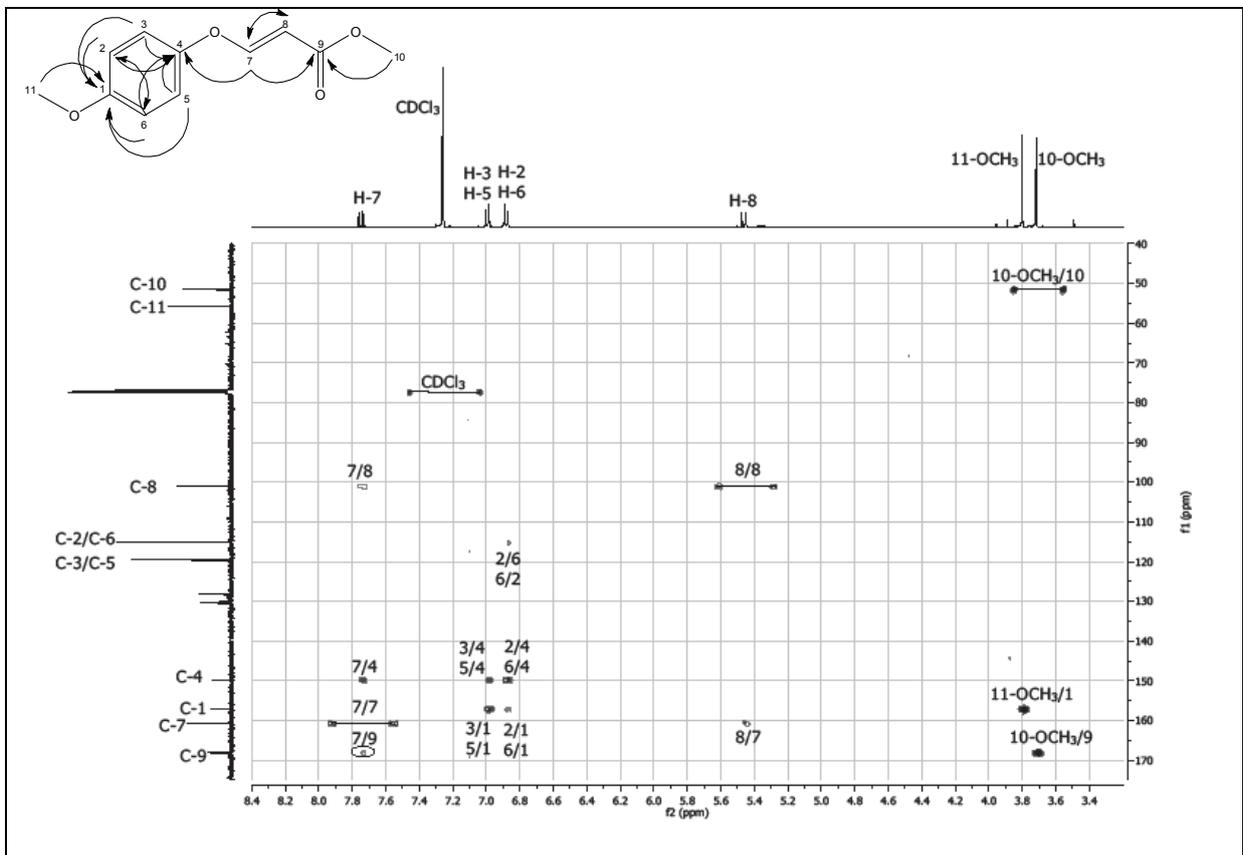
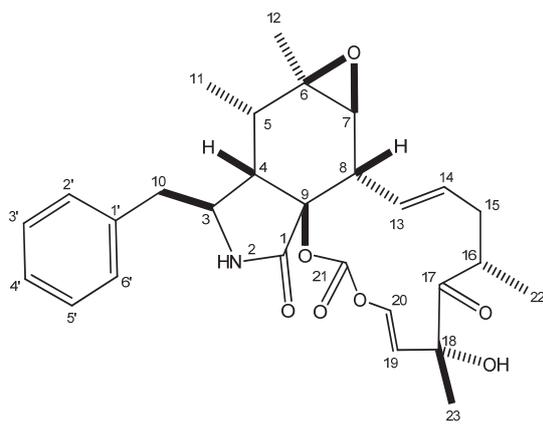
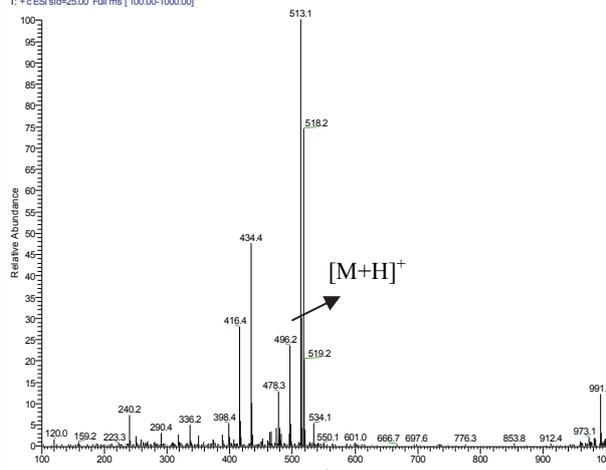
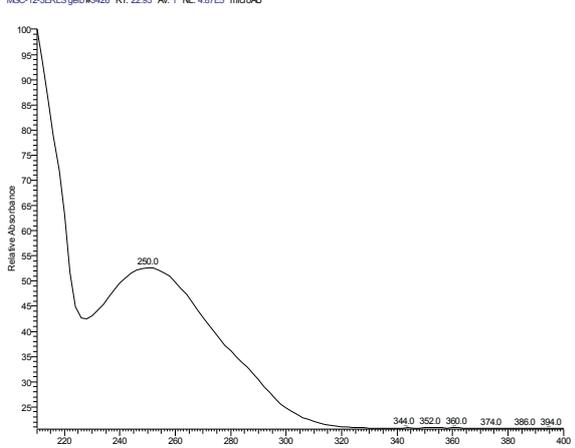
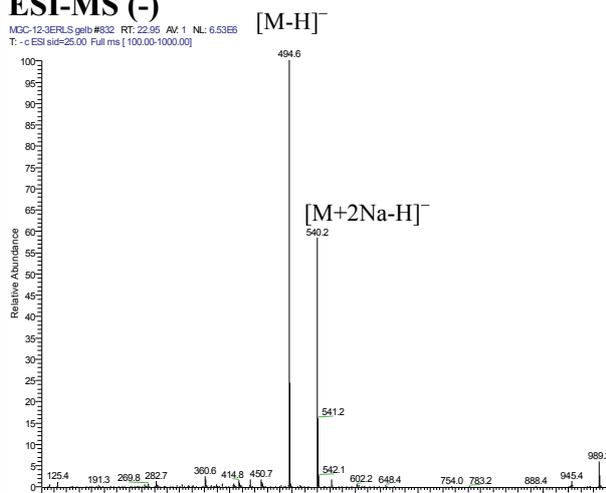
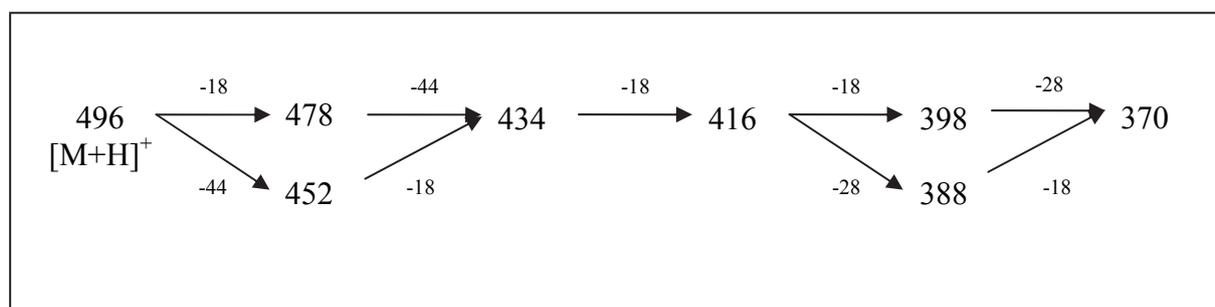


Abb. 61. HMBC-Spektrum von (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

## 3.7.2. Cytochalasin E

<b>CYTOCHALASIN E</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	6,7-Epoxy-10-phenyl-5,6,16,18-tetramethyl-21,23-dioxy-(13)cytochalan-13,19-diene-17,22-dion
<b>Probencode:</b>	MGC-12.3E (gelb)
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Xylaria</i> sp. (aus <i>Aegiceras cornilatum</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	75.7 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	495 g/mol
<b>Drehwert <math>[\alpha]_D^{20}</math>:</b>	-30.4° (c, 1.0 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	27.1 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>MGC-12-3ERLS gelb #850 RT: 23.40 AV: 1 NL: 1.54EB T: - c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]</p> 
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>MGC-12-3ERLS gelb #3426 RT: 22.93 AV: 1 NL: 4.87E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>MGC-12-3ERLS gelb #832 RT: 22.95 AV: 1 NL: 6.53EB T: - c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]</p> 

Die Substanz Cytochalasin E (75.7 mg) wurde mittels VLC und Saulenchromatographie aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Xylaria* sp. (Stamm MGC-12.3) isoliert. Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Maxima bei 210 und 250 nm. Im ESI-MS wurde bei negativer Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  494  $[M-H]^-$  detektiert, so dass sich das Molekulargewicht auf 495 g/mol festlegen ließ. Die ungerade Molekülmasse war ein Indiz für das Vorhandensein einer ungeradzahligen Anzahl von Stickstoffatomen im Molekül. Neben dem Moleküllenpeak wurde im ESI-Massenspektrum eine für Cytochalasine charakteristische Fragmentierung detektiert. Es wurden hier die bezeichnende Massenfragmente von  $m/z$  478, 434, 416 und 398 beobachtet, die aus der sukzessiven Abspaltung von  $H_2O$  ( $\Delta$  18 amu) bzw.  $CH_2CO$  ( $\Delta$  44 amu) resultieren (Abb. 62) (Prasain *et al.*, 2002).



**Abb. 62. CID-Fragmentierungsschema ( $m/z$ ) von Cytochalasin E (Prasain *et al.*, 2002)**

Das in  $CDCl_3$  aufgenommene  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte Signale der drei Substrukturen des Moleküls. Der monosubstituierte Benzolring bestand aus den Protonen H-3'/H-5' (7.24 ppm, 2H), H-4' (7.17 ppm, 1H) und H-2'/H-6' (7.07 ppm, 2H). Dieses  $A_2B_2C$ -Spinsystem ließ sich auch im COSY-Spektrum nachweisen. Weiterhin konnten fünf Methin- (H-3 bis H-8) und zwei Methylgruppen (H<sub>3</sub>-11 und H<sub>3</sub>-12), sowie eine Methylengruppe (H<sub>2</sub>-10), die zur Perhydroisindoleinheit gehören, detektiert werden. Im COSY-Spektrum wurden die Korrelationen von H-3 zu H-4 und H-10B, sowie von H-4 zu H-5 beobachtet. Ferner waren noch eine Methylengruppe (H<sub>2</sub>-15), fünf Methin- (H-13, H-14, H-16, H-19 und H-20) und zwei Methylgruppen (H<sub>3</sub>-22 und H<sub>3</sub>-23) zu beobachten, die dem Makrozyklus zuzuordnen waren. Im COSY-Spektrum waren zwei separate Spinsysteme zu detektieren, einerseits H-13, H-14, H<sub>2</sub>-15, H-16 und H<sub>3</sub>-22, andererseits die Doppelbindung H-19 und H-20. Die vicinalen Kopplungskonstanten der olefinischen Protonen H-13 und H-14 ( $J = 15$  Hz) sowie der Protonen H-20 und H-19 ( $J = 11.7$  Hz) wiesen, in Übereinstimmung mit den Literaturangaben (Büchi, G. *et al.* 1973, Kimura *et al.*, 1989) und unter Berücksichtigung des

Ethersubstituenten an C-20, auf eine *trans*-Anordnung beider Doppelbindungen hin. Die Verknüpfung zwischen die Teilstrukturen Perhydroisindol und Makrozyklus wurde durch die aus dem COSY-Spektrum entnommene Korrelation von H-7 zu H-13 nachgewiesen.

Eine Substruktursuche in Literatur-Datenbanken ergab, dass es sich bei dieser Verbindung um Cytochalasin E handeln musste. Die NMR-Daten stimmen mit in der Literatur beschriebenen Daten überein (Büchi, G. *et al.* 1973, Kimura *et al.*, 1989).

Cytochalasin E weist neun chirale Kohlenstoffatome auf, von denen sieben in der hydrierten Isoindoleinheit und zwei im Makrozyklus liegen. Der Drehwert der Substanz betrug  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -30.4^\circ$  (c, 1.0 in MeOH) und ist damit mit dem in der Literatur angegebenen Wert von  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -25.6^\circ$  (in MeOH) vergleichbar (Büchi, G. *et al.* 1973).

**Tabelle 24. NMR-Daten von Cytochalasin E**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (CDCl <sub>3</sub> , 270 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)	COSY (H→H)
2'	7.30, m <sup>a</sup>	7.07, d (6.6) <sup>c</sup>	5'
3'	7.30, m <sup>a</sup>	7.24, t (7.2) <sup>d</sup>	6'
4'	7.30, m <sup>a</sup>	7.17, t (7.2)	-
5'	7.30, m <sup>a</sup>	7.24, t (7.2) <sup>d</sup>	2'
6'	7.30, m <sup>a</sup>	7.07, d (6.6) <sup>c</sup>	3'
3	3.74, m	3.70, m	4, 10A, 10B
4	3.03, dd (4.9, 2.9)	2.93, dd (5.4, 2.5)	5
5	2.28, dq(4.9, 7.3)	2.14, m	4
7	2.63, m <sup>b</sup>	2.53, m <sup>e</sup>	7
8	2.63, m <sup>b</sup>	2.53, m <sup>e</sup>	-
10A	2.90, dd (13.1, 4.4)	2.80, dd (13.6, 5.2)	3, 10B
10B	2.70, dd (13.1, 6.8)	2.64, dd (13.6, 6.0)	3, 10 <sup>a</sup>
11	1.09, d (7.3)	0.95, d (7.3)	-
12	1.26, s	1.17, s	-
13	5.89, ddd (16.0, 8.3, 1.6)	5.81, ddd (14.9, 9.6, 1.6)	7, 14, 15B
14	5.23, ddd (16.0, 11.0, 3.8)	5.13, ddd (14.9, 11.0, 3.9)	13, 15A, 15B
15A	2.67, m	2.53, m <sup>e</sup>	14, 15B
15B	2.15, ddd (12.7, 3.8, 2.2)	2.06, ddd (11.7, 3.6, 1.8)	13, 14, 15A, 16
16	2.93, m	2.86, ddd (11.7, 7.0, 2.3)	15B, 22
19	5.63, d (11.7)	5.53, d (11.7)	20
20	6.48, d (11.7)	6.33, d (11.7)	19
22	1.16, d (6.3)	1.07, d (6.9)	16
23	1.48, s	1.40, s	-
NH	6.44, br	-	-
18-OH	4.34, s	-	-

<sup>1</sup>Kimura *et al.*, 1989

<sup>a,b,c,d,e</sup> Signalüberlappungen

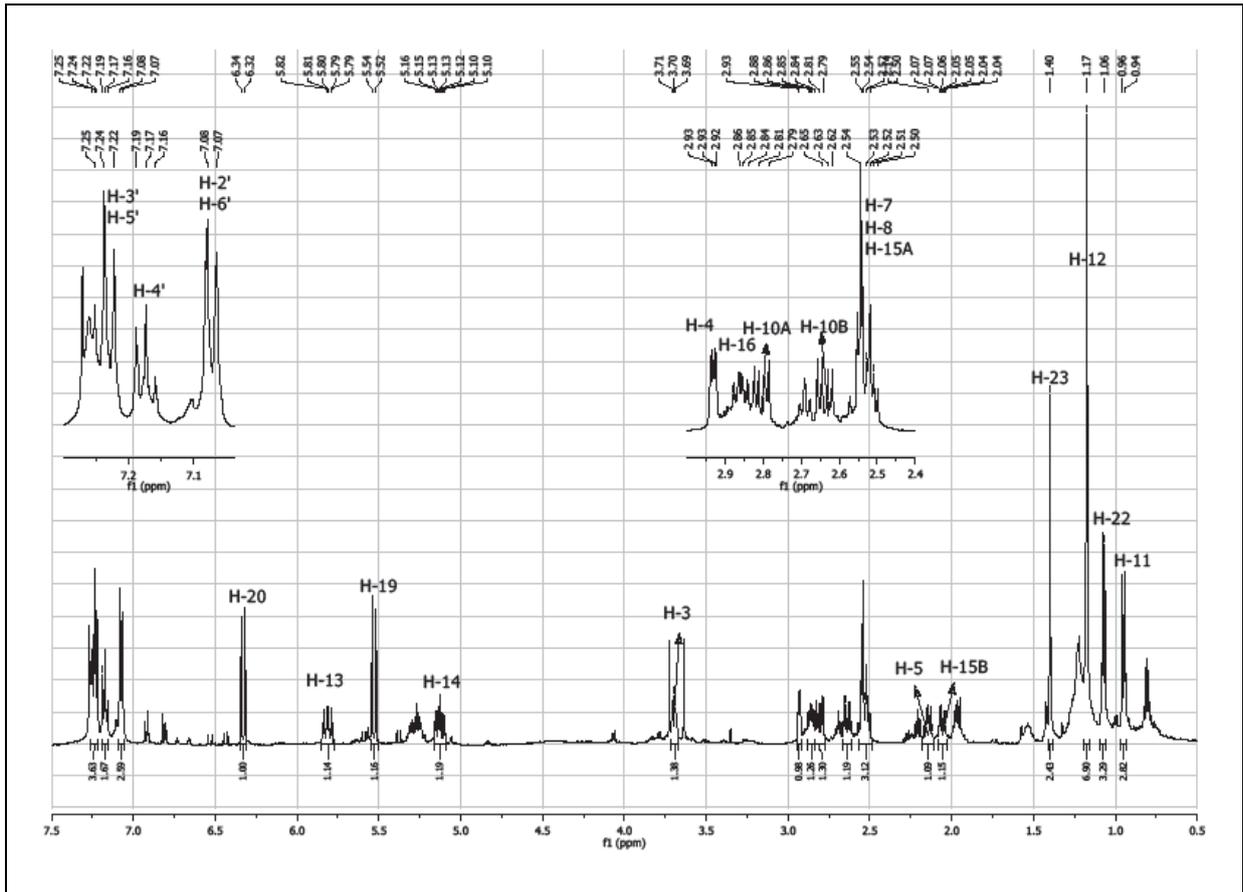


Abb. 63.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cytochalasin E, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

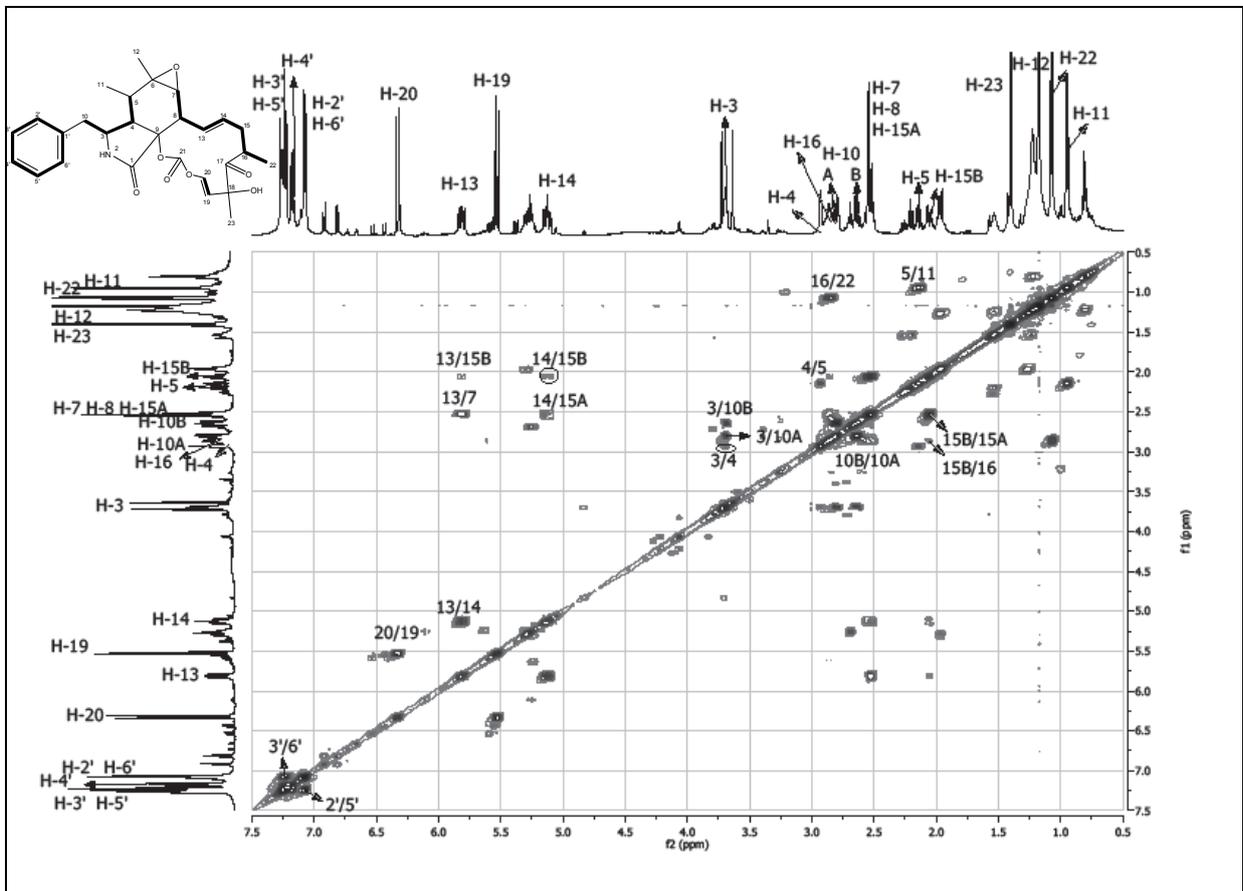
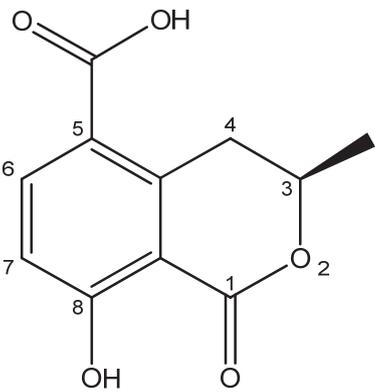
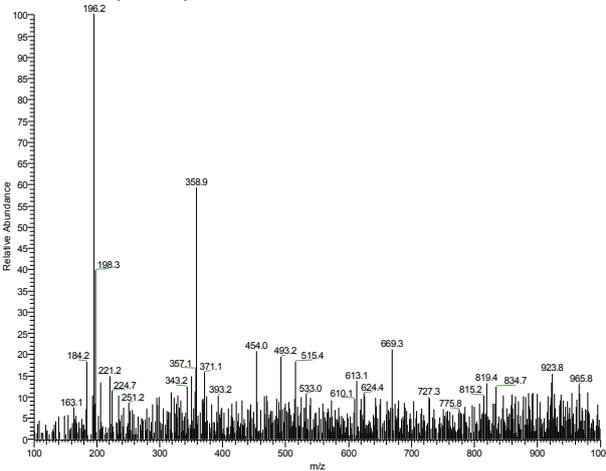
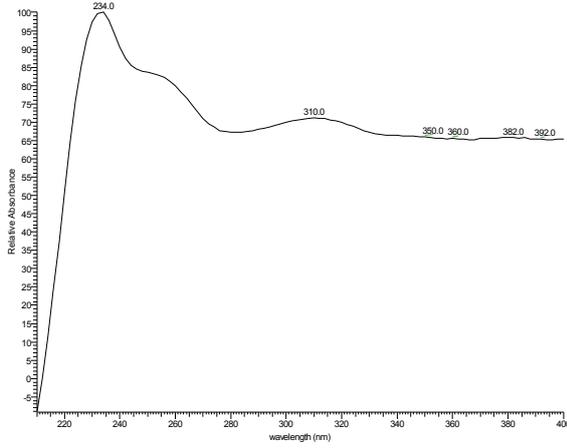
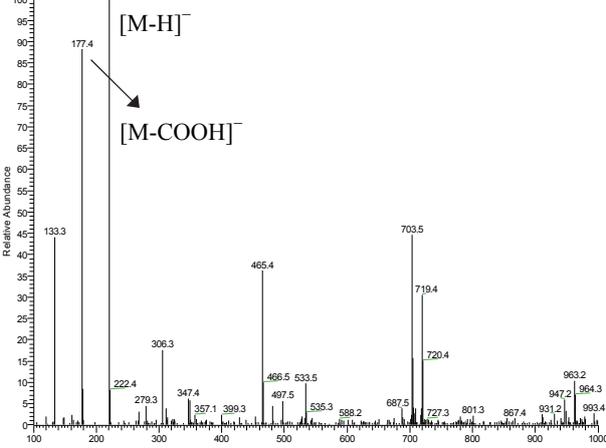


Abb. 64. COSY-Spektrum von Cytochalasin E, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

## 3.7.3. 5-Carboxymellein

<b>5-CARBOXYMELLEIN</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-5-carbonsäure
<b>Probencode:</b>	MGC-12.3E S14-17
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Xylaria</i> sp. (aus <i>Aegiceras cornilatum</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.5 mg
<b>Beschreibung:</b>	bräunliches Öl
<b>Summenformel:</b>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	222 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-179.0 (c, 0.25 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	20.2 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> MGC-12-3E S14-17 #551 RT: 16.33 AV: 1 NL: 7.67E5 T: + c ESI: sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
	*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.
<p><b>UV-Spektrum</b> MGC-12-3E S14-17 #2428 RT: 16.29 AV: 1 NL: 1.55E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> MGC-12-3E S14-17 #553 RT: 16.39 AV: 1 NL: 4.10E6 T: - c ESI: sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

5-Carboxymellein (1.5 mg) wurde mittels VLC und Säulenchromatographie aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Xylaria* sp. (Stamm MGC-12.3) isoliert. Das UV-Spektrum der Substanz zeigte Maxima bei 234 und 310 nm. Im ESI-MS wurde bei negativer Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  221  $[M-H]^-$  detektiert, so dass sich das Molekulargewicht auf 222 g/mol festlegen ließ. Die Struktur dieser Verbindung wurde bereits durch Abgleich des aufgezeichneten UV-Spektrums mit der internen UV/Vis-Spektrenbibliothek und anhand der ESI-Massenspektren identifiziert.

Das in MeOD gemessene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte im aromatischen Bereich zwei Dubletts bei 8.16 und 6.95 ppm für die *ortho*-ständigen Protonen H-7 und H-6 ( $J = 8.5$  Hz). Des Weiteren fiel bei 4.60 ppm das tieffeldverschobene Multiplett einer Methingruppe (H-3) auf, welches auf die Nachbarschaft zu einem Sauerstoff-Atom hinweist. Weiterhin wurden eine Methylgruppe bei 1.45 ppm, die aufgrund ihrer Kopplungskonstante ( $J = 6.6$  Hz) der Methingruppe (H-3) benachbart sein musste, sowie die Methylenprotonen (H<sub>2</sub>-4) bei 3.12 und 3.78 ppm beobachtet.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmten mit den in der Literatur für 5-Carboxymellein angegebenen Werten überein (Okuno *et al.*, 1986). Die Übereinstimmung des Drehwertes von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -179^\circ$  (c, 0.25 in MeOH) mit dem Literaturwert von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -195^\circ$  (c, 0.14 in EtOH) machte deutlich, dass es sich auch um identische Stereoisomere handeln musste.

**Tabelle 25. NMR-Daten von 5-Carboxymellein**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (DMSO- $d_6$ , 60 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 500 MHz)
3	4.72, m	4.60, m,
4A	3.82, dd (18.0, 3.0)	3.78, dd (9.4, 2.0)
4B	2.96, dd (18.0, 12.0)	3.12, dd (9.1, 7.9)
6	6.94, dd (9.6)	6.95, d (8.5)
7	8.15, dd (9.6)	8.16, d (8.5)
3-CH <sub>3</sub>	1.44, d (6.0)	1.45, d (6.6).
5-COOH	12.94, s <sup>a</sup>	-
8-OH	11.61, s <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup>Okuno, T. *et al.*, 1986

<sup>a</sup>Signalüberlappung

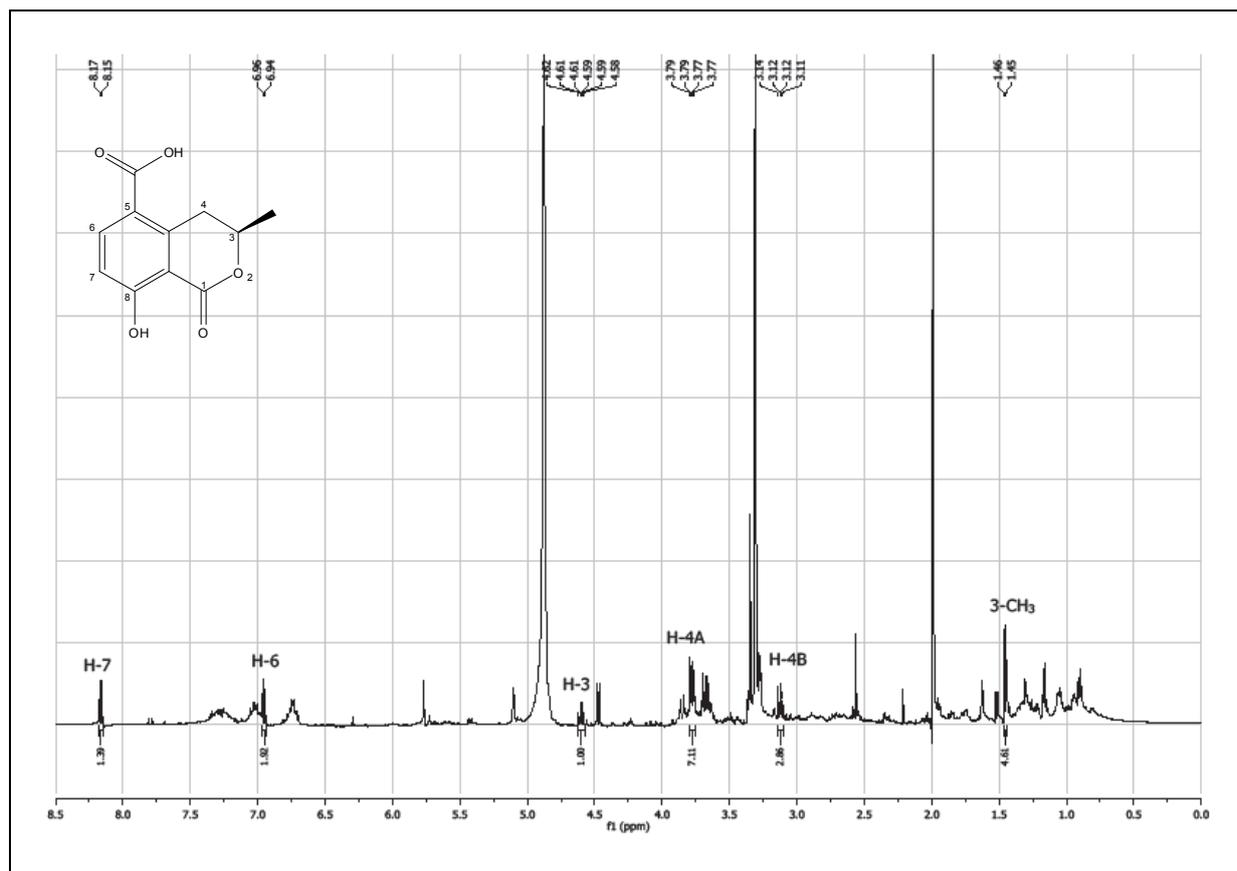
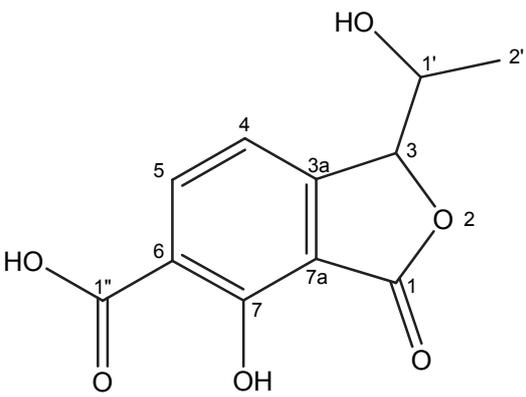
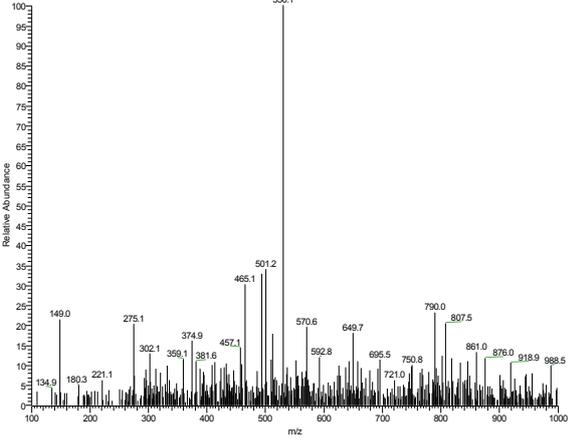
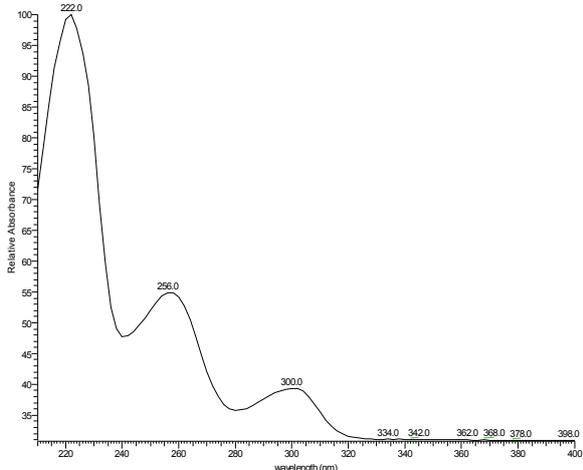
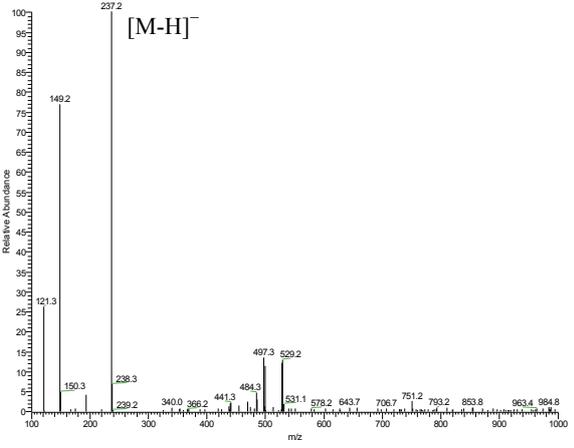


Abb. 65.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5-Carboxymellein, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

### 3.7.4. 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure (neuer Naturstoff)

<b>1,3-DIHYDRO-4-HYDROXY-1-(1-HYDROXYETHYL)-3-OXISOBENZOFURAN-5-CARBONSÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure
<b>Probencode:</b>	MGC-12.3M RLS W S25 P4
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Xylaria</i> sp. (aus <i>Aegiceras cornilatum</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	22.5 mg
<b>Beschreibung:</b>	bräunliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	238 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-189.0 (c, 0.25 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	15.2 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> MGC-12.3MRLS WS25 P4 #132 RT: 4.14 Av: 1 NL: 2.35E5 T: +c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b> MGC-12.3MRLS WS25 P4 #007 RT: 4.15 Av: 1 NL: 3.27E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> MGC-12.3MRLS WS25 P4 #134 RT: 4.20 Av: 1 NL: 1.00E6 T: -c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Dieser neue Naturstoff der Klasse der Phthalide (22.5 mg) wurde aus dem MeOH-Extrakt von *Xylaria* sp (Stamm MGC-12.3) durch Auftrennung über VLC, Sephadex-Säulenchromatographie und preparativen HPLC isoliert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima von 222, 256 und 300 nm. Das hochaufgelöste TOF-Massenspektrum zeigte bei positiver Ionisierung den Basispeak bei  $m/z$  261.038  $[M+Na]^+$  (berechneter Wert von 261.0370,  $\Delta$  3.8 ppm), woraus ein Molekulargewicht von 238 Da und die Summenformel als  $C_{11}H_{10}O_6$  abgeleitet wurde.

Das in MeOD aufgenommene  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte zwei Dubletts im aromatischen Bereich bei 8.15 (H-5) und 6.94 ppm (H-4) mit einer Kopplungskonstante von 8.5 Hz, was auf eine *ortho*-Kopplung der Protonen hindeutete (s. Tab. 26). Weiterhin waren ein Singulet bei 5.78 ppm (H-3) und ein Quarttet bei 4.61 ppm (H-1'), sowie ein Duplett bei 1.45 ppm (H<sub>3</sub>-2') vorhanden. Das HMBC-Spektrum gab Aufschluss über das Vorhandensein von einer Methyl- und vier Methingruppen sowie sechs quartären Kohlenstoffatomen. Die Zuordnung von C-3, C-4, C-5, C-1' und C-1'' ergab sich aus den Direktkorrelationen im HMBC-Spektrum. Mithilfe der Korrelationen im COSY-Spektrum konnten die tieffeldverschobenen aliphatischen Protonen H-1' und H<sub>3</sub>-2' dem gemeinsamen Spinsystem einer 1-Hydroxyethyl-Seitenkette zugeordnet werden. Weiterhin konnten die Korrelationen der *ortho*-koppelnden Protonen H-4 und H-5 detektiert werden. Die chemische Verschiebung des Signals bei 168.6 ppm (C-1''), die dem HMBC-Spektrum entnommen wurde, ließ darauf schließen, dass es sich um eine Carboxylfunktion handeln musste. Aus der Korrelation eines der beiden *ortho*-koppelnden Protonen (H-5) zu C-1'' ließ sich die Verknüpfung der Carboxylgruppe an Position 6 eines Benzolrings ableiten. Die HMBC-Kopplungen von H-4 zu C-6 und C-7a, sowie von H-5 zu C-3a und C-7 belegten den Ringschluss. Im HMBC-Spektrum war C-7 stark tieffeldverschoben (161.6 ppm), was durch eine phenolische Hydroxygruppe als Substituent erklärt werden konnte. Die chemische Verschiebungen von C-3 (86.9 ppm) und C-1 (171.6) zeigten das Vorkommen von Sauerstoffen in Form einer Ether- bzw. einer Esterfunktion an. Mithilfe der Kopplungen im HMBC von H-3 zu C-3a, C-7a und C-1 sowie der im COSY-Spektrum von H-3 zu H-4 konnten C-1 und C-3 schließlich einem  $\gamma$ -Lactonring zugeordnet werden, wobei sich der Ringschluss zwischen C-1 und C-3 über das Heteroatom auch aus der Betrachtung des Molekulargewichtes ableiten ließ. Die Kopplungen im COSY-Spektrum von H-3 zu H-1', sowie im HMBC von H-3 zu C-2' und von H-1' zu C-3 machten deutlich, dass der Isobenzofuranring an C-3 mit der 1-Hydroxyethylgruppe verknüpft war.

Die Struktur besitzt zwei Stereozentren, die optische Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{20}$  -189.0 (c, 0.25 in MeOH). Allerdings wurde darauf verzichtet, die absolute Konfiguration an C-1', beispielsweise durch eine Derivatisierung zu entsprechenden Mosher-Estern, zu ermitteln, da eine Zuordnung der relativen Konfiguration von C-1' und C-3 aufgrund der Flexibilität der Seitenkette nicht möglich ist.

**Tabelle 26. NMR-Daten von 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (in MeOD, 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (in MeOD, 125 MHz) <sup>1</sup>	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	-	171.6	-	-
3	5.78, s	86.9	4, 1'	1, 3, 3a, 7a, 2'
3a	-	153.8	-	-
4	6.94, d (8.5)	116.9	3, 5	4, 6, 7a
5	8.15, d (8.5)	139.6	4	3a, 5, 7, 1''
6	-	119.5	-	-
7	-	161.6	-	-
7a	-	114.5	-	-
1'	4.61, q (6.3)	67.1	3, 2'	3, 1', 2'
2'	1.45, d (6.6)	20.7	1'	3, 1', 2'
1''	-	168.6	-	-

<sup>1</sup> Werte aus dem HMBC-Spektrum entnommen

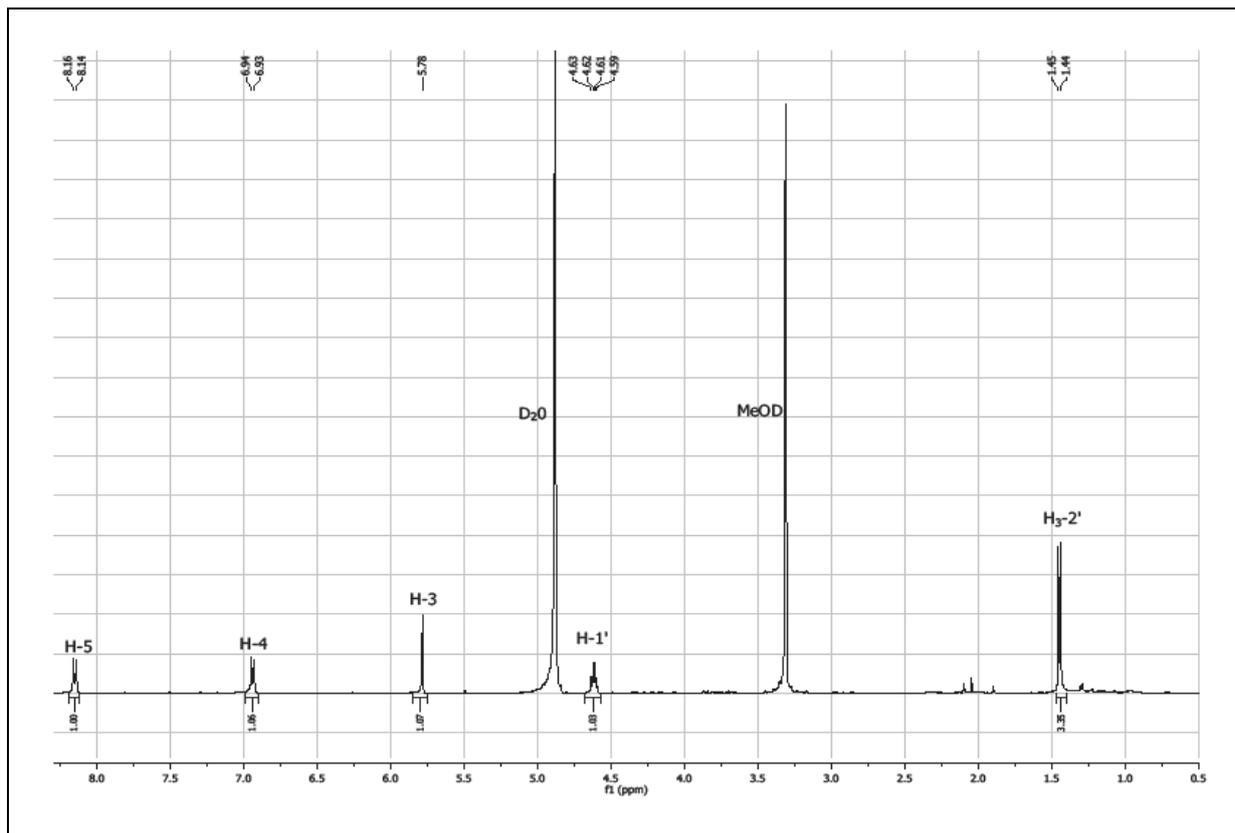


Abb. 66. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

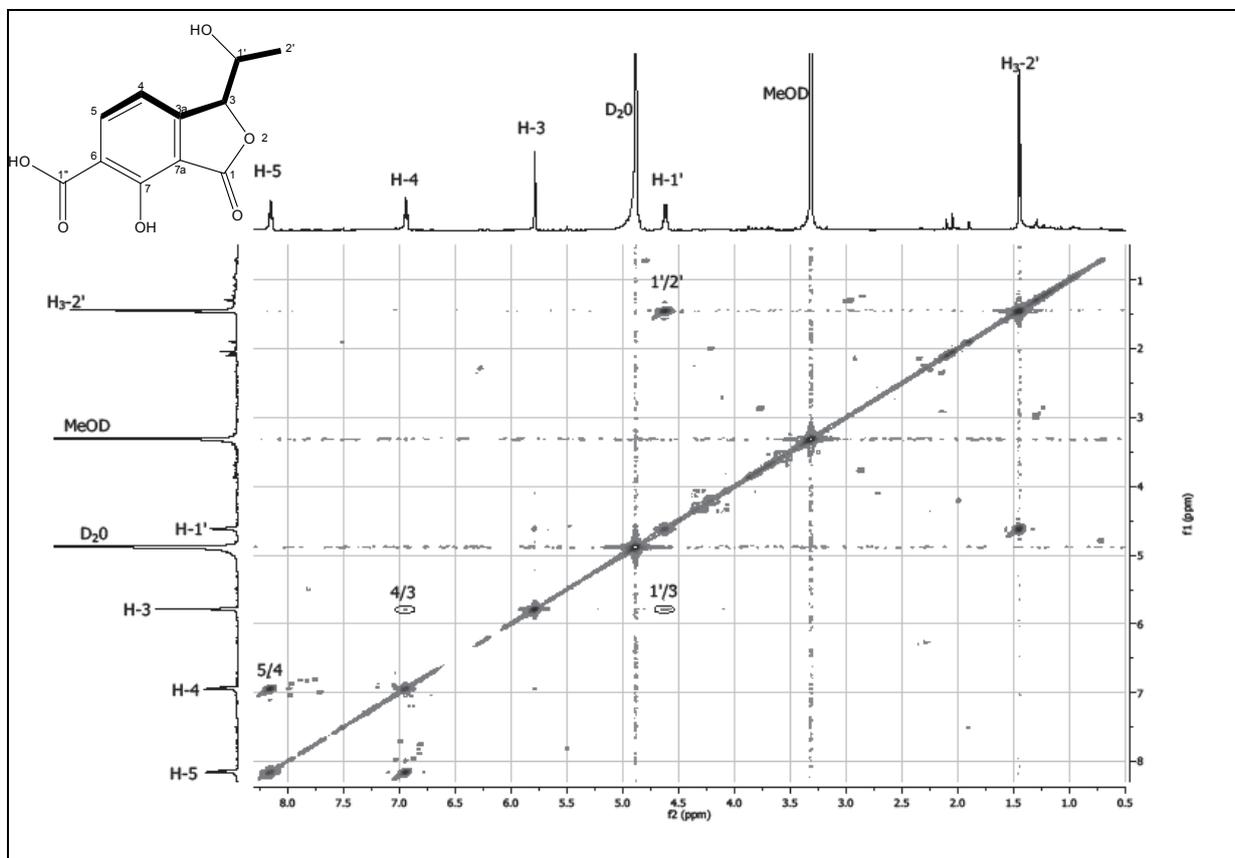


Abb. 67. COSY-Spektrum von 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

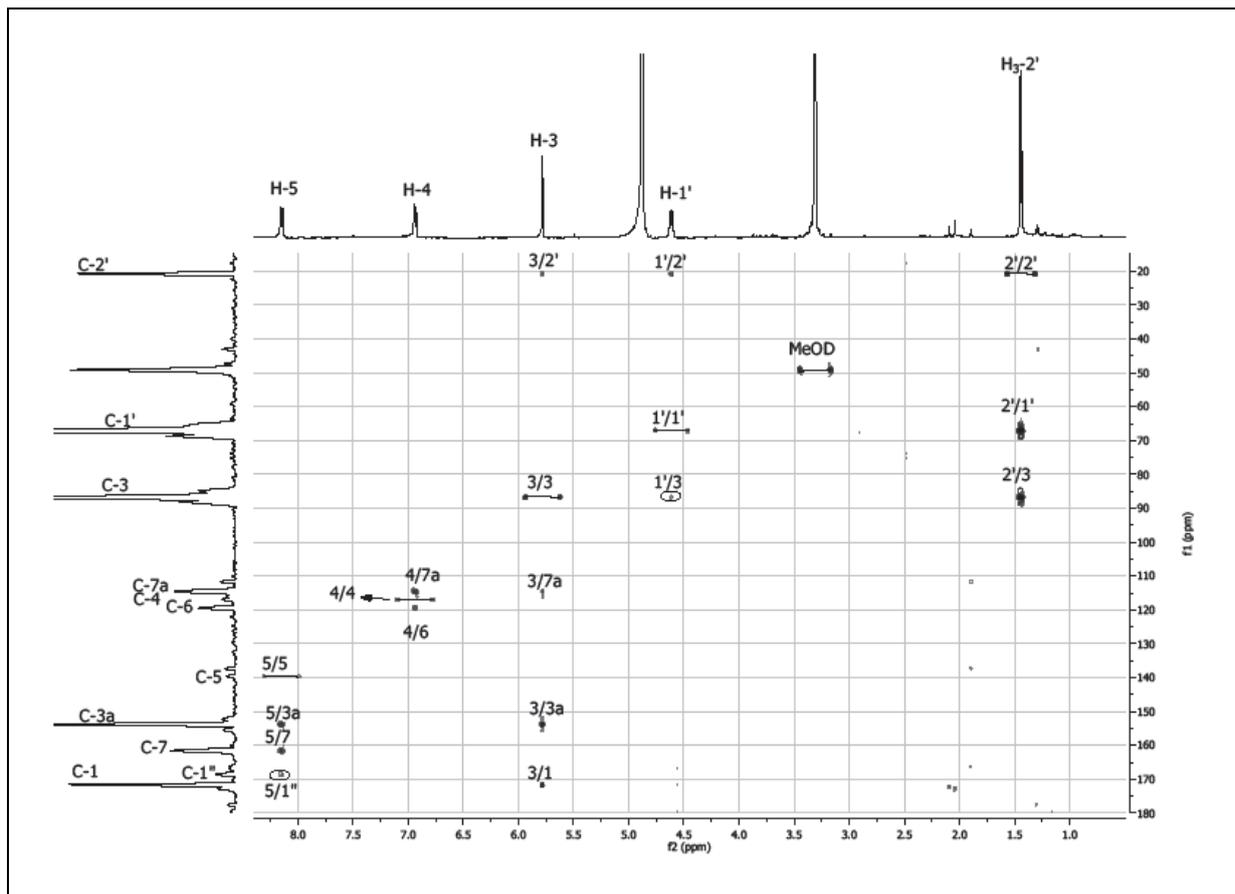


Abb. 68. HMBC-Spektrum von 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

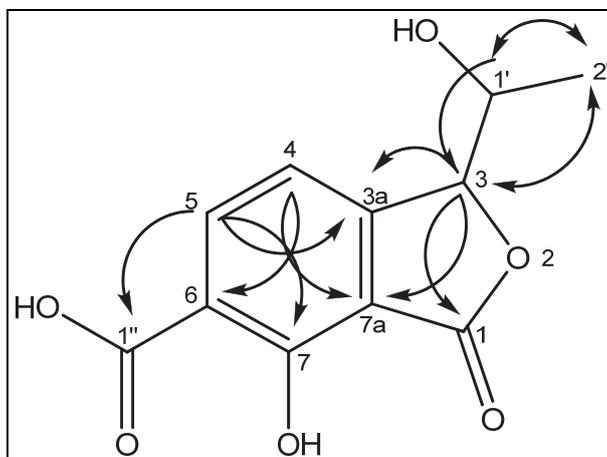


Abb. 69. HMBC-Korrelationen von 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure

### 3.8. Inhaltsstoffe aus *Hypoxylon fragiforme* (BT-III.1)

Der Stamm BT-III.1 aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* (Herkunft: Rheinbreitbach, Siebengebirge) konnte mittels molekularbiologischer Methoden als *Hypoxylon fragiforme* identifiziert werden. Aus der Kultivierung des Pilzes in kleinerem Maßstab auf Reismedium wurden 1.8 g EtOAc-Extrakt und 1.45 g MeOH-Extrakt gewonnen. Da die HPLC-Chromatogramme der Extrakte sehr ähnlich waren, wurde der EtOAc-Extrakt mit dem MeOH-Extrakt vereinigt und durch VLC fraktioniert. Aus dem vereinigten Extrakt BT-III.1-EM wurden mittels verschiedenen chromatographischen Auftrennungen acht Verbindungen isoliert. Aus der dritten VLC-Fraktion (BT-III.1-EM-V3) wurden Orsellinsäure und 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on (neuer Naturstoff) gewonnen. Aus der vierten VLC-Fraktion (BT-III.1-EM-V4) wurden folgende Mykotoxine isoliert: Scytalon, 4-Hydroxyscytalon, das Antibiotikum RF-3192-C, Mitorubrinsäure, Mitorubrinol und Cytochalasin H. Zur Festlegung der Strukturen wurden UV-Spektren, ESI-Massenspektren,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , COSY, HMQC und HMBC herangezogen.

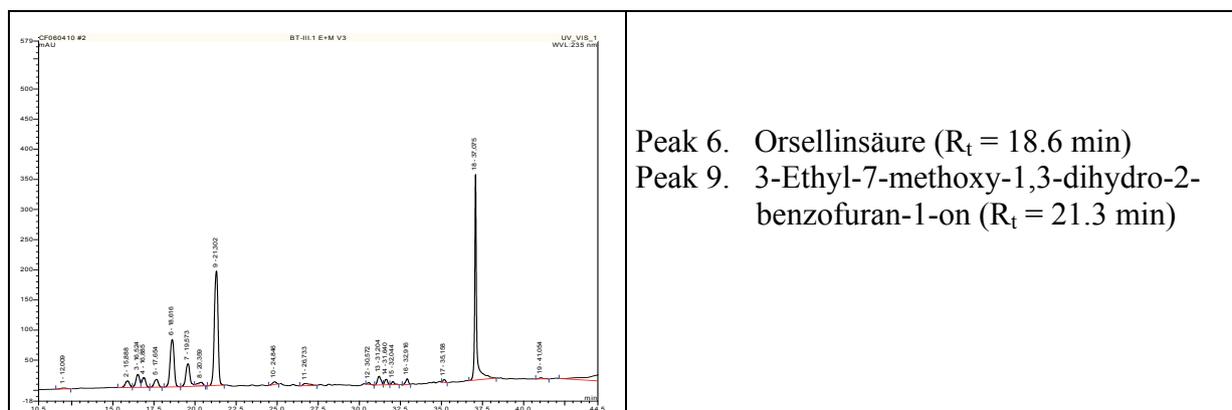


Abb. 70. HPLC-Chromatogramm der Fraktion BT-III.1-EM-V3

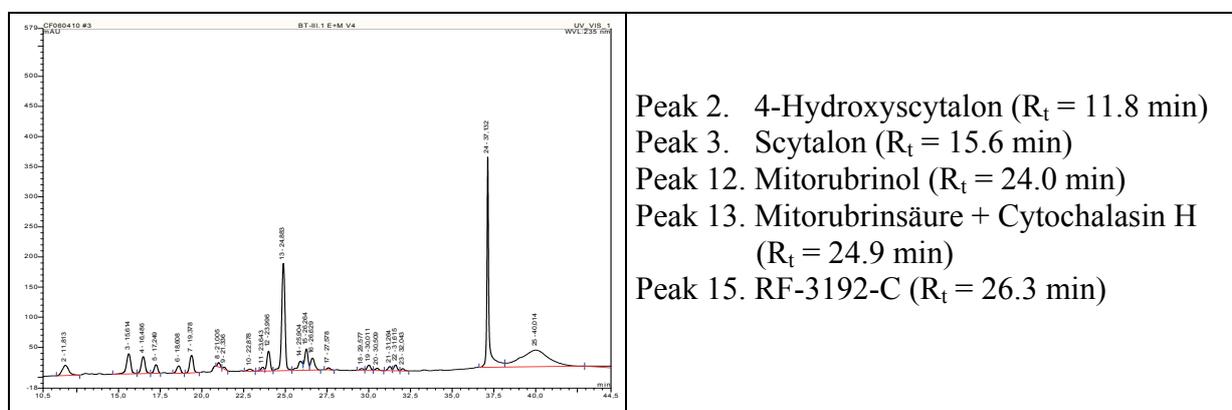
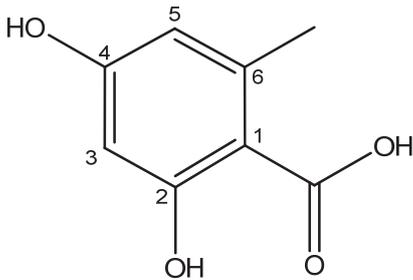
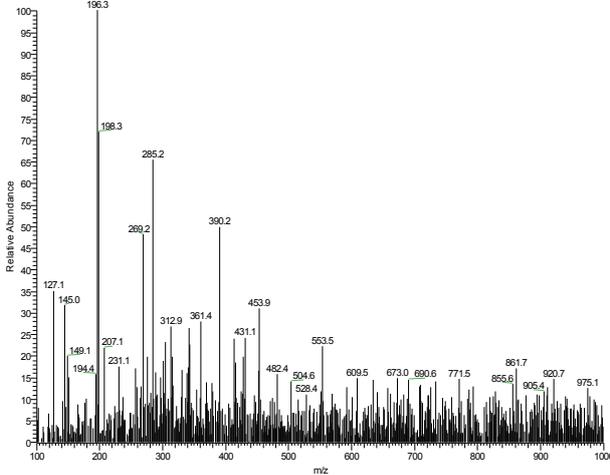
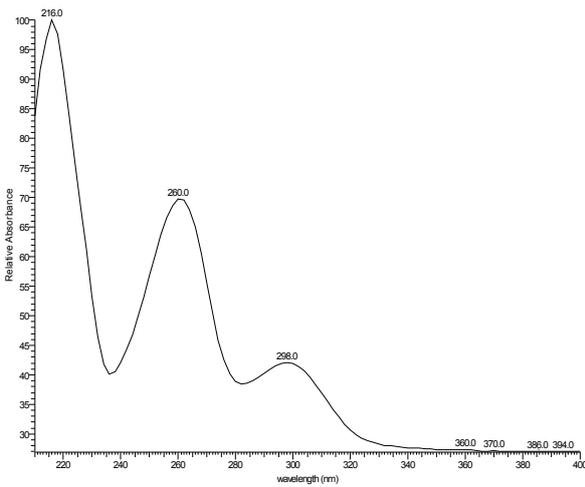
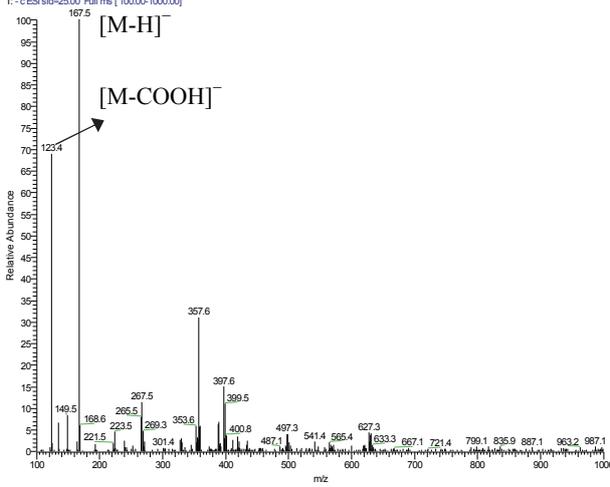


Abb. 71. HPLC-Chromatogramm der Fraktion BT-III.1-EM-V4

## 3.8.1. Orsellinsäure

<b>ORSELLINSÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäure
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V3-S9
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	3.6 mg
<b>Beschreibung:</b>	weißer Feststoff
<b>Summenformel:</b>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	168 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	16.2 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>BT-III-1 EMV3#405 RT: 11.79 AM: 1 NL: 4.69E5 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>BT-III-1 EMV3#1753 RT: 11.78 AM: 1 NL: 3.79E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>BT-III-1 EMV3#407 RT: 11.85 AM: 1 NL: 2.02E6 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Orsellinsäure wurde als weißer Feststoff (3.6 mg) mittels VLC und Sephadex-Säulenchromatografie aus dem vereinigten Ethylacetat-Methanol-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) gewonnen. Das UV-Spektrum der Substanz wies drei Maxima bei 216, 260 und 298 nm auf. Im ESI-MS wurde der Pseudomolekülionenpeak bei negativer Ionisierung bei  $m/z$  167  $[M-H]^-$  detektiert, so dass das Molekulargewicht sich auf 168 g/mol festlegen ließ. Im (-)-ESI-MS ließ sich zusätzlich ein charakteristisches Fragmentation bei  $m/z$  123  $[M-CO_2 -H]^-$  erkennen, das aus dem Verlust von  $CO_2$  resultierte und damit auf eine Carboxyfunktion hinwies.

Das in deuteriertem Methanol aufgenommene  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte im aromatischen Bereich die Signale zweier Methinprotonen bei 6.13 (H-3) und 6.19 ppm (H-5) sowie im aliphatischen Bereich die der aromatischen Methylprotonen bei 2.45 ppm (6- $CH_3$ ). Die *meta*-Kopplungskonstanten (2.4 Hz) der beiden Methingruppen wiesen auf ein Aromatenfragment hin, das wegen fehlender weiterer aromatischer Protonen im Protonenspektrum ein tetrasubstituierter Benzolring sein musste. Dem  $^{13}C$ -NMR-Spektrum waren Signale für eine Methylgruppe (24.4 ppm), eine Carboxygruppe (175.4 ppm) und sechs aromatischen Kohlenstoffatome (101.7, 105.9, 112.4, 145.4, 163.8 und 167.1 ppm) zu entnehmen. Die Signale bei 163.8 und 167.1 ppm waren charakteristisch für durch eine phenolische Hydroxygruppe entschirmte aromatische Kohlenstoffatome.

Die Verbindung wurde nach Vergleich der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Daten sowie UV- und Massenspektren mit aus der Literatur entnommenen Werten als Orsellinsäure identifiziert (Kloss und Clayton, 1965; Evans und Staunton, 1988; Gaisser *et al.*, 1997).

**Tabelle 27. NMR-Daten von Orsellinsäure**

Position	$\delta^1H$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 500 MHz)	$\delta^1H$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (Aceton- $d_6$ , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^{13}C$ (ppm) (MeOD, 125 MHz)	$\delta^{13}C$ (ppm) (Aceton- $d_6$ , 100 MHz) <sup>1</sup>
1	-	-	105.9	105.9
2	-	-	163.8	163.2
3	6.13, d (2.4)	6.21, d (2.3)	101.7	101.6
4	-	-	167.1	167.1
5	6.19, d (2.5)	6.27, d (2.3)	112.4	112.0
6	-	-	145.4	145.1
CH <sub>3</sub>	2.49, s	2.53, s	24.4	24.5
COOH	-	3.32, s	175.4	174.9
2-OH	-	6.20, br s	-	-
4-OH	-	5.53, br s	-	-

<sup>1</sup>Gaisser *et al.*, 1997

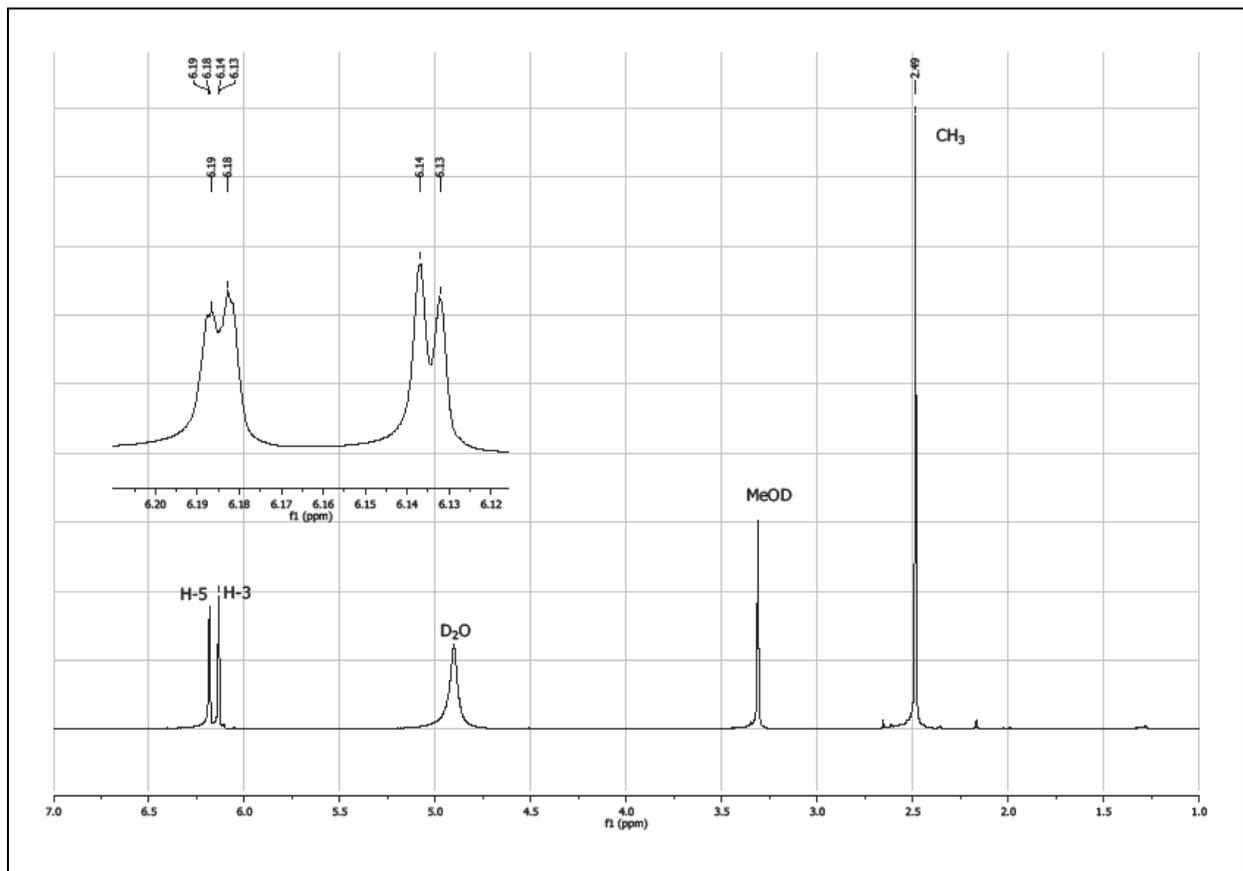


Abb. 72.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3 Orsellinsäure, gemessen in  $\text{MeOD}$  (500 MHz)

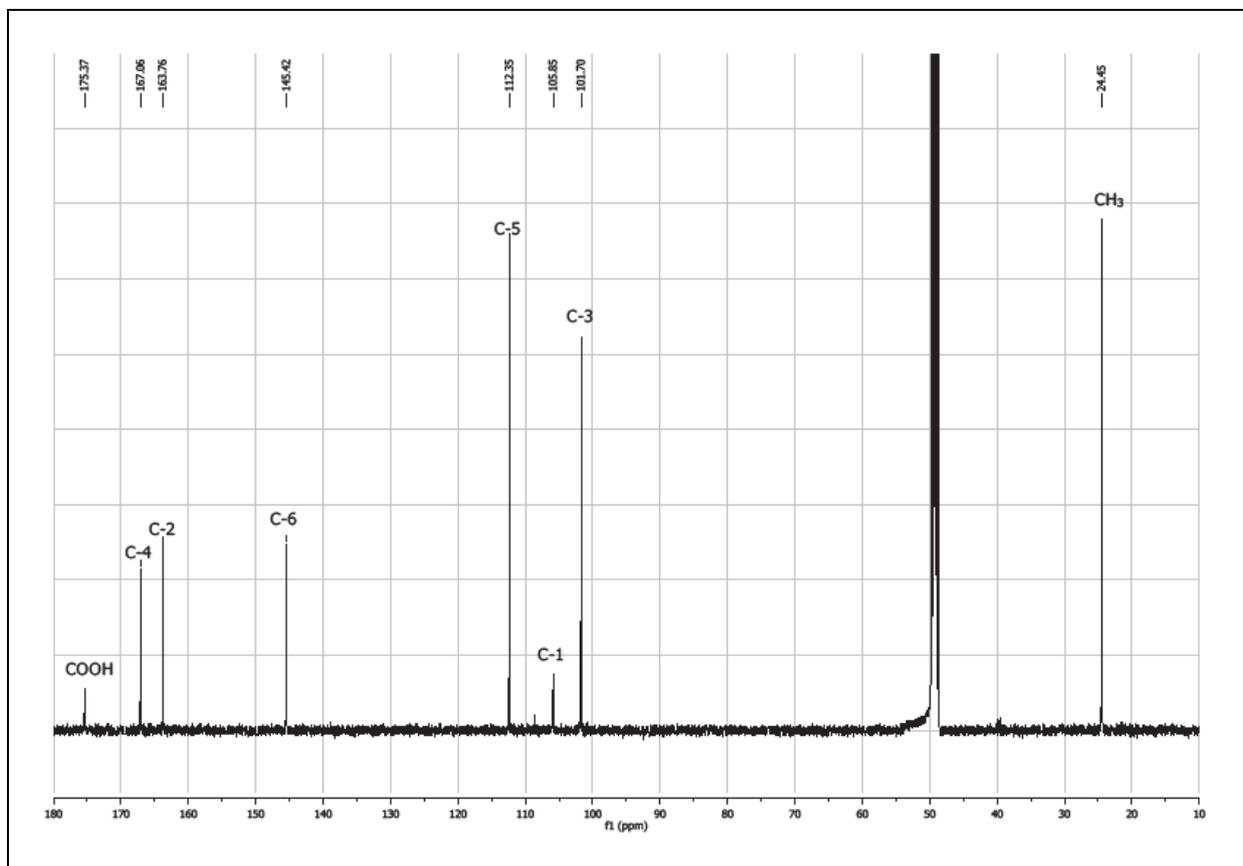
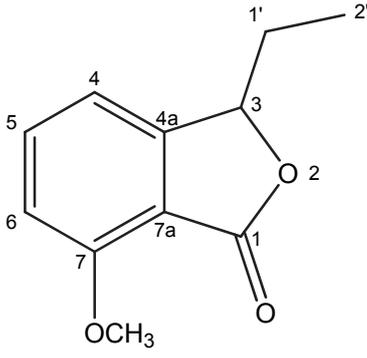
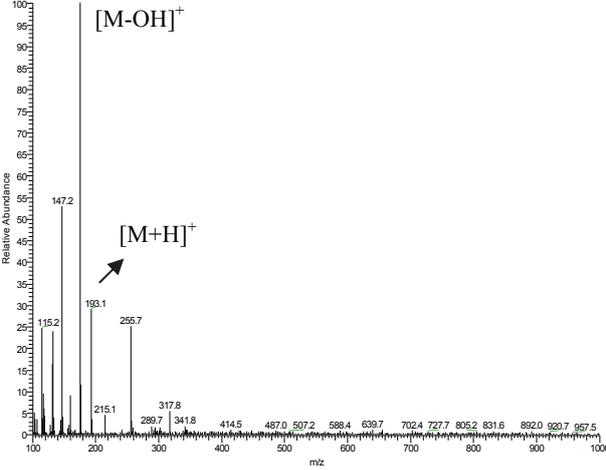
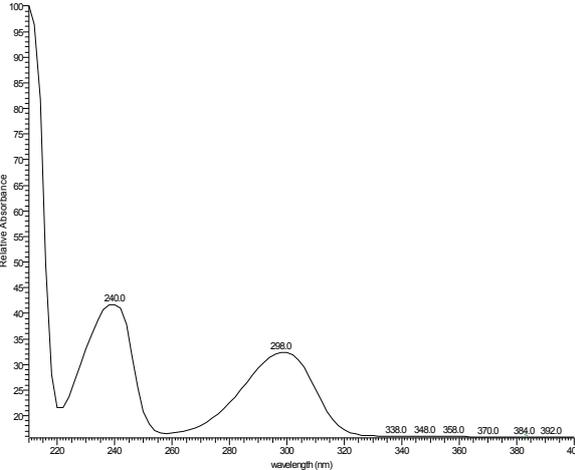
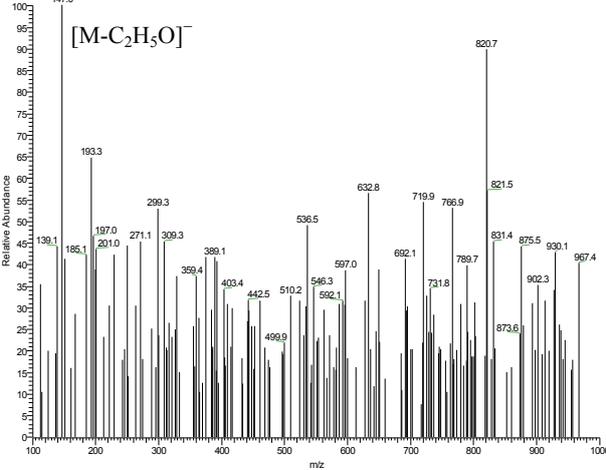


Abb. 73.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Orsellinsäure, gemessen in  $\text{MeOD}$  (500 MHz)

## 3.8.2. 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on (neuer Naturstoff)

<b>3-ETHYL-7-METHOXY-1,3-DIHYDRO-2-BENZOFURAN-1-ON</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-ethyl-7-methoxy-3H-2-benzofuran-1-on
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V3-S4
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	15.1 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Öl
<b>Summenformel:</b>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	192 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-23.9° (c, 0.5 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	21.2 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b>  <small>Cleia246 #517 RT: 15.51 AV: 1 NL: 9.88E5  T: +c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 
<p><b>UV-Spektrum</b>  <small>Cleia246 #2314 RT: 15.52 AV: 1 NL: 6.40E5 microAU</small></p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b>  <small>Cleia246 #516 RT: 15.48 AV: 1 NL: 2.09E4  T: -c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 

Dieses neue Phthalid (15.1 mg) wurde aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) durch Auftrennung über VLC und Sephadex-Säulenchromatographie isoliert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima von 208, 240 und 298 nm. Das hochaufgelöste TOF-Massenspektrum zeigte bei positiver Ionisierung den Basispeak bei  $m/z$  193.084  $[M+H]^+$  (berechneter Wert von 193.0859,  $\Delta$  -9.8 ppm), woraus ein Molekulargewicht von 192 Da und die Summenformel als  $C_{11}H_{12}O_3$  abgeleitet wurde.

Im Tieffeldbereich des in MeOD aufgenommenen Protonenspektrums waren drei partiell überlappende aromatische Protonen bei 7.70 (H-5) und 7.09 ppm (H-4/H-6) mit einer Kopplungskonstante von 7.9 Hz zu erkennen, was auf einen 1,2,3-trisubstituierten Aromaten hindeutete. Weiterhin wurden ein Oxymethinproton bei 5.46 ppm (H-3), eine Methoxygruppe bei 3.96 ppm (7-OCH<sub>3</sub>), eine Methylengruppe (H<sub>2</sub>-1') bei 2.13 und 1.78 ppm sowie eine Methylgruppe (H<sub>3</sub>-2') bei 0.93 ppm beobachtet. Die <sup>13</sup>C-NMR-, HMBC-, HMQC- und DEPT-Spektren gaben Aufschluss über das Vorhandensein von einer Methyl-, einer Methoxy-, einer Methylene- und vier Methingruppen sowie von vier quartären Kohlenstoffatomen. Die Zuordnung von C-3, C-4, C-5, C-6, 7-OCH<sub>3</sub>, C-1' und C-2' ergab sich aus den Direktkorrelationen im HMBC-Spektrum und wurde durch das HMQC-Spektrum bestätigt. Mithilfe der Korrelationen im COSY-Spektrum konnten die aliphatischen Protonen H<sub>2</sub>-1' und H<sub>3</sub>-2' dem gemeinsamen Spinsystem eines Ethylsubstituenten zugeordnet werden. Auch das Spinsystem des 1,2,3-trisubstituierten Benzolrings konnte hier deutlich detektiert werden. Die HMBC-Kopplungen von H-4 zu C-6 und C-7a, sowie von H-5 zu C-3a und C-7 belegten den Ringschluss. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum war C-7 stark tieffeldverschoben (160.1 ppm), was durch die Methoxygruppe als Substituent erklärt werden konnte. Die chemische Verschiebungen von C-3 (83.2 ppm) und C-1 (171.3) zeigten das Vorkommen eines Lactonrings an. Mithilfe der Kopplungen im HMBC von H-3 zu C-3a, C-7a und C-1 sowie der lange-range-Korrelation von H-3 zu H-4 im COSY-Spektrum konnte dieser einem  $\gamma$ -Lactonring zugeordnet werden, wobei sich der Ringschluss zwischen C-1 und C-3 über das Heteroatom auch aus der Betrachtung des Molekulargewichtes ableiten ließ. Die Kopplungen im COSY-Spektrum von H-3 zu H<sub>2</sub>-1', sowie im HMBC von H-3 zu C-2' und von H<sub>2</sub>-1' zu C-3 machten deutlich, dass der Isobenzofuransubstituent an C-3 mit der Ethylgruppe verknüpft war.

Die Substanz wurde bislang nur als Syntheseprodukt beschrieben (Anstiss *et al.*, 2002; Clayden *et al.*, 2005). Die Struktur besitzt ein Stereozentrum, die optische Drehung betrug  $[\alpha]_D^{20}$  -23.9 (c, 0.5 in MeOH) und wich damit von dem Literaturwert von  $[\alpha]_D^{20}$  + 69.1 (c, 0.11 in Aceton) ab (Clayden *et al.*, 2005). Dies könnte in einer stark links (-) drehenden

Verunreinigung begründet liegen, die den ermittelten Drehwert beeinflussen hat oder es handelt sich hier um das Stereoisomer mit der umgekehrten absoluten Konfiguration.

**Tabelle 28. NMR-Daten von 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz)	Isochracein $\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (MeOD, 125 MHz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	-	-	171.3	-	-
3	5.46, dd (6.9, 4.1)	5.50, dd (7.0, 4.0)	83.2	1'A, 1'B	1, 3, 4a, 1', 2'
3a	-	-	154.4	-	-
4	7.09, d (7.9) <sup>a</sup>	6.90, d (8.0)	115.0	5	-
5	7.70, t (7.9),	7.58, d (8.0)	138.2	4, 6	3, 4a, 5, 6, 7
6	7.09, d (7.9) <sup>a</sup>	6.92, d (8.0)	112.2	5	1, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 7a-
7	-	-	160.1	-	-
7a	-	-	114.4	-	-
1'A	2.13, tdd (4.3, 14.8, 7.4)	2.15, m	28.7	2, 1'B	3, 4a, 2'
1'B	1.78, tt (14.5, 7.3)	1.88, m		2, 1'A	
2'	0.93, t (7.4)	1.03, t (7.0)	9.0	1'A, 1'B	3, 1', 2'
7-OCH <sub>3</sub>	3.96, s	-	58.5	-	-
7-OH	-	7.82, s	-	-	-

<sup>1</sup>Clayden *et al.*, 2005

<sup>a</sup>Signalüberlappung

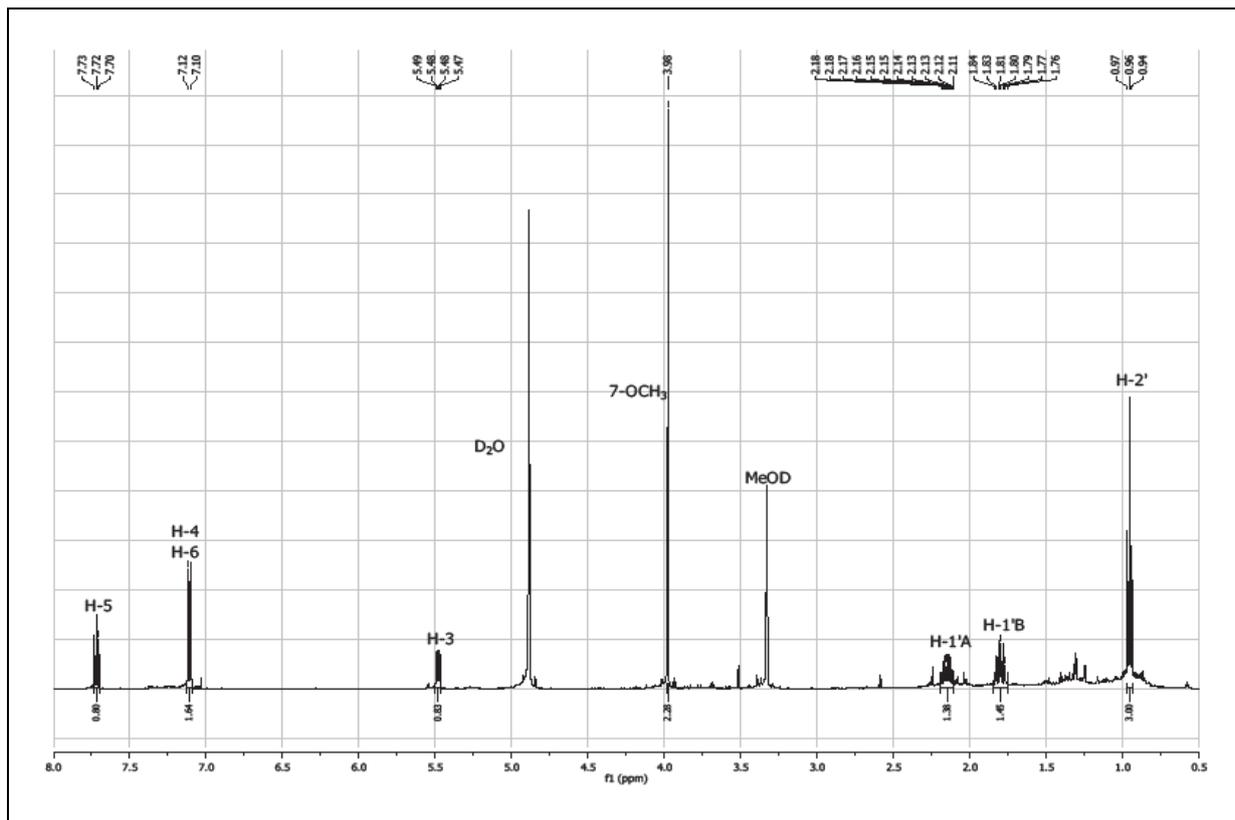


Abb. 74.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on, gemessen in MeOD (500 MHz)

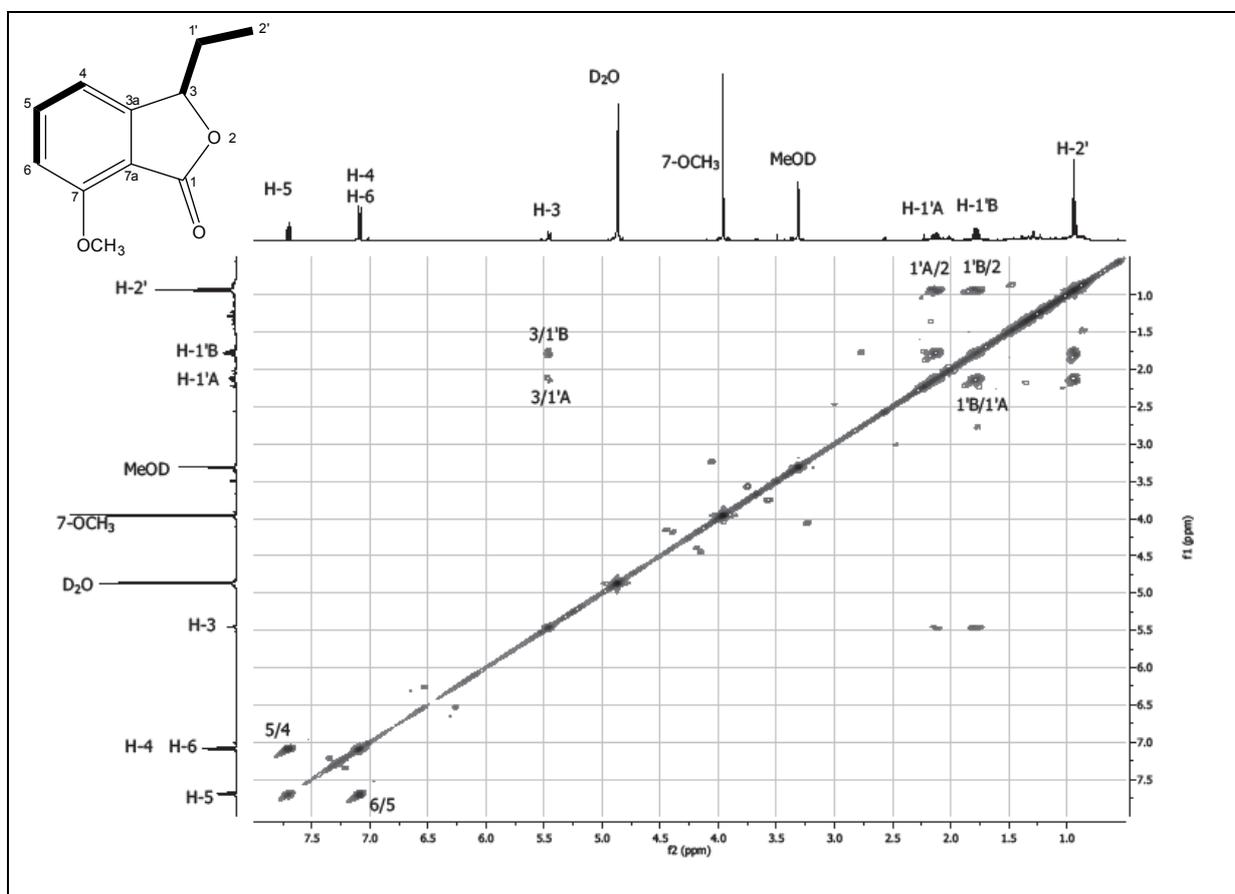


Abb. 75. COSY-Spektrum von 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on, gemessen in MeOD (500 MHz)

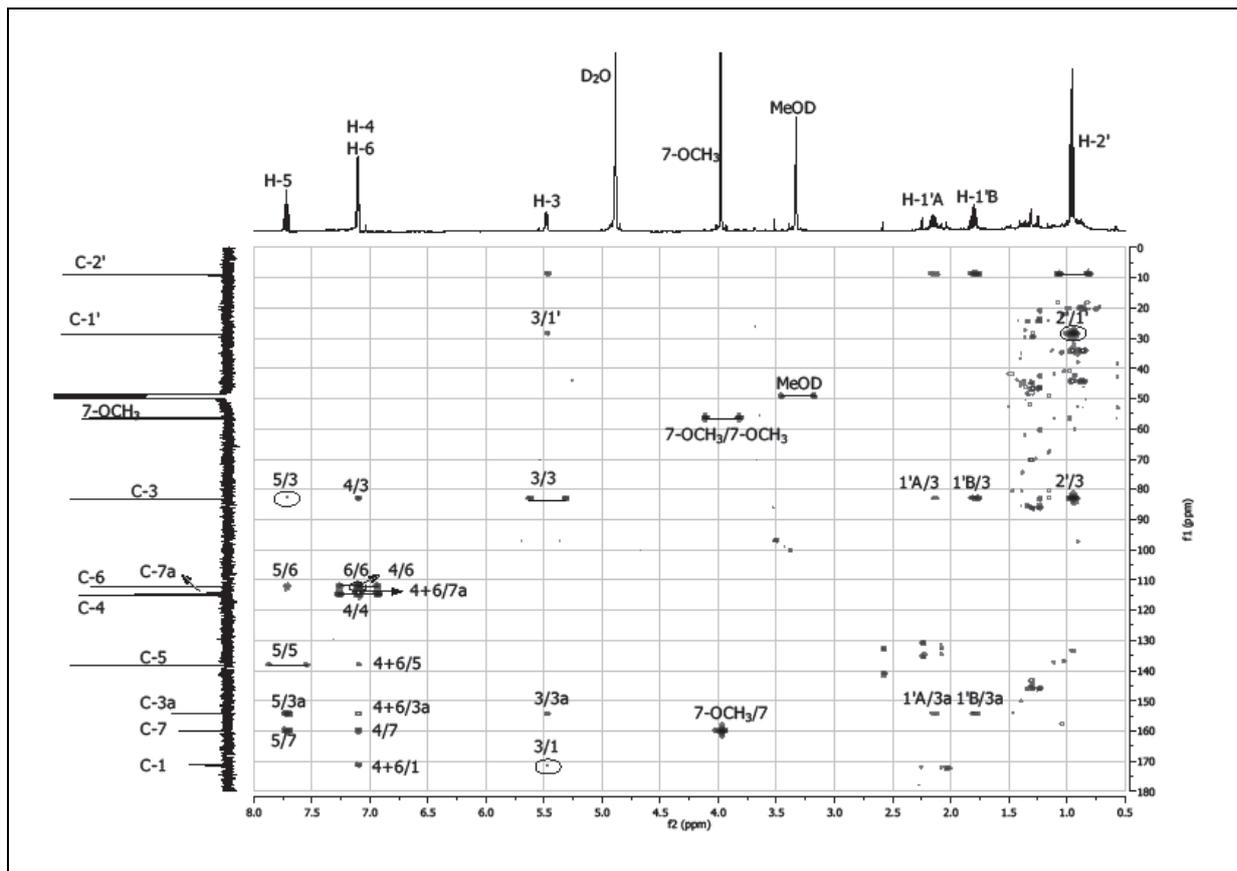


Abb. 76. HMBC-Spektrum von 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on, gemessen in MeOD (500 MHz)

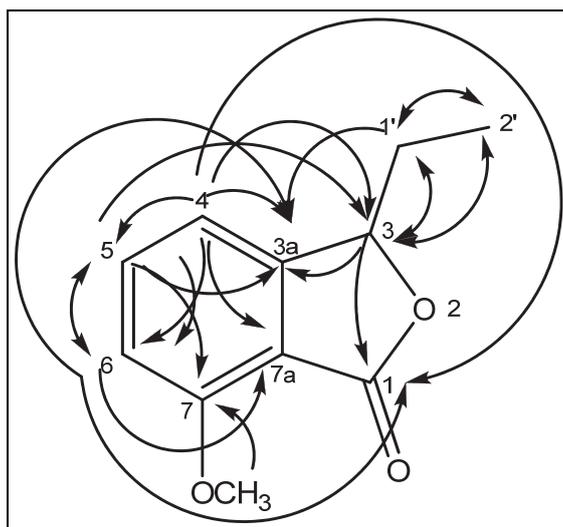
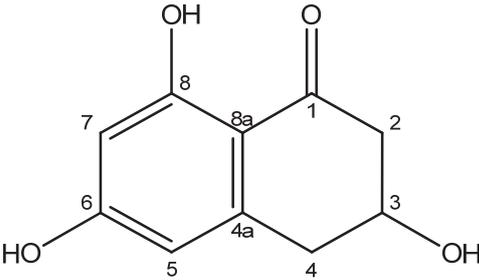
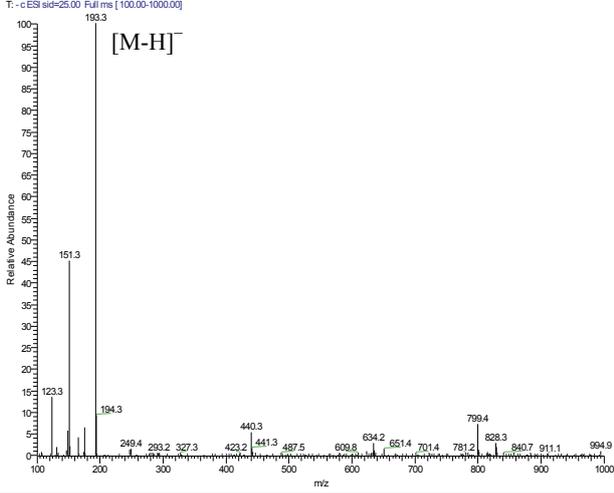
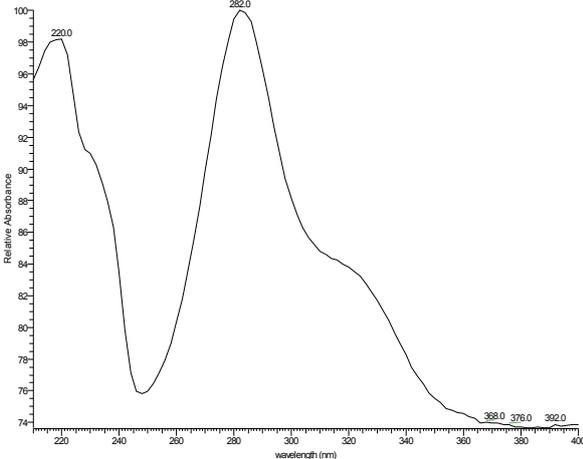
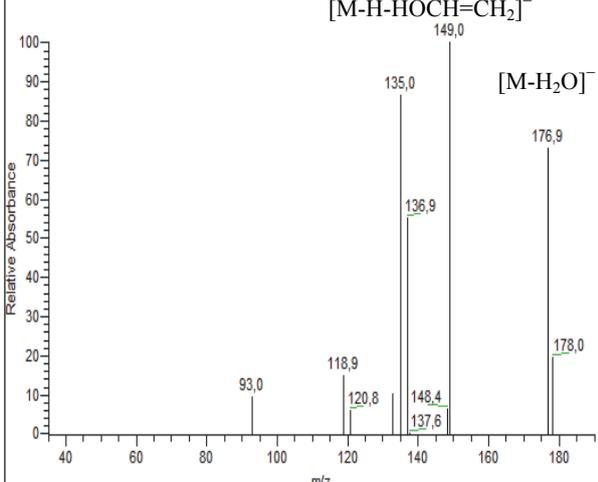


Abb. 77. HMBC-Korrelationen von 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on

## 3.8.3. Scytalon

<b>SCYTALON</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-on
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S32-33
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	8.0 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	194 g/mol
<b>Drehwert</b> [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> :	+5.4° (c, 1.0 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	15.6 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (-)</b> <small>Cleas247 #218 RT: 6.39 AV: 1 NL: 2.35E6 T: - c ESI: sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small> 
<b>UV-Spektrum</b> <small>Cleas247 #620 RT: 6.23 AV: 1 NL: 1.37E5 microAU</small> 	<b>ESI-MS (-) Vergrößerung</b> <small>BT-III.1EM-V4-S32-33 #0 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.42E4 microAU</small> 

Scytalon wurde mittels VLC und Sephadex-Säulenchromatographie aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) gewonnen. Das UV-Spektrum der Verbindung zeigte Maxima bei 220 und 282 nm. Mittels ESI-MS konnte das Molekulargewicht als 194 g/mol festgelegt werden, woraus sich in Übereinstimmung mit den NMR-Daten die Summenformel zu  $C_{10}H_{10}O_4$  ermitteln ließ. Im ESI-Spektrum wurde bei negativer Ionisierung der Basispeak bei  $m/z$  149  $[M-H-44]^-$  beobachtet, welcher sich aus einer „reverse Diels-Alder“-Fragmentierung ergibt. Dies ist ein typisches Massenfragment für 1-Tetralone, welches durch die Abspaltung von  $HOCH=CH_2$  entsteht (Findlay und Kwan, 1973, Bell *et al.*, 1976).

Die aus dem HMBC-Spektrum entnommenen  $^{13}C$ -NMR-Daten (s. Tab. 29) zeigten Signale für zwei Methylen-, eine aliphatische und zwei olefinische Methingruppen sowie für fünf quartäre Kohlenstoffatome. Das in MeOD gemessene  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte zwei *meta*-koppelnde Protonen bei 6.23 (H-5) und 6.11 ppm (H-7), die sich an einem tetrasubstituierten Benzolring befanden. Weiterhin wurde ein aliphatisches Methinproton bei 4.26 ppm (H-3) beobachtet, das im COSY-Spektrum Korrelationen zu zwei Methylengruppen (H<sub>2</sub>-2 und H<sub>2</sub>-4) aufwies. Weiterhin deutete das entsprechende  $^{13}C$ -Signal der aliphatischen Methingruppe bei 66.9 ppm (C-3) auf einen Sauerstoffsubstituenten hin. Die beiden Kohlenstoffatome C-6 und C-8 mit überlappenden Signalen bei 166.8 ppm konnten aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung als phenolisch bestimmt werden, wohingegen sich das Signal bei 202.4 ppm einem zyklischen Keton zuordnen ließ. Die im HMBC-Spektrum beobachteten Korrelationen von H<sub>2</sub>-4 zu C-4a, C-5 und C-8a ließen die Position der Verknüpfung des aromatischen Ringes mit dem aliphatischen Sechsring erkennen. Die Korrelationen von H<sub>2</sub>-2 zu C-1 und C-8a lieferten Erkenntnisse auch über die Stellung der Carbonylgruppe an der Position 1.

Durch Vergleich der Kopplungskonstanten mit den Literaturdaten (Bardshiri und Simpson, 1983) ließ sich für die Hydroxygruppe an C-3 eine äquatoriale Orientierung vermuten. Die Kopplungskonstante ( $^3J = 7.6$  Hz) zwischen den Protonen H-3 und H-2B entsprach einer *trans*-diaxialen Anordnung, während H-3 und H-4A ( $^3J = 3.8$  Hz) eine axial-äquatoriale Orientierung belegen musste (s. Tab. 29).

Die absolute Stereochemie des Naturstoffes konnte trotz gemessenem Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} +5.4^\circ$  (c, 1.0 in MeOH) nicht festgelegt werden, da es sich bei der Probe um ein Gemisch aus Scytalon und 4-Hydroxyscytalon handelte. Außerdem ist nach Angaben der Literatur die optische Drehung des Scytalones sehr gering ( $[\alpha]_D^{20} +1.9 \pm 0.5$ , c = 0.5 in 95%

EtOH) und kann nicht als Kriterium zur Analyse der Enantiomeren aus natürlichen Quellen verwendet werden (Fabrice und Michel, 1990).

Tabelle 29. NMR-Daten von Scytalon

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> , 360 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> , 25 MHz) <sup>2</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (MeOD, 125 MHz) <sup>3</sup>	HMBC (H→C)
1	-	-	202.1	202.4	-
2A	2.84, ddd (17.1, 3.9, 1.0)	2.85, m <sup>a</sup>	47.1	47.4	1, 4
2B	2.62, ddd (17.1, 7.8, 1.1)	2.62, dd (17.0, 7.6)			1, 3, 4, 8a
3	4.31, sept (3.9)	4.26, sept (3.8)	66.4	66.9	1
4A	3.20, dddd (16.1, 3.8, 1.1, 1.1)	3.09, dd (15.8, 3.8)	38.9	38.9	2, 3, 4a, 5, 8a
4B	2.86, ddddd (16.1, 7.8, 1.1, 1.0, 0.6)	2.86, m <sup>a</sup>			2, 3, 4a, 5, 8a
4a			145.8	146.0	-
5	6.28, dt (1.1, 2.2)	6.23, d (2.2)	108.9	109.7	4, 6, 7, 8, 8a
6	-	-	165.4	166.8 <sup>b</sup>	-
7	6.15, dd (2.2, 0.6)	6.11, d (2.2)	101.3	101.4	5, 6, 8, 8a
8	-	-	166.0	166.8 <sup>b</sup>	-
8a	-	-	111.5	111.7	-

<sup>1</sup> Bardshiri und Simpson, 1983  
HMBC-Spektrum entnommen

<sup>2</sup> Seto und Yonehara, 1977  
<sup>a, b</sup> Signalüberlappung

<sup>3</sup> aus

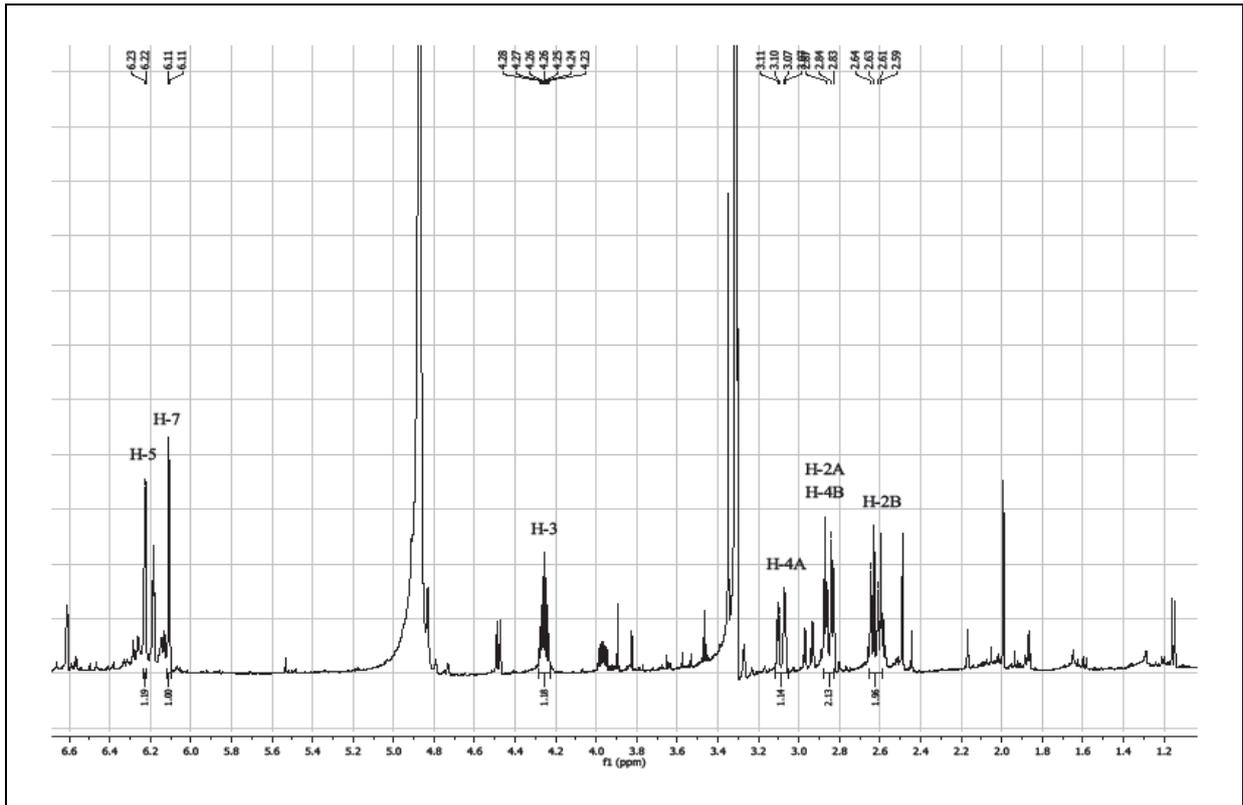


Abb. 78.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Scytalon, gemessen in MeOD (500 MHz)

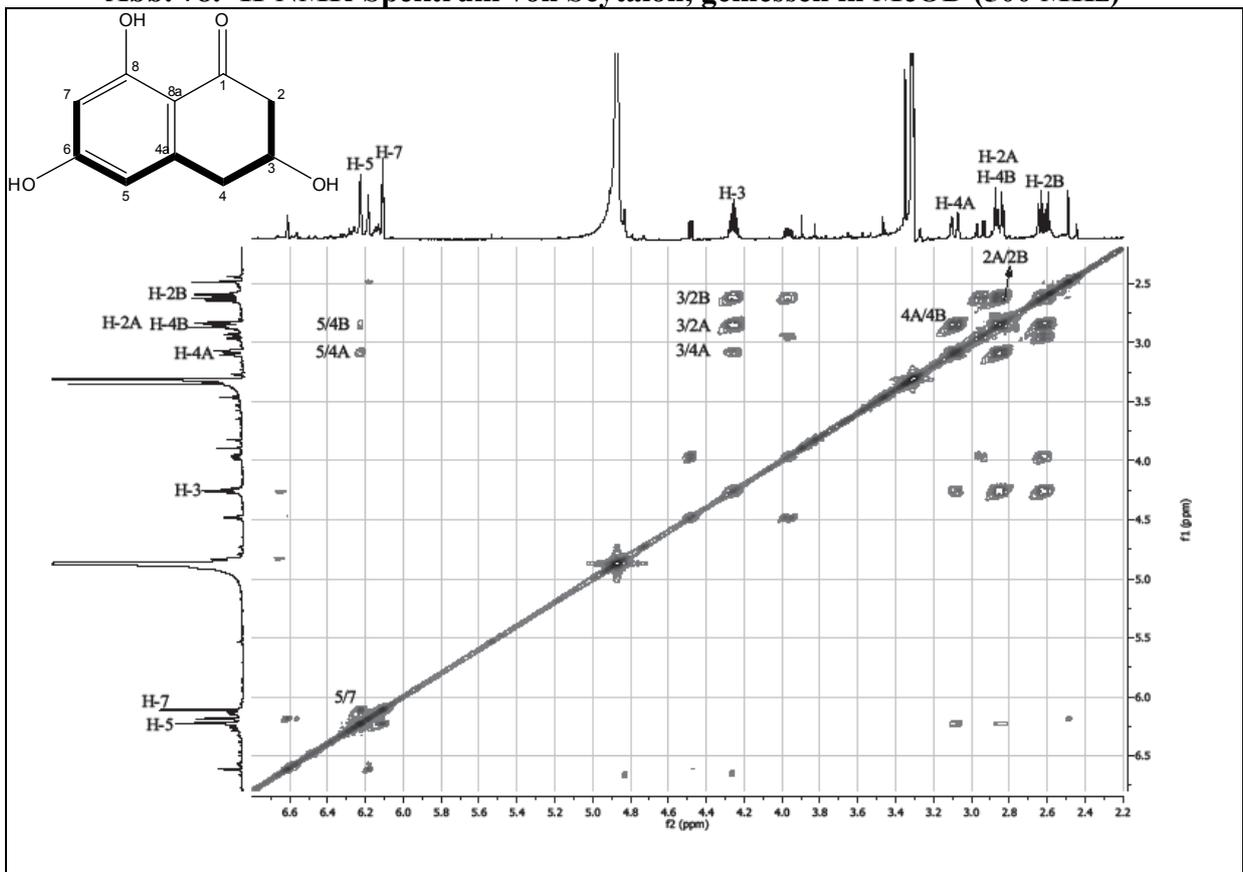
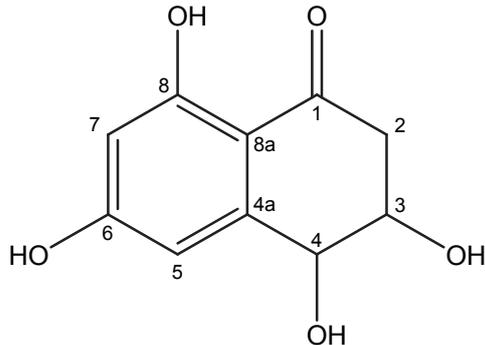
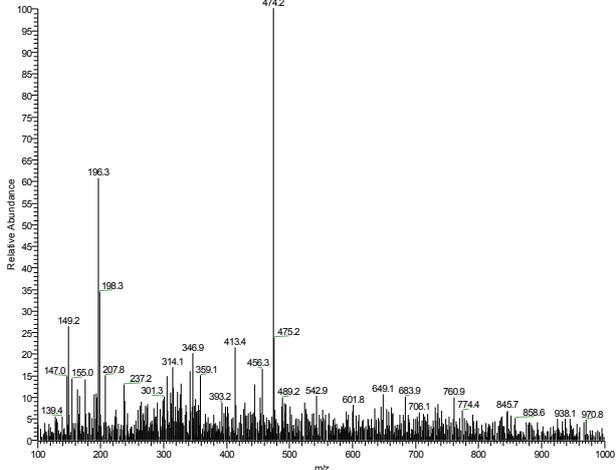
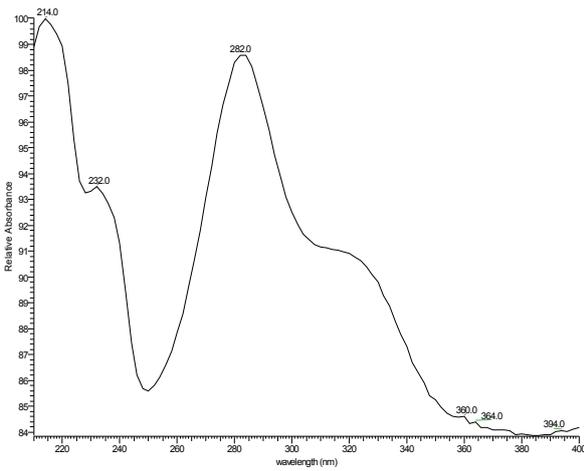
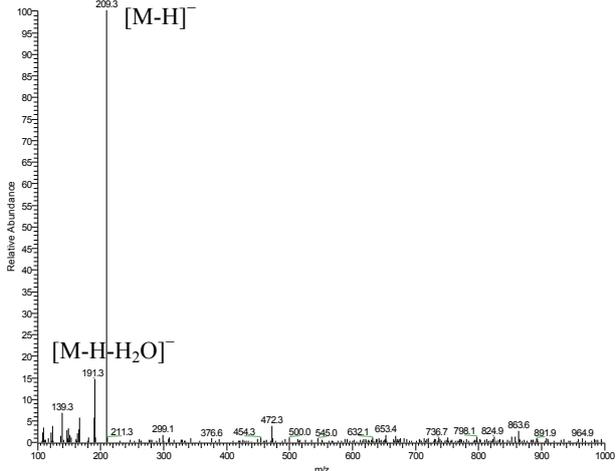


Abb. 79. COSY-Spektrum von Scytalon, gemessen in MeOD (500 MHz)



## 3.8.4. 4-Hydroxyscytalon

<b>4-HYDROXYSCYTALON</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3,4-Dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxynaphthalen-1(2H)-on
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S32-33
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	8.0 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	210 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	11.8 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>Cleia247 #131 RT: 3.86 AM: 1 NL: 4.81E5 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p style="text-align: center;">*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>Cleia247 #544 RT: 3.72 AM: 1 NL: 1.20E5 microAU</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>Cleia247 #129 RT: 3.80 AM: 1 NL: 1.35E6 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

4-Hydroxyscytalon wurde mittels VLC und Sephadex-Säulenchromatographie aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) als Gemisch mit der Hauptkomponente Scytalon gewonnen. Das UV-Spektrum der Verbindung zeigte mit Maxima bei 214, 232 und 282 nm eine gute Übereinstimmung mit dem der strukturell verwandten Verbindung Scytalon. Im ESI-Massenspektrum zeigte die Substanz einen Molekülionpeak bei  $m/z = 209$   $[M-H]^-$ , somit wies das Molekulargewicht von 210 Da eine Massendifferenz von 16 amu zu Scytalon auf.

Sowohl das  $^1\text{H-NMR}$ - wie auch das COSY-Spektrum von 4-Hydroxyscytalon und Scytalon zeigten weitgehende Übereinstimmung. Ein Unterschied konnte lediglich in der zusätzlichen Hydroxylierung an Position 4 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Scytalon war bei 4-Hydroxyscytalon dementsprechend im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum an Position 4 ein tieffeldverschobene aliphatische Methinproton (4.48 ppm) statt einer Methylengruppe zu erkennen. Mit Hilfe des COSY-Spektrums konnte die Verknüpfung von H-4 mit dem aromatischen Proton H-5 und der Methingruppe H-3 beobachtet werden. Die Kopplungskonstante von 7.6 Hz zwischen den Protonen H-4 und H-3 wies auf eine axial-axiale Anordnung zueinander hin, und ließ somit den Schluß zu, dass es sich hier um ein Stereoisomer mit *trans*-Anordnung des vicinalen Diols an Position 3 und 4 handelte (Iwasaki *et al.* 1972; Iwasaki *et al.* 1973).

Da es hier sich um ein Gemisch handelt, in dem Scytalon die Hauptkomponente darstellte, war es nicht möglich, den Drehwert für 4-Hydroxyscytalon zu bestimmen.

**Tabelle 30. NMR-Daten von 4-Hydroxyscytalon**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (Aceton- $d_6$ ) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (MeOD, 500 MHz)	COSY (H→H)
2A <sub>eq</sub>	3.03, q (5.0, 17.5)	2.95, dd (17.0, 4.4)	2B, 3
2B <sub>ax</sub>	2.68, q (8.0, 17.5)	2.62, ddd (17.0, 8.8, 1.3)	2A, 3
3 <sub>ax</sub>	4.01, m	3.97, ddd (8.8, 7.6, 4.3)	2A, 2B, 4
4 <sub>ax</sub>	4.54, d (8.0)	4.48, d (7.6)	3, 5
5	6.70, d (2.5)	6.61, dd (2.5, 0.9)	4, 7
7	6.26, d (2.5)	6.18, d (2.2)	5

<sup>1</sup>Iwasaki *et al.*, 1973

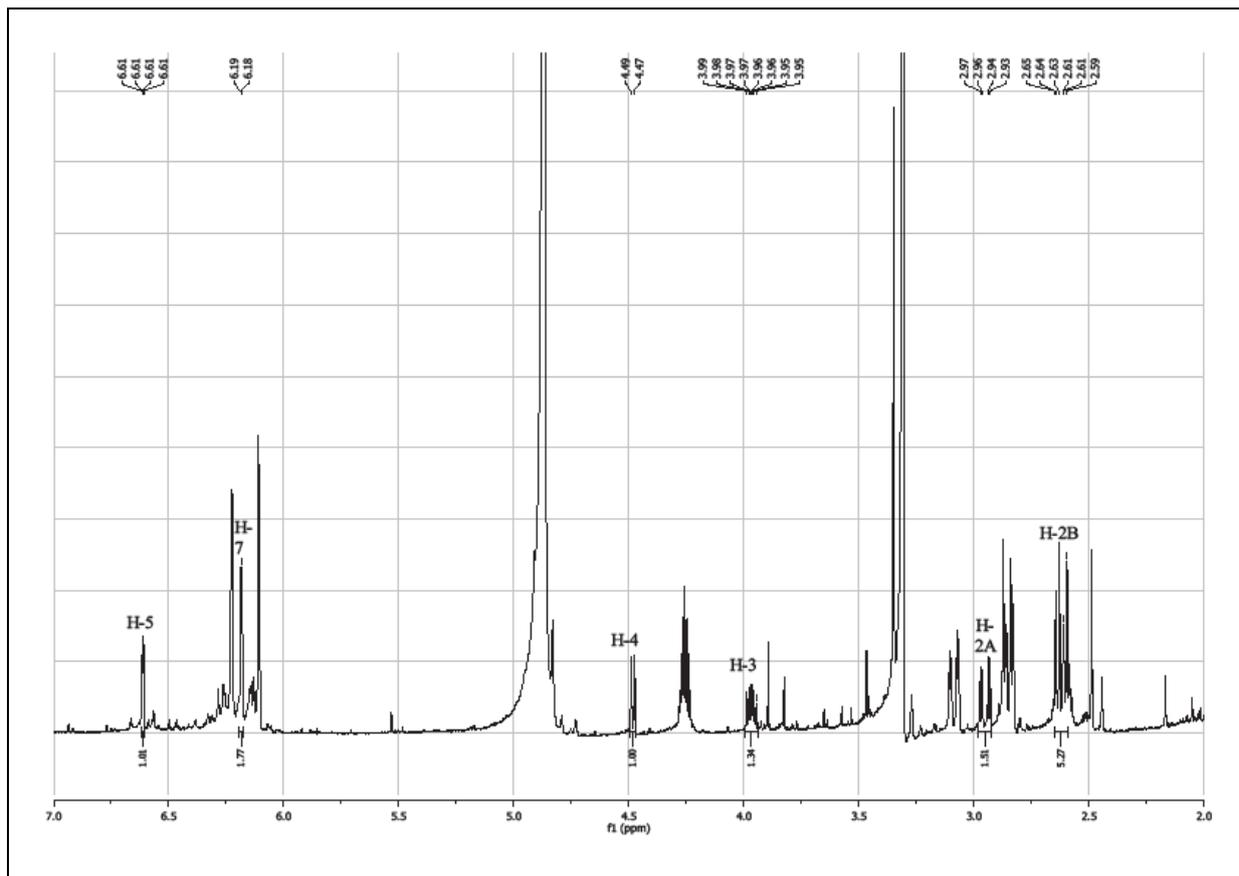


Abb. 81.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 4-Hydroxyscytalon, gemessen in MeOD (500 MHz)

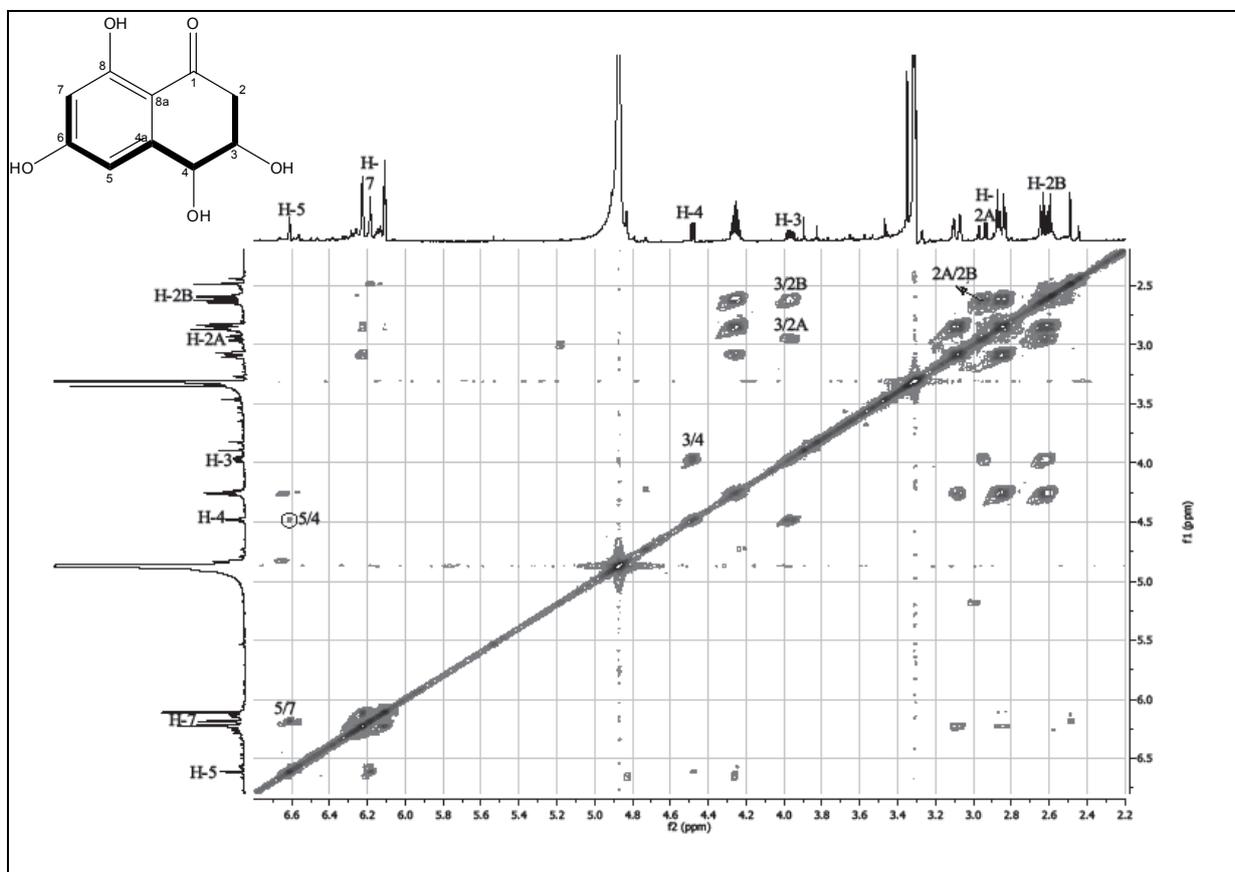
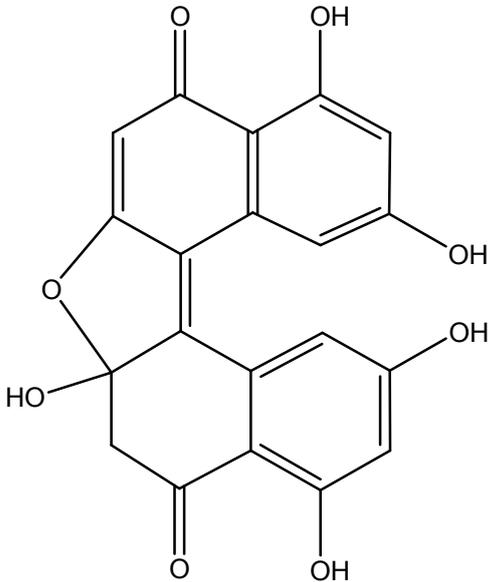
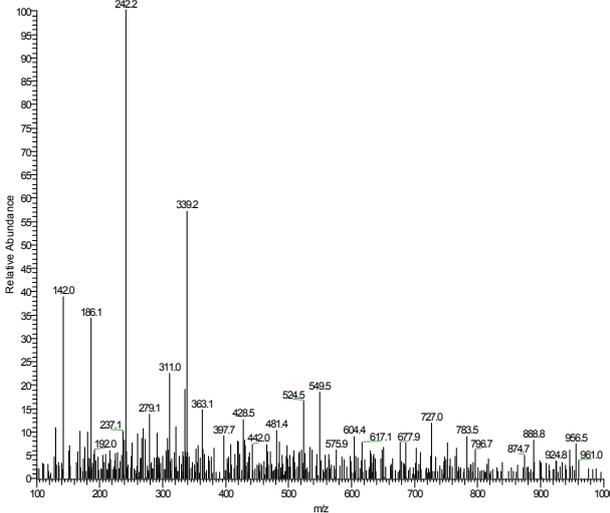
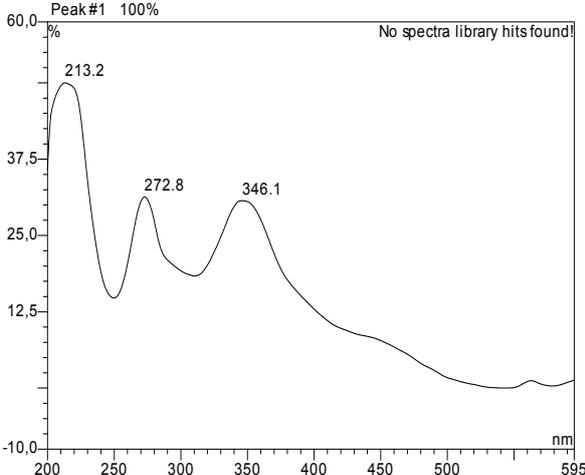
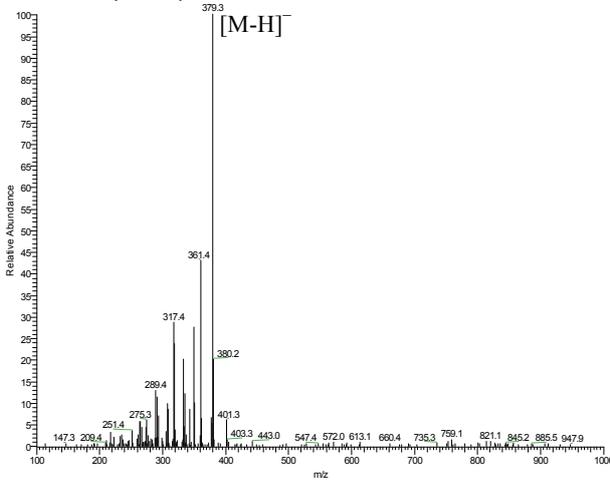


Abb. 82. COSY-NMR-Spektrum von 4-Hydroxyscytalon, gemessen in MeOD (500 MHz)

## 3.8.5. RF-3192-C

RF-3192-C	
<b>Systematischer Name:</b>	6,6a-Dihydro-2,4,6a,10,12-pentahydroxynaphtho[2,1,2,3-bcd]furan-5,9-dion
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S53-60
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	2.1 mg
<b>Beschreibung:</b>	orange Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	380 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	+47.6° (c, 0.1 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	26.6 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>BT-III-1 EM/V4 S2 #627 RT: 18.89 AL: 1 NL: 2.65E5 T: +c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>Peak#1 100%</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>BT-III-1 EM/V4 S2 #625 RT: 18.83 AL: 1 NL: 1.19E6 T: -c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Dieses Bisnaphthalenderivat wurde mittels VLC und Sephadex-Säulenchromatographie aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) isoliert. Die Verbindung wurde durch Abgleich des aufgezeichneten UV-Spektrums mit der internen UV/Vis-Spektrenbibliothek und anhand der ESI-Massenspektren als das Antibiotikum RF-3192C identifiziert. Mit Hilfe des ESI-MS-Spektrums wurde das Molekulargewicht auf 380 g/mol festgelegt. Das UV-Spektrum zeigte übereinstimmende Maxima bei 213, 272 und 346 nm. Die eindeutige Übereinstimmung der  $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit den Werten aus der Literatur konnte die Identität der Substanz bestätigen. Für die optische Drehung wurde ein Wert von  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +47.6^\circ$  (c, 0.1 in MeOH) gemessen. Die absolute Konfiguration der Substanz sowie ihre optische Drehung wurden in der Literatur nicht berichtet (Yoshida *et al.* 1994). Ihre Stereochemie konnte wegen der geringen Probemenge auch im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Das in  $\text{DMSO-}d_6$  gemessene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zwölf Protonensignale, davon fünf Singuletts für die austauschbaren Protonen der Hydroxygruppen mit chemischer Verschiebungen von 8.13 (3'-OH), 11.33 (6-OH), 10.70 (6'-OH), 12.57 (8'-OH) und 13.86 ppm (8-OH). Mit Hilfe des COSY-Spektrums wurden im aromatischen Bereich zwischen 6.37 und 7.13 ppm zwei Paare *meta*-koppelnder Protonen H-5/H-7 und H-5'/H-7' identifiziert. Weiterhin erschien im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Singulettsignal für das olefinische Proton H-2 bei 5.76 ppm sowie zwei Dubletts bei 3.24 und 3.43 ppm für die beiden diastereotopen Methylenprotonen an der Position 3. Die Zuordnung der Signale basierte überwiegend auf dem Vergleich der NMR-Daten mit aus der Literatur entnommenen Werten (Yoshida *et al.* 1994; Bode und Zeeck, 2000), da aufgrund der geringen Substanzmenge keine HMBC- oder HMQC-spektren aufgenommen werden konnten.

Tabelle 31. NMR-Daten von RF-3192C

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) ( $\text{DMSO-}d_6$ ) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)
2'A	3.41, d (16.8)	3.43, d (16.8)
2'B	3.23, d (16.8)	3.24, d (16.8)
5'	7.10, d (2.0)	7.13, d (1.8)
7'	6.46, d (2.2)	6.49, d (1.8)
2	5.84, s	5.76, s
5	7.51, d (2.0)	7.51, d (1.9)
7	6.36, d (2.2)	6.37, d (1.9)
6-OH	11.34, s	11.33, s
8-OH	13.86, s	13.86, s
3'-OH	-	8.13, s
6'-OH	10.71, s	10.70, s
8'-OH	12.57, s	12.57, s

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

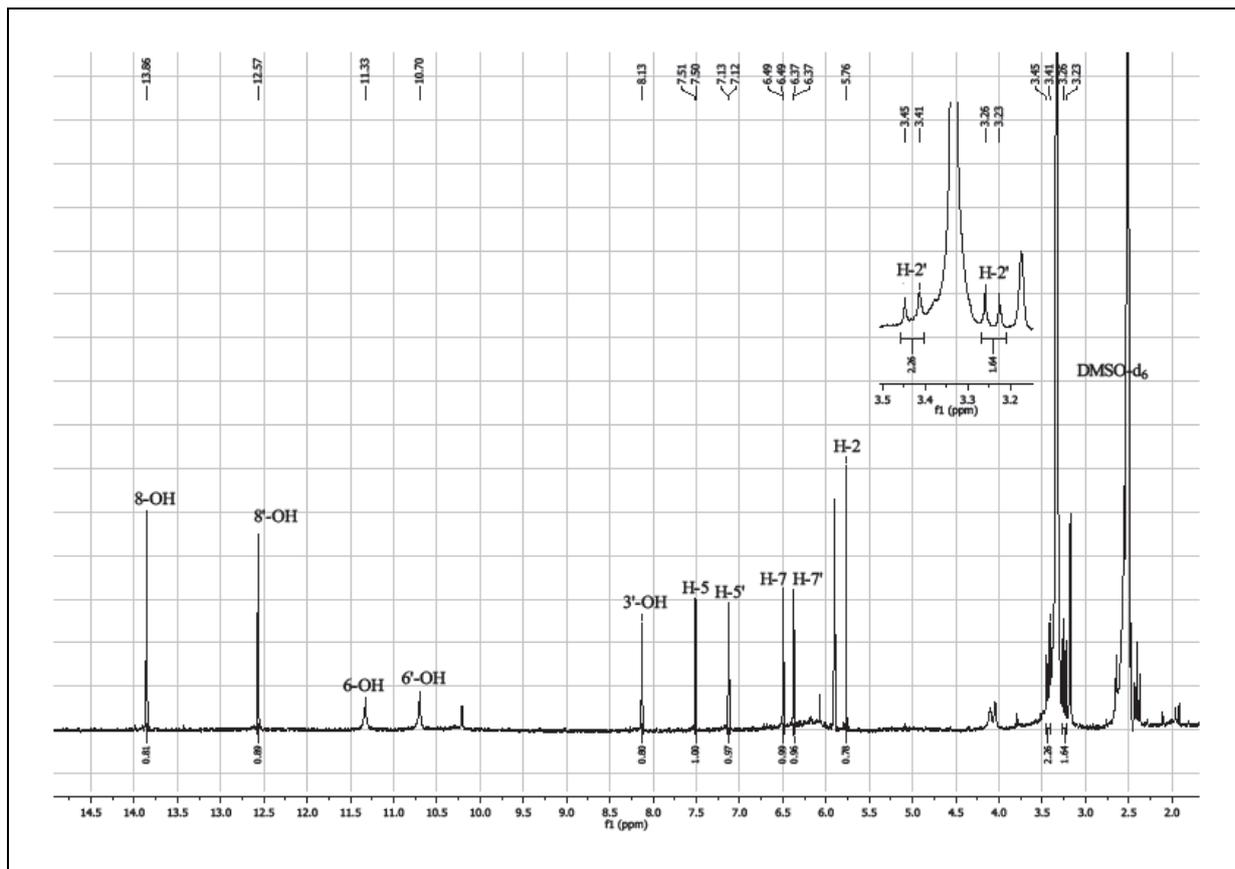


Abb. 83.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von RF-3192C, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

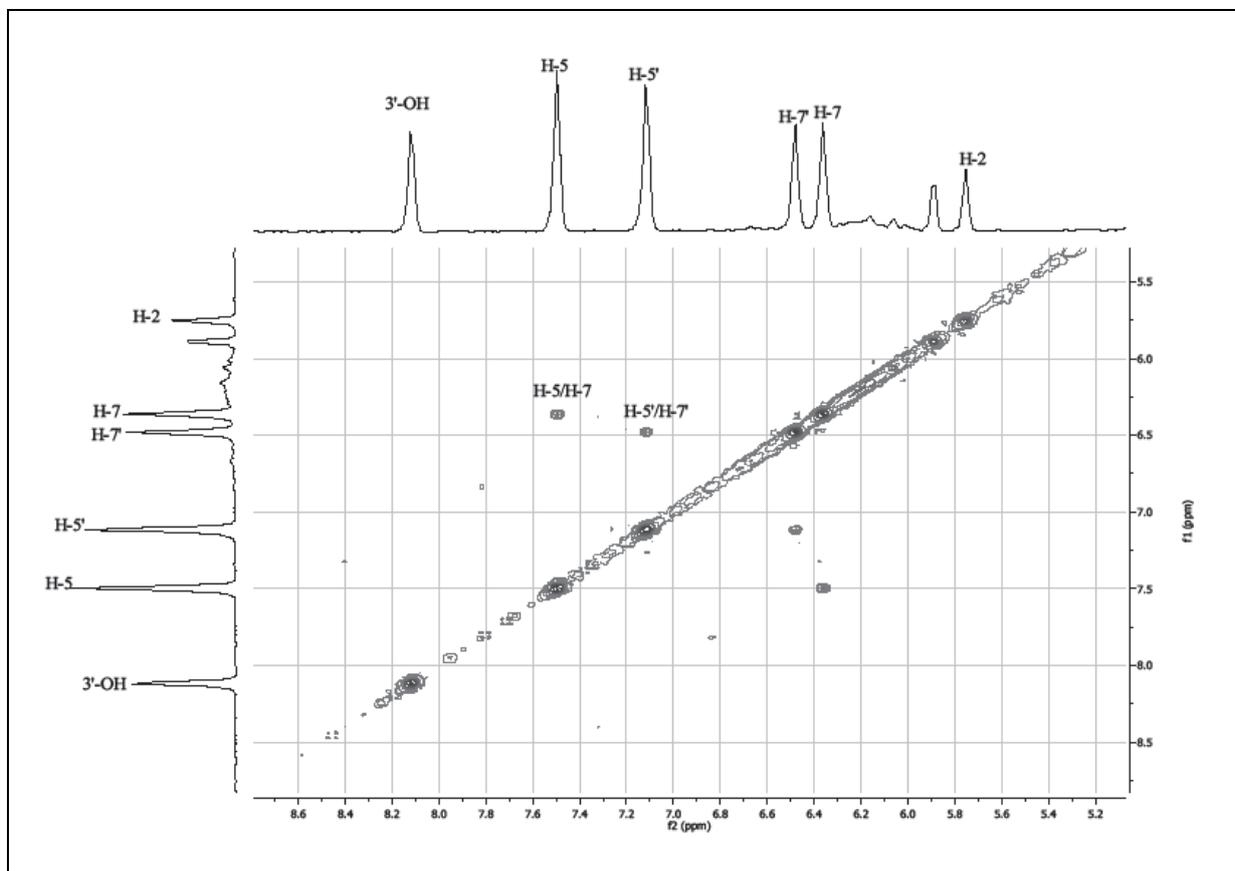
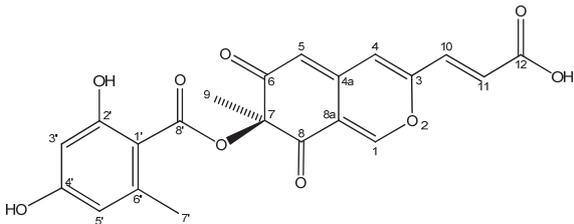
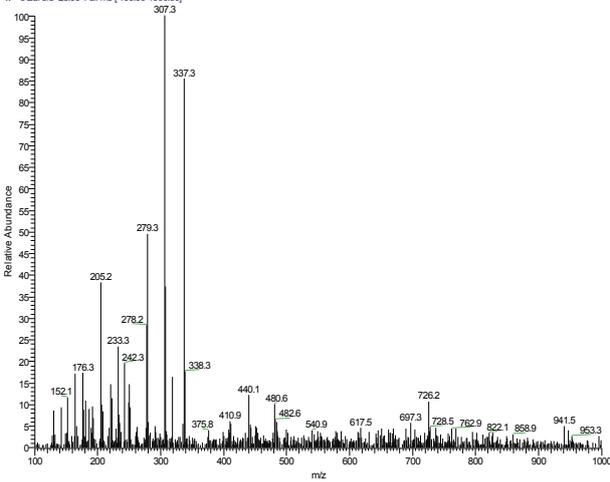
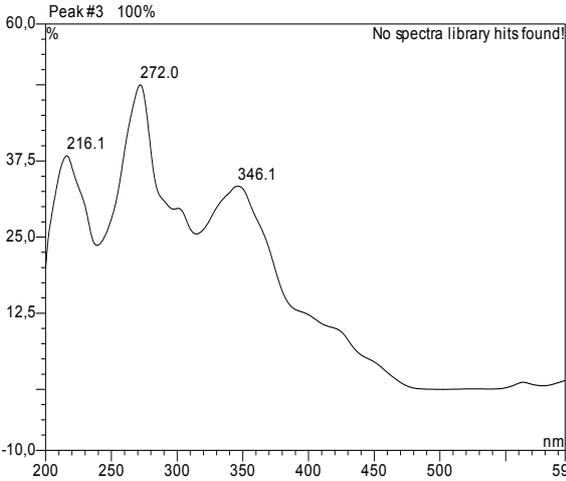
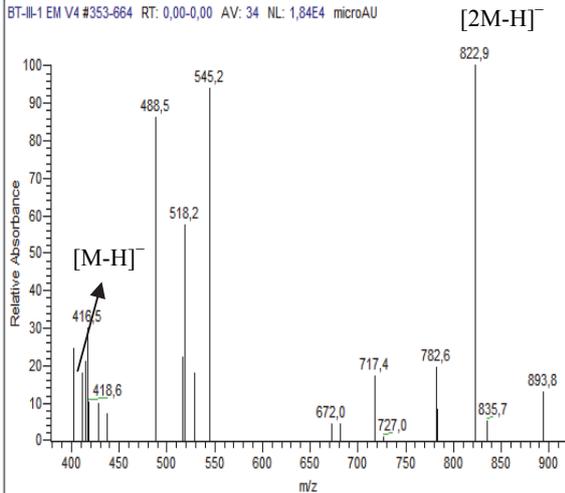


Abb. 84. COSY-Spektrum von RF-3192C, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

## 3.8.6. (+)-Mitorubrinsäure

<b>(+)-MITORUBRINSÄURE</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	8-Hydroxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-6-methoxy-1H-isochromen-1-on
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S42-46
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	15.2 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	412 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	+478.8 (c, 0.5 in EtOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	24.9 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b> BT-III-1 EM/V4 45-46 #741 RT: 22.36 AV: 1 NL: 7.49E5 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.</p>
<p><b>UV-Spektrum</b></p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b> BT-III-1 EM V4 #353-664 RT: 0,00-0,00 AV: 34 NL: 1,84E4 microAU</p>  <p>[M-H]<sup>-</sup></p> <p>[2M-H]<sup>-</sup></p>

Dieses Azaphilonderivat (15.2 mg) wurde aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) durch Auftrennung über VLC und Sephadex-Säulenchromatographie isoliert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima von 216, 272 und 346 nm. Das ESI-Massenspektrum zeigte bei negativer Ionisierung den Basispeak bei  $m/z$  823  $[2M-H]^-$ , woraus ein Molekulargewicht von 412 Da abgeleitet wurde.

Im Hochfeldbereich des in DMSO- $d_6$  aufgenommenen Protonenspektrums waren zwei Singulets für zwei Methylgruppen bei 1.56 (H<sub>3</sub>-9) und 2.46 ppm (H<sub>3</sub>-7') zu erkennen. Im COSY-Spektrum wurden die long-range-Korrelation von H<sub>3</sub>-7' zu H-5' (6.24 ppm) beobachtet, welches seinerseits eine *meta*-Kopplung zu H-3' (6.16 ppm) aufwies. Weitere Korrelationen im HMBC-Spektrum, z. B. von H<sub>3</sub>-7' zu C-1', C-5' und C-6', machten deutlich, dass die Methylgruppe H<sub>3</sub>-7' Substituent eines 1,2,3,5- tetrasubstituierten Aromates war. Die Signale bei 164.7 und 166.4 ppm belegten die Hydroxylierung des Benzolringes an den Positionen C-2' und C-4'. Die HMBC-Korrelation von H<sub>3</sub>-7' zu C-8' (171.1 ppm) deutete auf eine Carbonylgruppe, die einer Esterfunktion zuzuordnen war, als weiteren Substituenten hin, womit eine Orsellinsäure-Partialstruktur vorlag. Im aromatischen Bereich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums zeigten sich weiterhin drei Singulets bei 8.31 (H-1), 7.12 (H-4) und 5.72 ppm (H-5), die mit Hilfe der HMBC-Korrelationen als Teil eines kondensierten Ringsystems zugeordnet wurden. Weiterhin zeigte das HMBC-Spektrum durch die Korrelationen von H<sub>3</sub>-9 zu C-6, C-7 und C-8 die Verknüpfung der zweiten Methylgruppe an Position C-7 und ihre Positionierung zwischen zwei Ketofunktionen C-6 (194.9 ppm) und C-8 (193.6 ppm) an. Ebenso an Position C-7, verknüpft über eine Esterbindung, befand sich der eingangs beschriebene Orsellinsäure-Substituent. Ferner wurden im Protonenspektrum zwei Dublettensignale bei 6.41 (H-11) und 7.27 ppm (H-10) beobachtet, die durch ihre Kopplungskonstante (15.8 Hz) auf das Vorhandensein einer Doppelbindung in *trans*-Konfiguration schließen ließen. Aufgrund der Korrelationen im COSY- und HMBC-Spektrum konnten H-10 und H-11 einer Propensäure-Seitenkette zugeordnet werden. Die Position der Verknüpfung des Isochromenringes mit dieser Seitenkette konnte anhand der Korrelationen von H-4 zu H-10 und H-11 im COSY-Spektrum ermittelt werden. Des Weiteren wurden im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum drei tieffeldverschobene Singulets der Hydroxyfunktionen beobachtet. Die Signale bei 10.28 und 10.30 ppm wurden mit Hilfe der Literatur den beiden phenolischen Protonen zugeordnet (Büchi *et al.*, 1965), während das breite Singulett bei 12.94 ppm auf das acide Proton der Carboxygruppe zurückzuführen war.

Die NMR-Daten zeigten Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Büchi *et al.*, 1965; Natsume *et al.*, 1985). Für die optische Drehung wurde ein Wert von  $[\alpha]_D^{20} +478.8$  (c,

0.5 in EtOH) gemessen; damit konnte für das chirale Zentrum an Position 7 die *S*-Konfiguration festgelegt werden (Steglich *et al.* 1974; Steyn und Vleggaar, 1976).

Tabelle 32. NMR-Daten von Mitorubrinsäure

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (MeOD, 125 MHz) <sup>2</sup>	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	8.16, br d (1.2)	8.31, s	156.0	4	3, 4a, 8, 8a
3	-	-	155.0	-	-
4	7.02, s	7.12, s	116.5	1, 10, 11	3, 4a, 5, 8a, 10
4a	-	-	144.1	-	-
5	5.75, d (1.2)	5.72, s	109.6	-	-
6	-	-	194.9	-	-
7	-	-	86.6	-	-
8	-	-	193.6	-	-
8a	-	-	116.1	-	-
9	1.68, s	1.56, s	22.5	-	6, 7, 8
10	7.33, d (15.6)	7.27, d (15.8)	135.0	4, 11	3, 4, 11, 12
11	6.54, d (15.6)	6.41, d (15.8)	125.8	4, 10	3, 10, 12
12	-	-	168.4	-	-
12-OH	-	12.94, s	-	-	-
1'	-	-	104.6	-	-
2'	-	-	164.7	-	-
3'	6.23, d (2.4)	6.16, d (2.2)	101.8	-	1', 2', 4', 5'
4'	-	-	166.4	-	-
5'	6.35, d (2.4)	6.24, d (1.6)	112.6	7'	1', 2', 3', 7'
6'	-	-	145.2	-	-
7'	2.61, s	2.46, s	24.0	5'	1', 5', 6', 8'
8'	-	-	171.1	-	-
2'-OH	-	10.28, s <sup>a</sup>	-	-	-
4'-OH	-	10.30, s <sup>a</sup>	-	-	-

<sup>1</sup>Natsume *et al.*, 1985

<sup>2</sup> aus dem HMBC-Spektrum entnommen

<sup>a</sup> austauschbare Signale

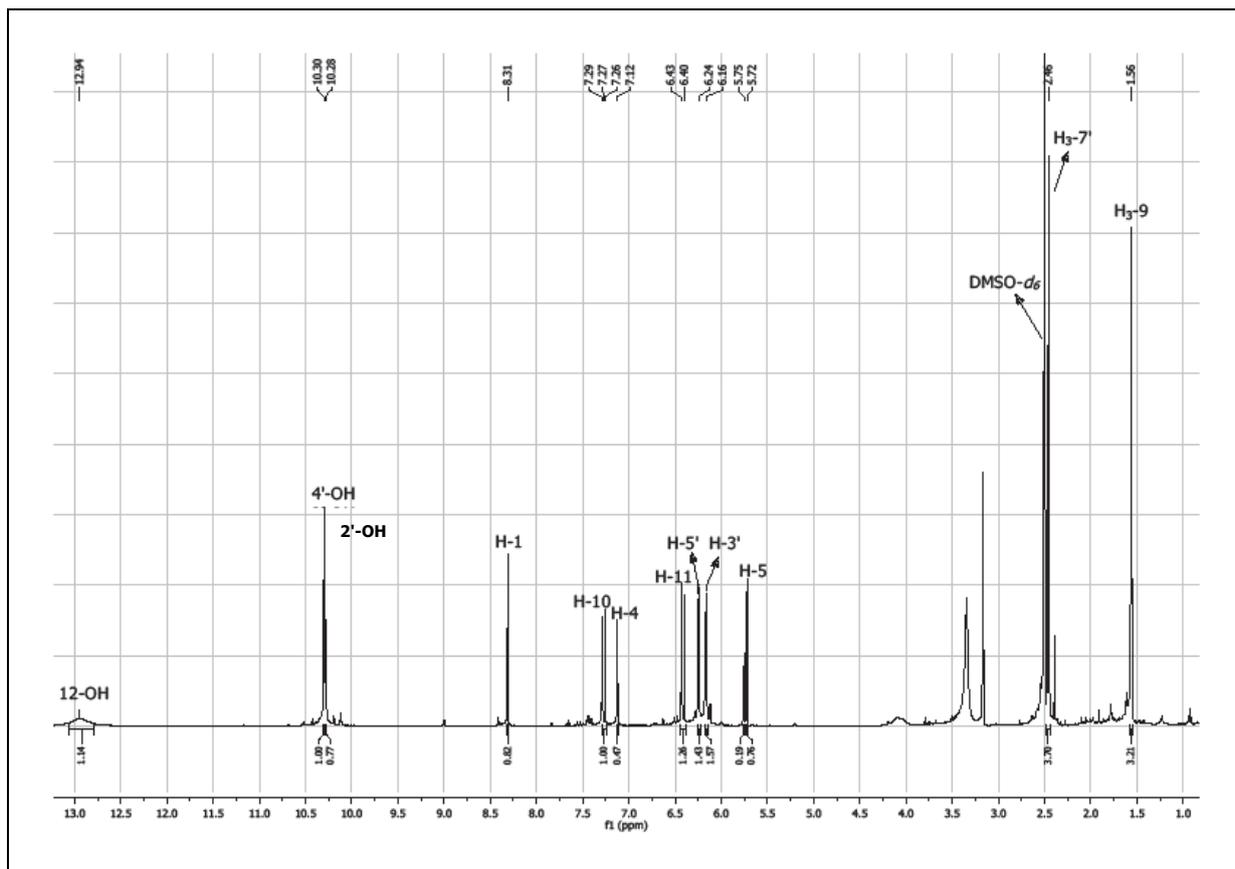


Abb. 85.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Mitorubrinsäure, gemessen in  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz)

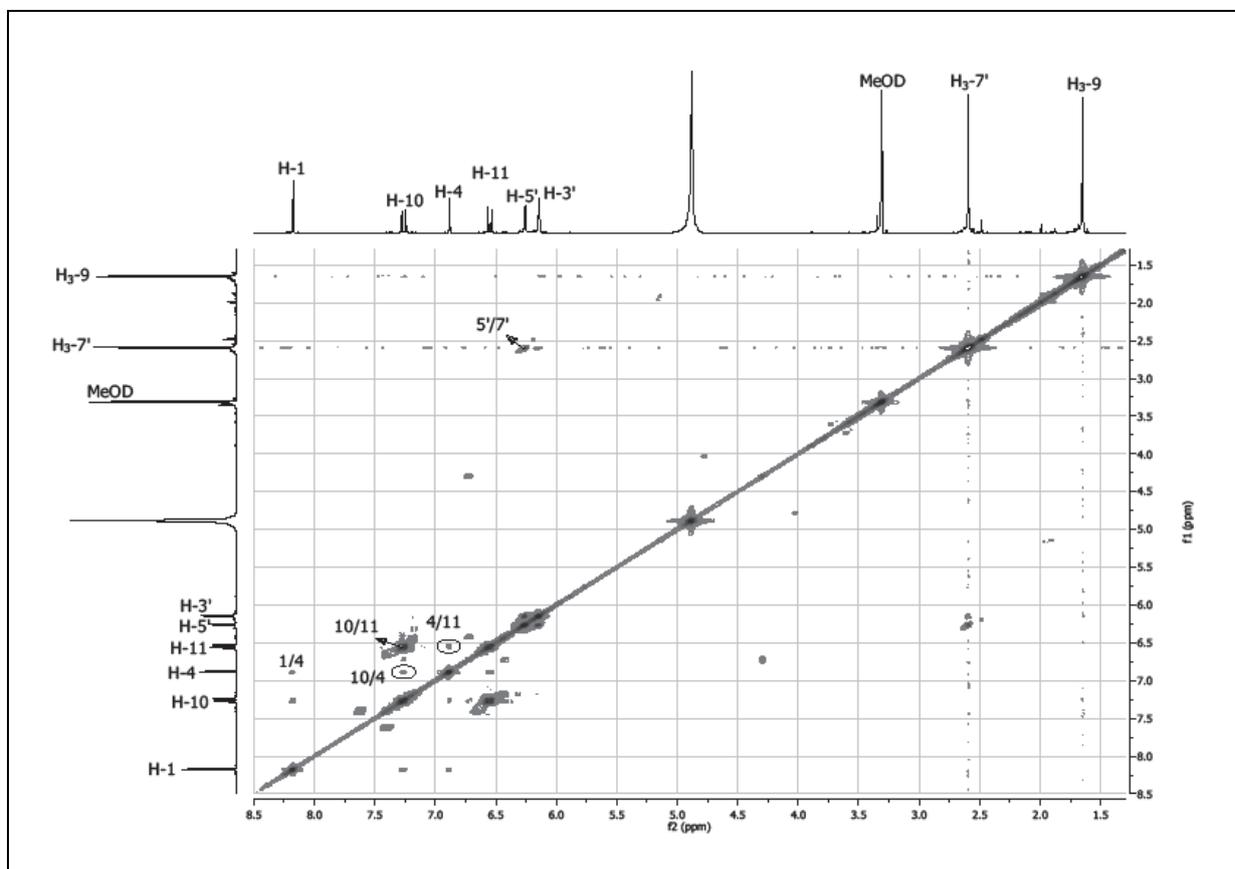


Abb. 86. COSY-Spektrum von Mitorubrinsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

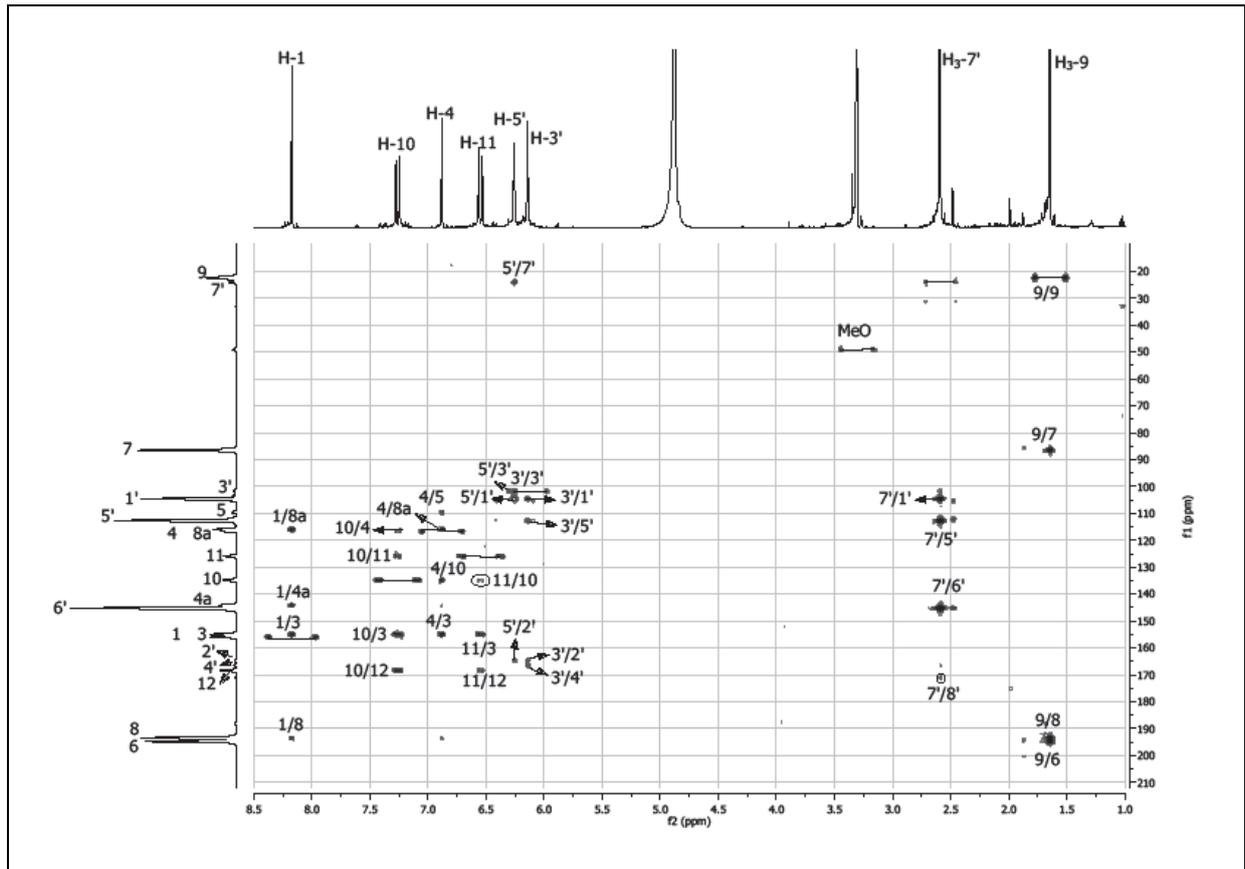


Abb. 87. HMBC-Spektrum von Mitorubrinsäure, gemessen in MeOD (500 MHz)

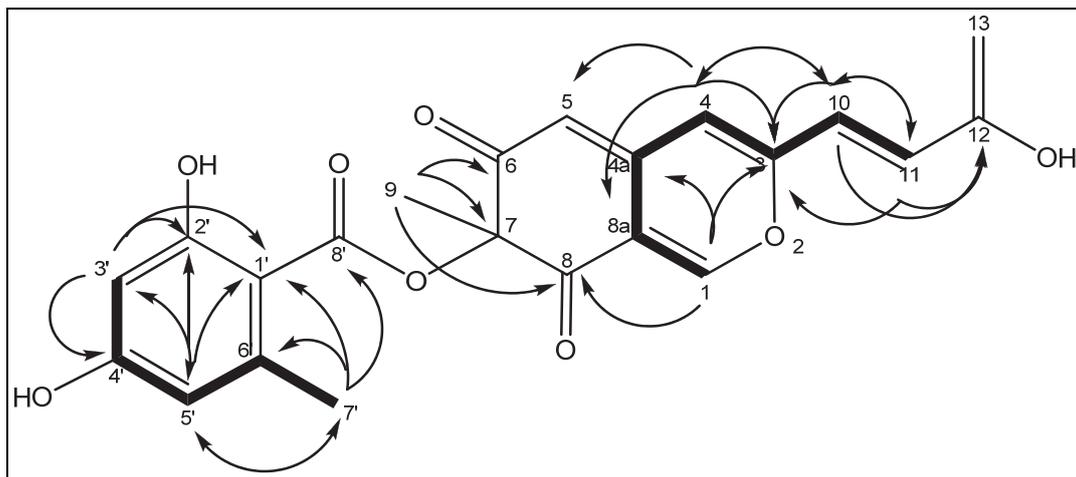
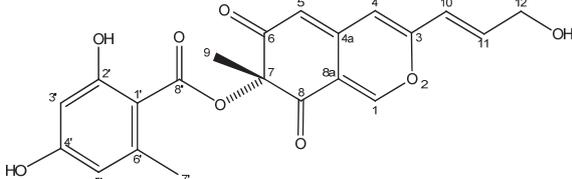
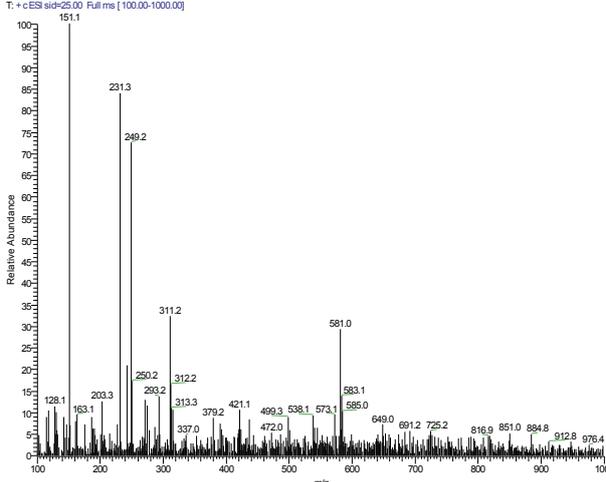
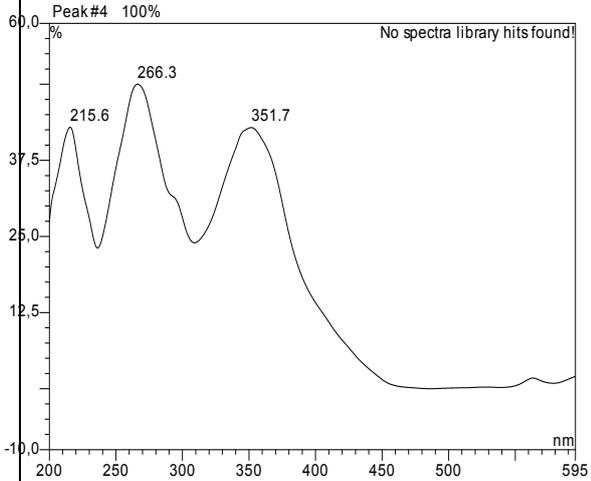
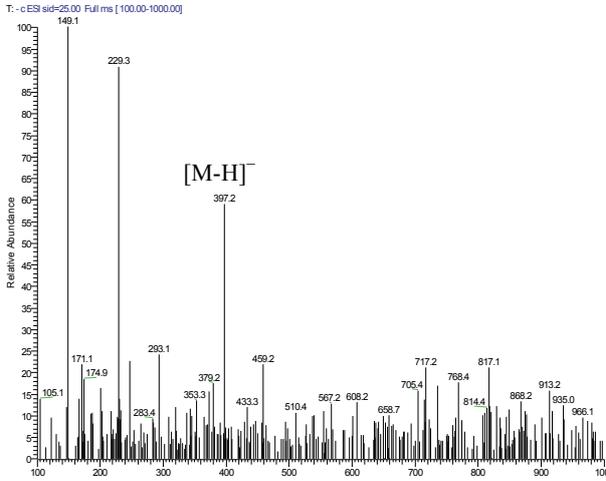


Abb. 88. COSY (fett) und HMBC-Korrelationen (Pfeile) von Mitorubrinsäure

## 3.8.7. (-)-Mitorubrinol

<b>(-)-MITORUBRINOL</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	(S)-3-((E)-3-Hydroxyprop-1-enyl)-7-methyl-6,8-dioxoisochroman-7-yl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S38-39
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	5.6 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel:</b>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	398 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	-385.3 (c, 0.5 in EtOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	23.9 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b></p> <p>BT-III-1EM-V4-38-39#511 RT: 18.43 AU: 1 NL: 8.90E5 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 
	*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden.
<p><b>UV-Spektrum</b></p> <p>Peak#4 100%</p> <p>No spectra library hits found!</p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b></p> <p>BT-III-1EM-V4-38-39#303 RT: 18.21 AU: 1 NL: 9.50E4 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</p> 

Mitorubrinol wurde ebenso wie Mitorubrinsäure (siehe 3.9.7.) aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt von *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) isoliert. Das UV-Spektrum der Substanz wies Maxima bei 215, 266 und 351 nm auf und ließ bereits damit eine strukturelle Verwandtschaft zu Mitorubrinsäure vermuten. Mit Hilfe des ESI-Massenspektrums konnte das Molekulargewicht von 398 g/mol bestimmt. Die für weitere Aufklärung der Struktur herangezogenen <sup>1</sup>H-NMR- und COSY-Spektren von Mitorubrinol zeigten weitgehende Übereinstimmung mit denen der Mitorubrinsäure. Die Analyse der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren ergab als Unterschied das Vorhandensein einer Methylengruppe an Position 12 für Mitorubrinol und somit eine Reduktion der Carbonsäurefunktion der Mitorubrinsäure zum Alkohol für die vorliegende Verbindung, was durch das Vorhandensein eines Spinsystems, bestehend aus H<sub>2</sub>-12 (4.30 ppm), H-11, H-10 und H-4, im COSY-Spektrum bestätigt wurde. Die NMR-spektroskopischen Daten wurden mit Literaturdaten verglichen und zeigten eine gute Übereinstimmung (Büchi *et al.*, 1965). Ebenso stimmte die ermittelte optische Drehung von  $[\alpha]_D^{20}$  -385.3 (c, 0.5 in EtOH) mit der in der Literatur angegebenen optischen Drehung von  $[\alpha]_D^{20}$  -375.0 (c, 1.7 in Dioxan) überein. Im Gegensatz zu (+)-Mitorubrinsäure wurde damit an Position 7 des (-)-Mitorubrinols die *R*-Konfiguration festgestellt (Büchi *et al.*, 1965; Steyn und Vleggaar, 1976).

Tabelle 33. NMR-Daten von Mitorubrinol

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 360 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz)	COSY (H→H)
1	8.27, d (1.0)	8.19, s	-
4	- <sup>a</sup>	6.57, s	12
5	5.62, d (1.0)	- <sup>c</sup>	-
9	1.58, s	1.65, s	-
10	6.35, d (16.0)	6.43, dd (15.6, 1.9)	11, 12
11	6.70, m	6.73, dt (15.6, 4.1)	10, 12
12	4.20, m	4.30, dd (4.1, 1.9)	10, 11
12-OH	5.1, bs	-	-
2'-OH	10.20, s <sup>b</sup>	-	-
3'	6.18	6.14, dd (2.4, 5.2)	7'
4'-OH	10.30, s <sup>b</sup>	-	-
5'	6.27	6.26, d (1.6)	7'
7'	2.47, s	2.60, s	3', 5'

<sup>1</sup>Büchi *et al.*, 1965<sup>a</sup> nicht erwähnt<sup>b</sup> austauschbare Signale<sup>c</sup> nicht detektiert

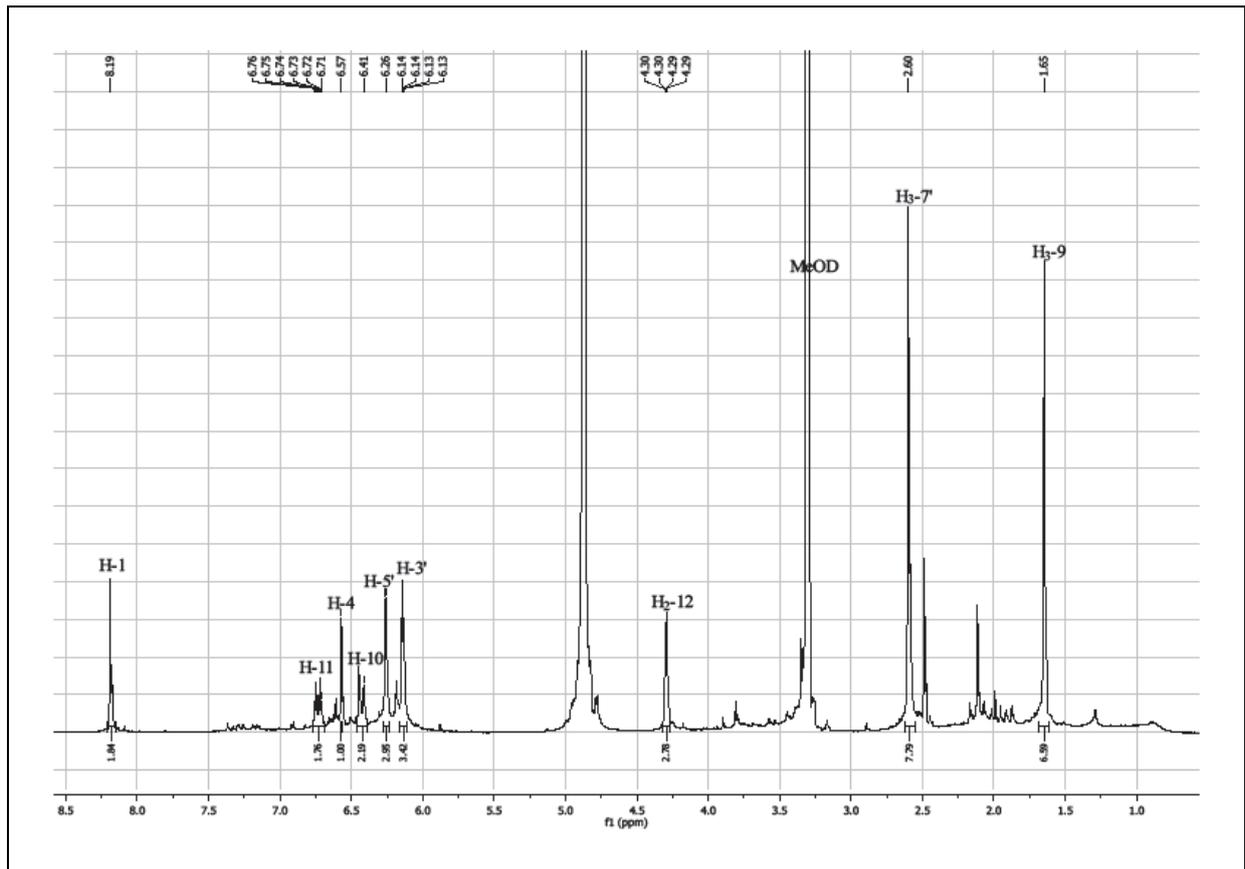


Abb. 89.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Mitorubrinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

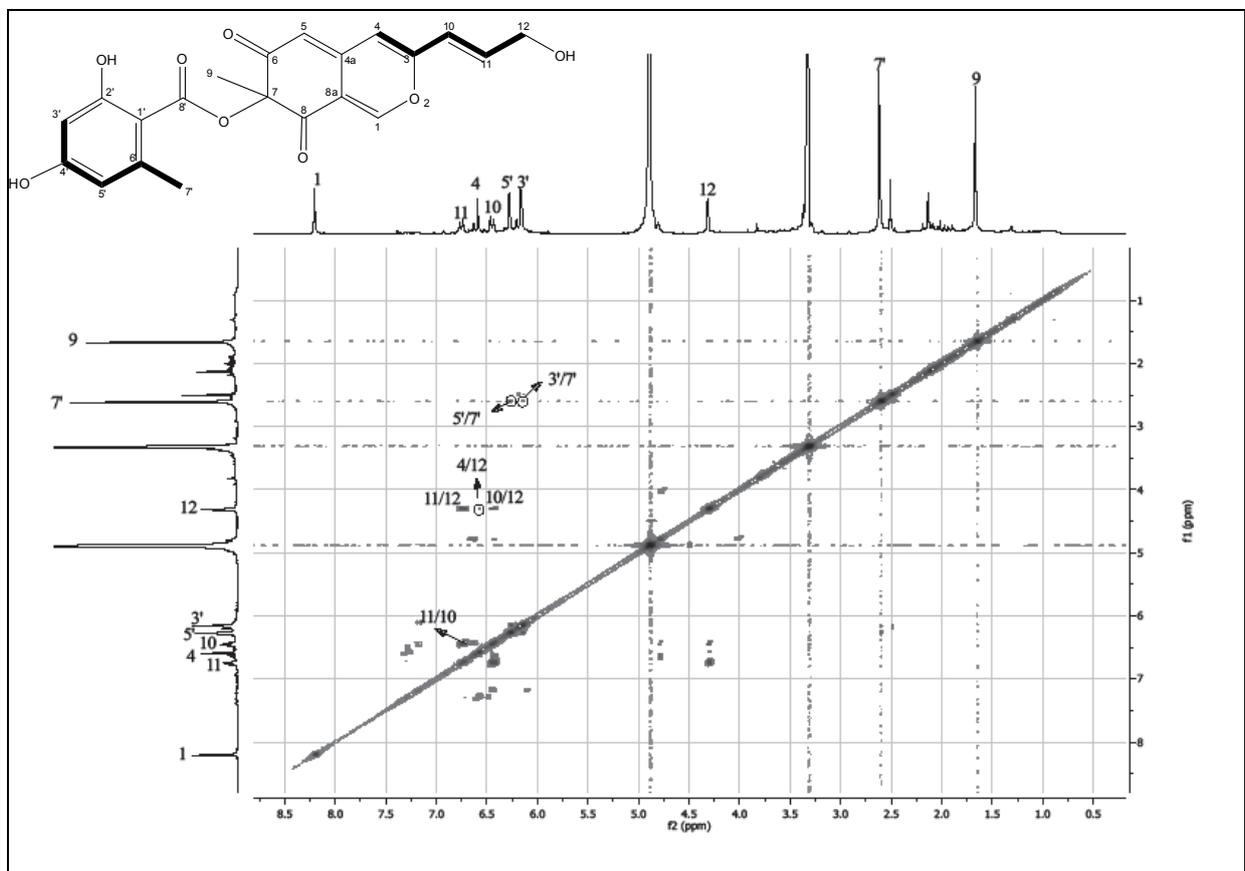
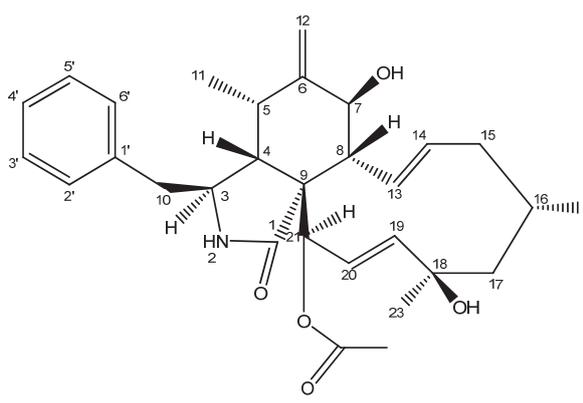
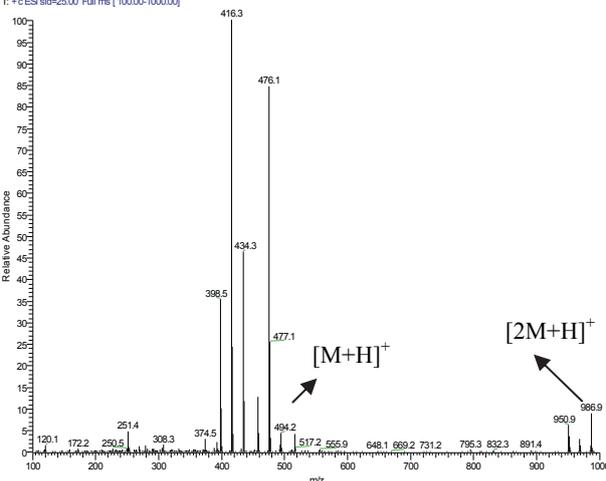
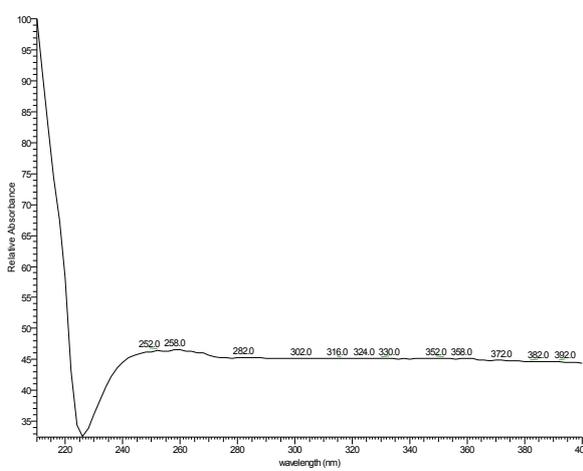
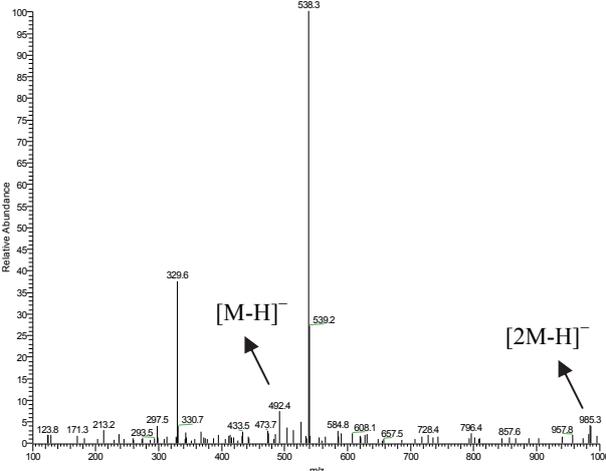
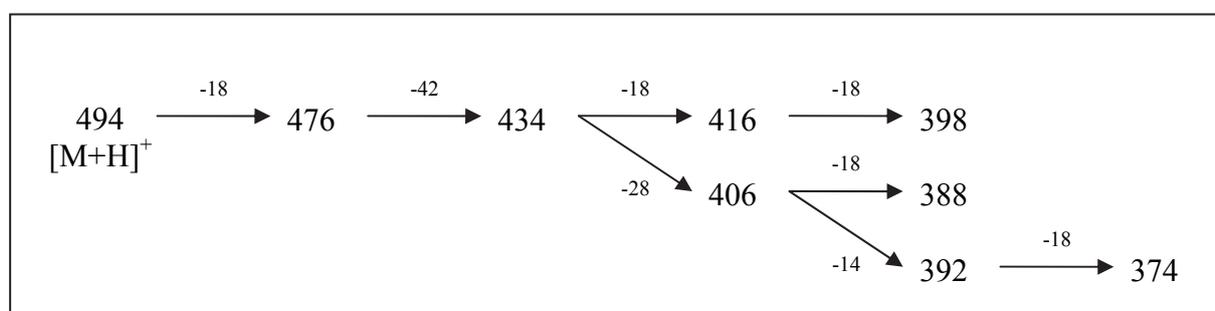


Abb. 90. COSY-Spektrum von Mitorubrinol, gemessen in MeOD (500 MHz)

## 3.8.8. Cytochalasin H

<b>CYTOCHALASIN H</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	3-Benzyl-2,3,3a,4,5,6,6a,9,10,11,12,15-dodecahydro-6,12-dihydroxy-4,10,12-trimethyl-5-methylene-1-oxo-1H-cycloundeca[d]isoindol-15-yl acetat
<b>Probencode:</b>	BT-III.1EM-V4-S12-13
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	1.2 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	493 g/mol
<b>Drehwert [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:</b>	+85.7° (c, 0.1 in MeOH)
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	24.9 min (Standard-Gradient)
	<p><b>ESI-MS (+)</b>  <small>Cleia252 #727 RT: 20.13 AV: 1 NL: 2.78E8  T: + c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 
<p><b>UV-Spektrum</b>  <small>Cleia252 #3056 RT: 20.47 AV: 1 NL: 2.26E5 microAU</small></p> 	<p><b>ESI-MS (-)</b>  <small>Cleia252 #741 RT: 20.46 AV: 1 NL: 3.85E5  T: - c ESI sid=25.00 Full ms [100.00-1000.00]</small></p> 

Cytochalasin H (1.2 mg) wurde mittels VLC und Sephadex-Saulenchromatographie aus dem EtOAc/MeOH-Extrakt des Pilzes *Hypoxylon fragiforme* (Stamm BT-III.1) isoliert. Zur Aufklärung der Struktur wurden neben dem über ESI-MS bestimmten Molekulargewicht von 493 Da und dem UV-Spektrum mit den Maxima bei 210 und 252 nm das  $^1\text{H-NMR}$ - sowie das COSY-Spektrum herangezogen. Die NMR-Spektren zeigten eine weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen sowie Korrelationen mit den für Cytochalasin E gemessenen und unter 3.8.2. beschriebenen Daten. Das Massenspektrum von Cytochalasin H zeigte die charakteristischen Massenfragmente von  $m/z$  476, 434, 416 und 398, die durch Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$   $[\text{M}-18]^+$  und  $\text{CH}_2\text{CO}$   $[\text{M}-44]^+$  resultieren (Prasain, *et al.*, 2002).



**Abb. 91. CID-Fragmentierungsschema ( $m/z$ ) von Cytochalasin H (Prasain *et al.*, 2002)**

Das in MeOD aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowie das COSY-Spektrum bestätigten die Anwesenheit eines monosubstituierten Benzolring, bestehend aus den Protonen H-3'/H-5' (7.30 ppm, 2H), H-4' (7.23 ppm, 1H) und H-2'/H-6' (7.19 ppm, 2H). Des Weiteren wurden für die Perhydroisindoleinheit fünf Methingruppen (H-3 bis H-8), eine Exomethylen- ( $\text{H}_2$ -12), eine Methylgruppe ( $\text{H}_3$ -11) sowie eine Methylengruppe ( $\text{H}_2$ -10), die den Phenylring als weiteren Substituenten besaß, detektiert. Im COSY-Spektrum wurden die Korrelationen von H-3 zu H-4 und  $\text{H}_2$ -10, von H-4 zu H-5, von H-5 zu  $\text{H}_3$ -11 und  $\text{H}_2$ -12 sowie von H-7 zu  $\text{H}_2$ -12 und H-8 beobachtet. Weiterhin wurden die Signale des 11-gliedrigen Makrozyklus wie folgt beobachtet: zwei Methylen- ( $\text{H}_2$ -15 und  $\text{H}_2$ -17), zwei *trans*-Ethylen- ( $\text{H}$ -13/ $\text{H}$ -14 und  $\text{H}$ -19/ $\text{H}$ -20), zwei weitere Methin- ( $\text{H}$ -16 und  $\text{H}$ -21), zwei Methylgruppen ( $\text{H}_3$ -22 und  $\text{H}_3$ -23) und eine Acetoxygruppe (21-OAc). Die Abfolge dieser Elemente im Makrozyklus ließ sich aufgrund der beiden Spinsysteme im COSY-Spektrum ermitteln, die H-13 bis  $\text{H}_2$ -17 einschließlich  $\text{H}_3$ -22, sowie H-19 bis H-21 umfassten. Außerdem zeigte das

COSY-Spektrum anhand der Korrelation von H-8 zu H-7 und H-13 die Verknüpfung des Perhydroisoidols zum Makrozyklus.

Die NMR-Daten der Substanz wurden mit Literaturdaten verglichen und zeigten gute Übereinstimmung (Patwardhan *et al.*, 1974; Tao *et al.*, 2008). Ebenso stimmte die optische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} +85.7^\circ$  (c, 1.0 in MeOH) mit dem in der Literatur angegebenen Wert von  $[\alpha]_D^{25} +91.2^\circ$  (c, 0.1 in MeOH) überein (Patwardhan *et al.*, 1974).

**Tabelle 34. NMR-Daten von Cytochalasin H**

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( <i>J</i> in Hz) (MeOD, 500 MHz)	COSY (H→H)
2'	7.13, d <sup>a</sup>	7.19, d (7.2) <sup>a</sup>	3'
3'	7.31, dd <sup>a</sup>	7.30, t (7.4) <sup>a</sup>	2', 4'
4'	7.23, t	7.23, t (7.4)	3', 5'
5'	7.31, dd <sup>a</sup>	7.30, t (7.4) <sup>a</sup>	4', 6'
6'	7.13, d <sup>a</sup>	7.19, d (7.2) <sup>a</sup>	-
3	3.24, m	3.28, m	4, 10A, 10B
4	2.11, t	2.17, dd (5.2, 2.7)	3, 5
5	2.76, m	2.63, m	4, 11, 12A, 12B
7	3.81, d (11.0)	3.80, d (10.4),	8, 12A, 12B
8	2.92, t	2.93, t (9.9)	7, 13
10A	2.84, dd (13.5, 4.5)	2.88, dd (13.2, 5.4)	3, 10B
10B	2.64, dd (13.5, 8.5)	2.71, dd (13.2, 8.2)	3, 10A
11	0.97, d (6.5)	0.56, d (6.9)	5
12A	5.33, s	5.19, s	5, 7, 12B
12B	5.09, s	4.98, s	5, 7, 12A
13	5.72, ddd (15.5, 10.5, 1.0)	5.63, dd (15.6, 9.6)	8, , 14, 15A
14	5.38, m	5.31, m	13, 15A, 15B
15A	2.03, m	2.01, m	13, 14, 16, 22
15B	1.80, m	1.75, m <sup>b</sup>	14
16	1.77, m	1.75, m <sup>b</sup>	15A, 22
17A	1.86, dd (14.0, 3.0)	1.75, m <sup>b</sup>	16, 17B
17B	1.55, dd (14.0, 3.0)	1.54, d (11.3)	16, 17A
19	5.84, dd (13.5, 3.0)	5.74, dd (16.7, 2.2)	20, 21
20	5.52, dd (13.5, 2.5)	5.52, dd (16.7, 2.2)	19, 21
21	5.54, s	5.42, s	19, 20
22	1.03, d	1.01, t (7.7)	15A, 16
23	1.32, s	1.28, s	-
21-OAc	2.26, s	2.27, s	-
NH	5.68, s	-	-
7-OH	2.08, s	-	-
18-OH	-	-	-

<sup>1</sup>Tao *et al.*, 2008

<sup>a, b</sup> Signalüberlappung

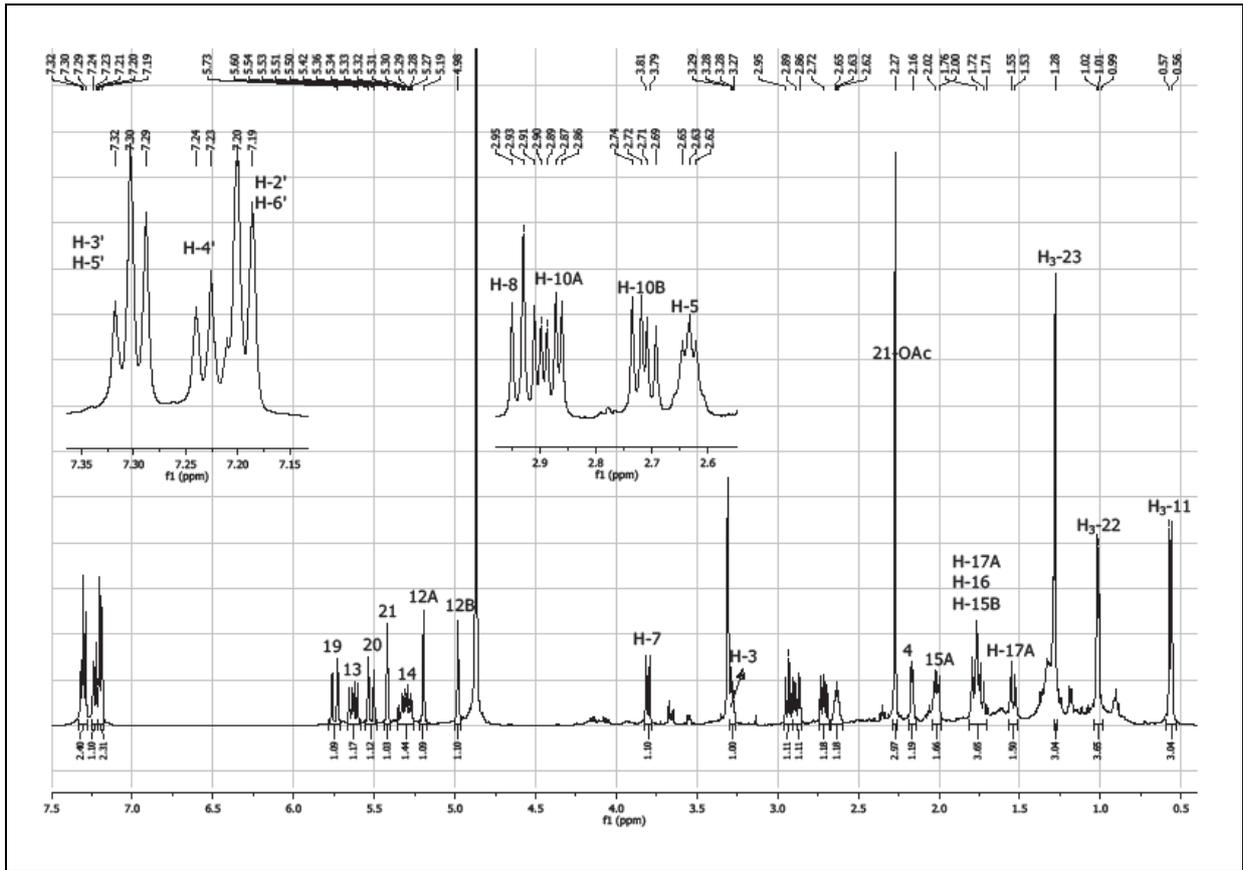


Abb. 92. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Cytochalasin H, gemessen in MeOD (500 MHz)

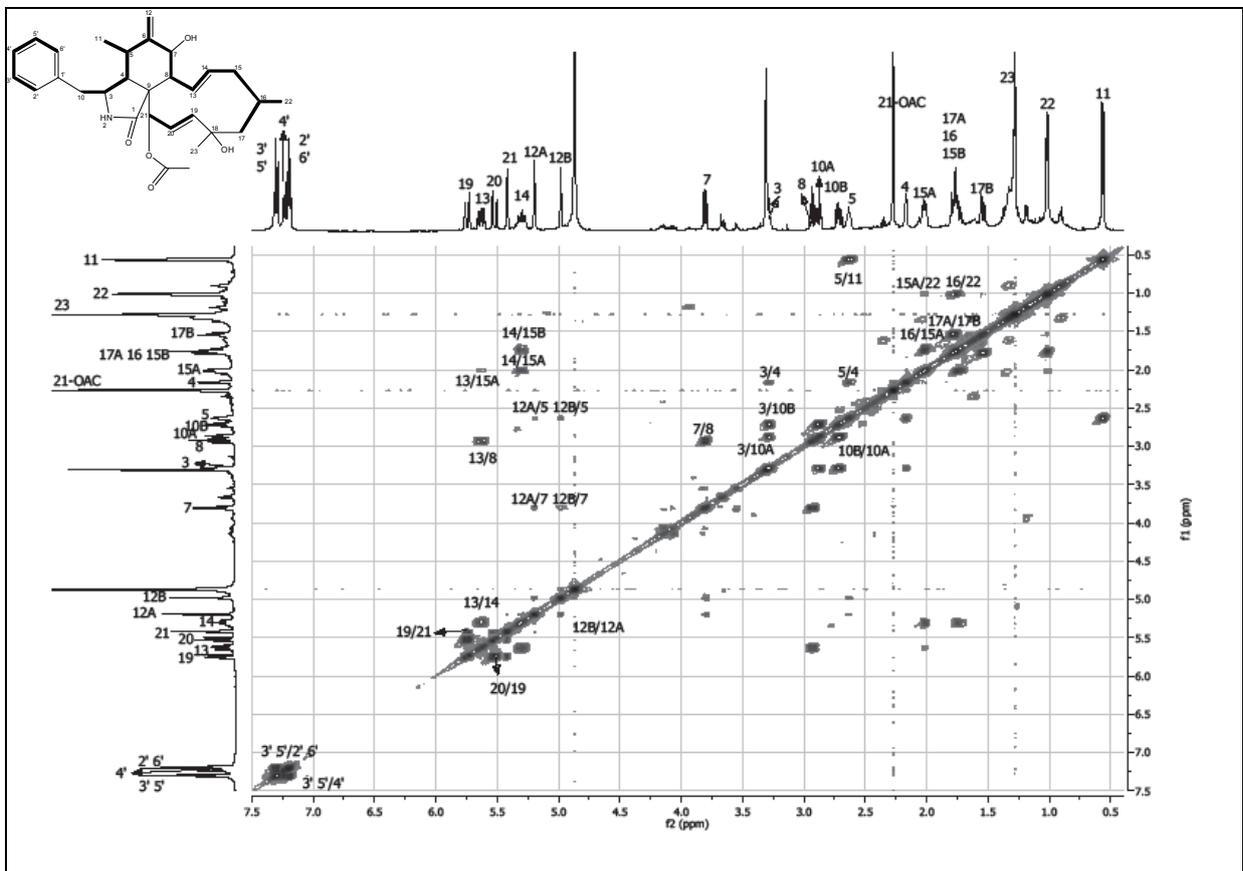
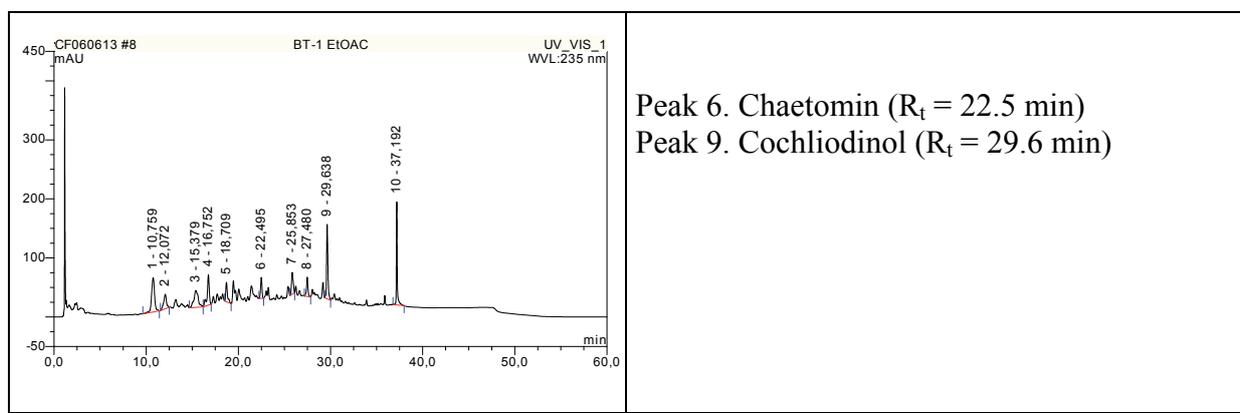


Abb. 93. COSY-Spektrum von Cytochalasin H, gemessen in MeOD (500 MHz)

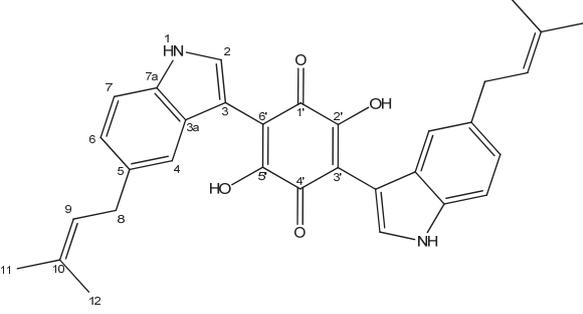
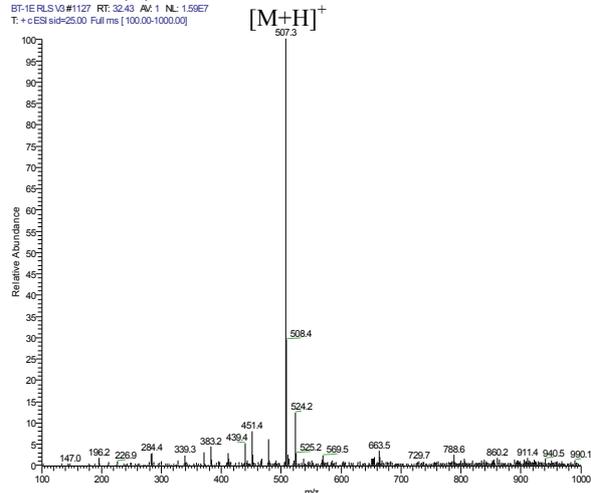
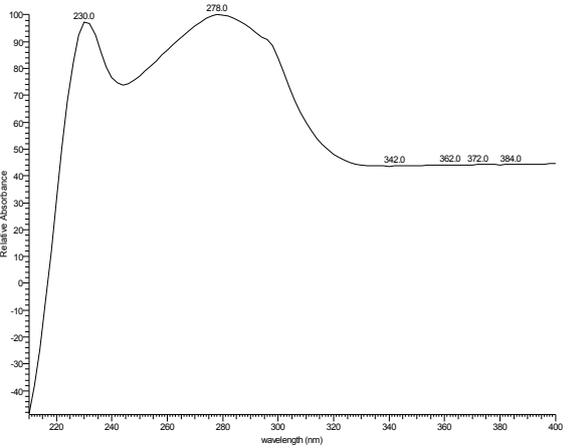
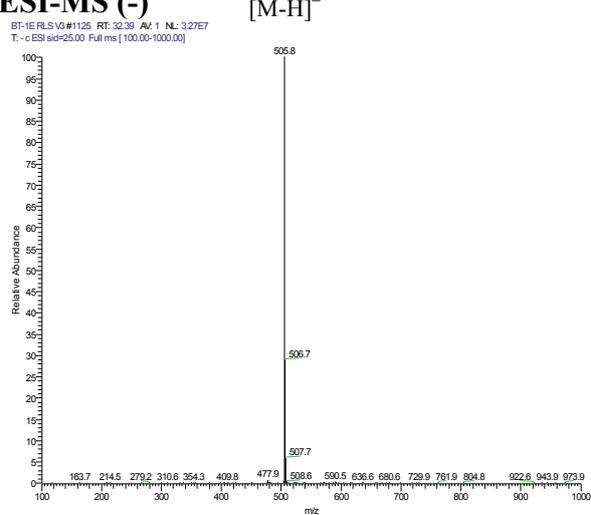
### 3.9. Inhaltsstoffe aus *Eurotium rubrum* (BT-1)

Der Stamm BT-1 wurde aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* (Herkunft: Rheinbreitbach, Siebengebirge) isoliert und mittels molekularbiologischer Methoden als *Eurotium rubrum* identifiziert. Der Pilz wurde in größerem Maßstab auf Reismedium kultiviert und extrahiert. Der EtOAc-Extrakt (23.0 g) wurde mittels VLC und Kieselgelsäulenchromatographie fraktioniert, wodurch die bekannten Mykotoxine Cochliodinol und Chaetomin erhalten wurden.



**Abb. 94. HPLC-Chromatogramm des EtOAc-Extraktes von *Eurotium rubrum* auf Reismedium**

## 3.9.1. Cochliodinol

<b>COCHLIODINOL</b>	
<b>Systematischer Name:</b>	2,5-Dihydroxy-3,6-bis(5-(3-methylbut-2-enyl)-1H-indol-3-yl)cyclohexa-2,5-diene-1,4-dion
<b>Probencode:</b>	BT-1E RLS V3K
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Eurotium rubrum</i> (aus <i>Bazzania trilobata</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	176.8 mg
<b>Beschreibung:</b>	rotbraune Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	506 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	30.8 min (Standard-Gradient)
	<b>ESI-MS (+)</b> BT-1E RLS V3 #1127 RT: 32.43 AV: 1 NL: 1.59E7 T: + c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00] 
<b>UV-Spektrum</b> BT-1E RLS V3 #4820 RT: 32.23 AV: 1 NL: 2.47E5 microAU 	<b>ESI-MS (-)</b> BT-1E RLS V3 #1125 RT: 32.39 AV: 1 NL: 3.27E7 T: - c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00] 

Cochliodinol wurde mittels Kieselgelsäulenchromatographie als rotbraune Substanz (176.8 mg) aus dem Ethylacetat-Extrakt von *Eurotium rubrum* (Stamm BT-1) isoliert. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 230 und 278 nm. Mithilfe der ESI-Massenspektrometrie konnte das Molekulargewicht der isolierten Substanz von 506 g/mol ermittelt werden.

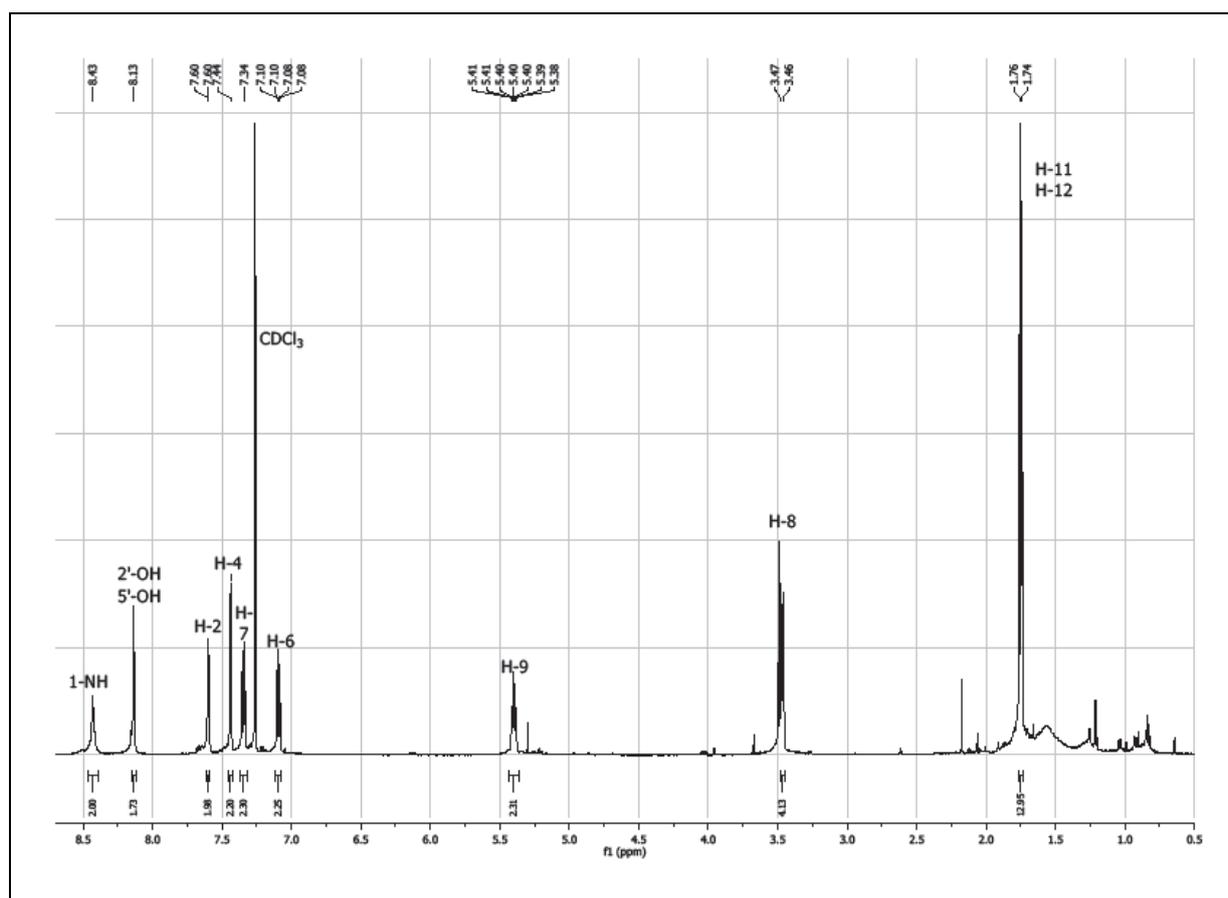
Das in deuteriertem Chloroform aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte sich im Verhältnis zur ermittelten Molekulargewicht signalarm. Insgesamt wurden lediglich Signale für 11 Protonen beobachtet, was auf eine symmetrische Struktur hindeutete. Im aromatischen Bereich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums wurden drei Protonen H-4 (7.44 ppm), H-6 (7.09 ppm) und H-7 (7.34 ppm) beobachtet, die aufgrund der Kopplungsmuster einem 1,2,4-trisubstituierten Benzolring zuzuordnen waren. Dieser ließ sich anhand des  $^1\text{H-NMR}$ - und COSY-Spektrums als Bestandteil eines Indolsystems nachweisen, das in der Position 5 durch einen Isoprenylrest substituiert war. So zeigte das olefinische Proton H-9 (5.40 ppm) eine allylische Korrelation zu den Methylprotonen H<sub>3</sub>-11 und H<sub>3</sub>-12 (1.75 ppm) sowie eine vicinale Kopplung zur Methylenfunktion H<sub>2</sub>-8 (3.47 ppm). Außerdem ließ sich im +ESI-MS neben dem Pseudomolekülionenpeak das Fragment  $m/z$  439 erkennen, das den Verlust des Isoprenylrestes anzeigte. Das COSY-Spektrum zeigte noch die long-range-Korrelationen zwischen H-4 (7.44 ppm) und H-6 (7.09 ppm) mit H<sub>2</sub>-8, womit sich die Anordnung des Isoprenylrestes an der Position 5 des Indolsystemes bestimmen ließ.

Eine Datenbankrecherche mit der gefundenen Teilstruktur und Molekulargewicht führte zu Cochliodinol, dessen in  $\text{CDCl}_3$  gemessenen NMR-Daten nur geringfügig von den in der Literatur angegebenen abwichen (s. Tab. 35), da hier THF- $d_8$  als Lösungsmittel verwendet wurde (Jerram *et al.*, 1975; Sekita, 1983).

Auf die Aufnahme von weiteren NMR-Spektren wurde verzichtet, da die Verbindung zuvor durch vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis spektroskopisch eingehend charakterisiert worden war (Hassan, 2007; Indriani, 2007; Diesel, 2009).

Tabelle 35. NMR-Daten von Cochliodinol

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (THF- $d_8$ , 100 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	COSY (H→H)
1-NH	10.30, s	8.43, br s	2
2	7.51, d (2,6)	7.60, d (1.9)	1-NH
4	7.43, br s	7.44, s	6, 8
6	7.07, m <sup>a</sup>	7.09, dd (1.1, 8.4)	7
7	7.07, m <sup>a</sup>	7.34, d (8.2)	6
8	3.41, br d (7.0)	3.47 (7.2)	4, 9, 11, 12
9	5.39, m	5.40, tt (1.3, 7.2)	8, 11, 12
11	1.71, d (1.3) <sup>b</sup>	1.75, br d (7.9)	8, 9
12	1.73, d (1.5) <sup>b</sup>	1.75, br d (7.9)	8, 9
2'/5'-OH	9.80, br s	8.13, s	-

<sup>1</sup> Jerram *et al.*, 1975<sup>a</sup> Signalüberlappung<sup>b</sup> austauschbare SignaleAbb. 95. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Cochliodinol, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

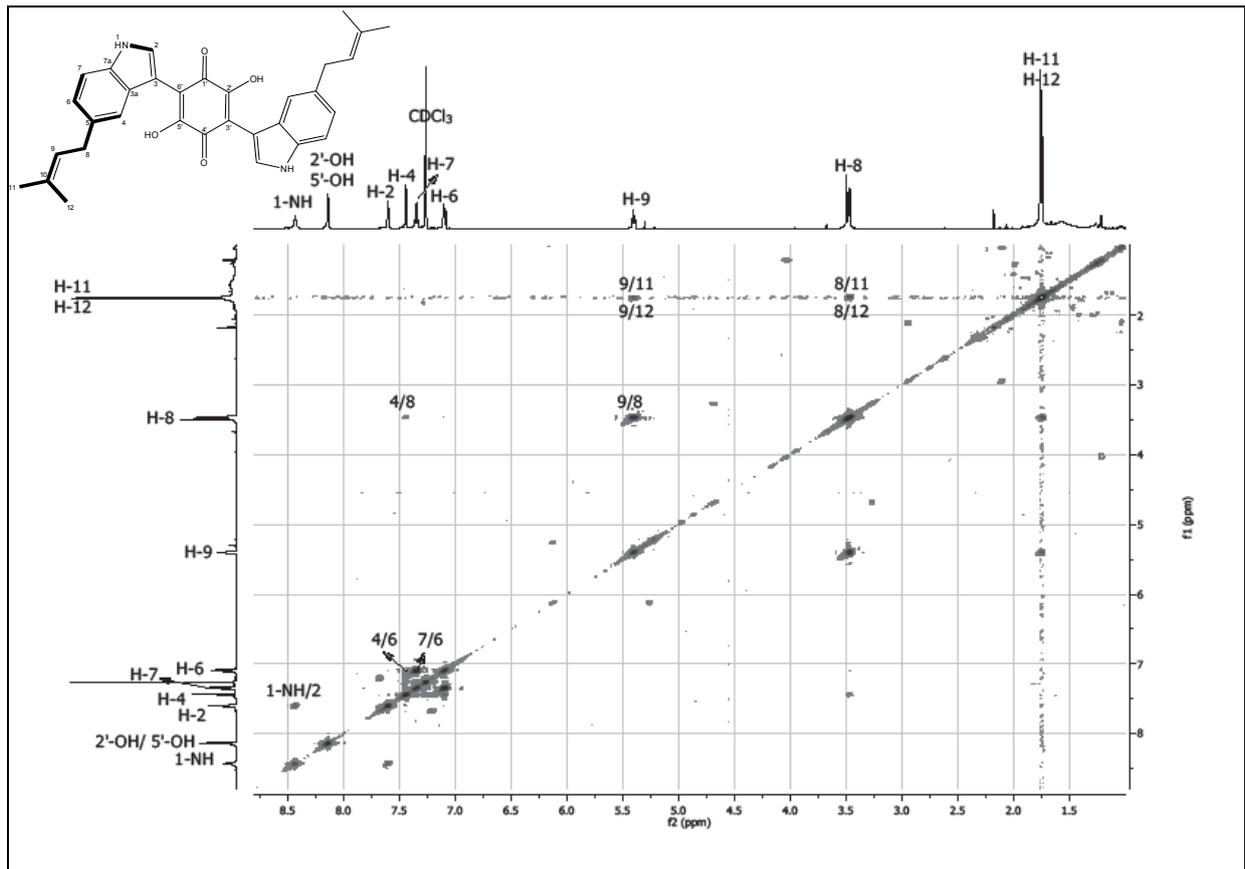
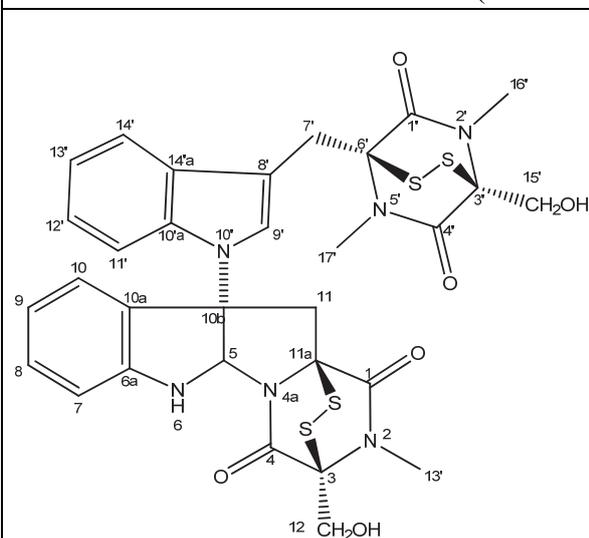
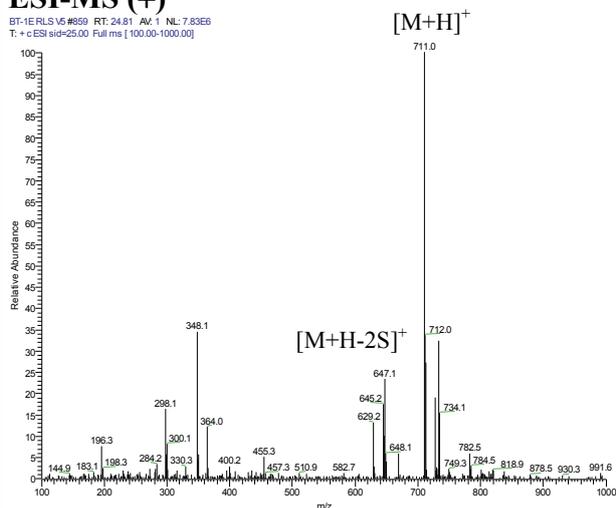


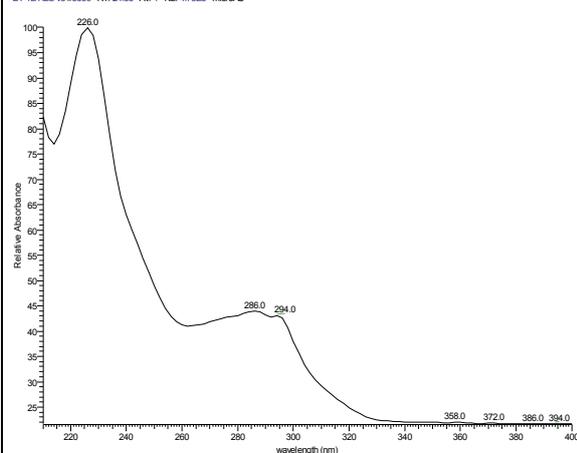
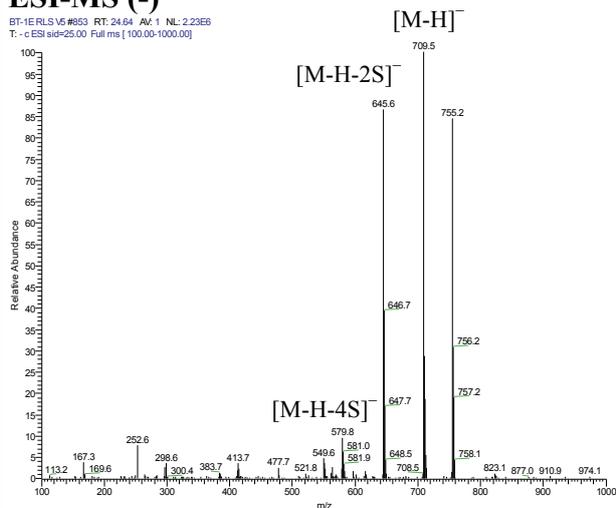
Abb. 96. COSY-Spektrum von Cochliodinol, gemessen in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

## 3.9.2. Chaetomin

## CHAETOMIN

**Systematischer Name:****Probencode:** BT-1E RLS V5**Quellorganismus:** *Eurotium rubrum* (aus *Bazzania trilobata*)**Substanzmenge:** 6.5 mg**Beschreibung:** bräunliches Pulver**Summenformel:** C<sub>31</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> S<sub>4</sub>**Molekulargewicht:** 710 g/mol**Drehwert**  $[\alpha]_D^{20}$ : +287.5° (c, 0.5 in CHCl<sub>3</sub>)**Retentionszeit HPLC:** 23.1 min (Standard-Gradient)**ESI-MS (+)**BT-1E RLS V5 #669 RT: 24.81 Av. 1 NL: 7.83E6  
T: + c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]**UV-Spektrum**

BT-1E RLS V5 #3669 RT: 24.55 Av. 1 NL: 4.73E5 microAU

**ESI-MS (-)**BT-1E RLS V5 #663 RT: 24.64 Av. 1 NL: 2.23E5  
T: - c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]

Die Substanz Chaetomin (6.5 mg) konnte mittels Kieselgelsäulenchromatographie aus dem Ethylacetatextrakt von *Eurotium rubrum* (Stamm BT-1) isoliert werden. Zur Aufklärung der Struktur wurden neben dem über ESI-MS bestimmten Molekulargewicht von 710 g/mol und dem UV-Spektrum mit den Maxima bei 226, 286 und 294 nm das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum herangezogen (s. Tab. 36).

Das in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Chaetomin zeigte drei Singulets für Methylgruppen zwischen 2.95 und 3.18 ppm, wobei die chemische Verschiebung auf die Nachbarschaft zu einem Stickstoff-Substituent hindeutete. Weiterhin wurde im Bereich von 3.09 bis 4.40 ppm Signale für acht Protonen beobachtet, die zu vier diastereotopen Methylgruppen gehörten. Zwischen 6.78 und 7.65 ppm befand sich ein komplexes System überlappender Protonen, das nach sorgfältiger Analyse insgesamt einem Methinproton bei 7.19 ppm und acht aromatischen Protonen zugewiesen werden konnte. Letztere entsprachen zwei ABCD-Spinsystemen, die charakteristisch für zwei 1,2-disubstituierte Benzolringe sind. Eines dieser Spinsysteme bestand aus den Protonen H-7 (7.32 ppm), H-8 (7.28 ppm), H-9 (6.93 ppm) und H-10 (6.78 ppm). Das andere setzte sich aus den Protonen H-11' (7.29 ppm), H-12' (7.21 ppm), H-13' (7.21 ppm) und H-14' (7.65 ppm) zusammen. Weiterhin wurden zwei Methingruppen H-5 (6.21 ppm) und H-9' (7.19 ppm) den Pyrrolpartialstrukturen zweier Indolringe zugeordnet. Des Weiteren wurde das breite Singulett eines NH-Protons bei 5.36 ppm beobachtet.

Auf Basis der vorgenannten Ergebnisse wurde eine Substruktursuche in Datenbanken durchgeführt, gefolgt von dem Vergleich mit Literaturdaten (Fujimoto *et al.*, 2004), welche zu einer eindeutigen Identifizierung der Verbindung als Chaetomin führte. Auch in diesem Fall wurde auf die Aufnahme von weiteren NMR-Spektren verzichtet. Durch vorherige Untersuchungen im Arbeitskreis wurde diese Verbindung bereits eingehend spektroskopisch charakterisiert (Indriani, 2007; Diesel, 2009).

Tabelle 36. NMR-Daten von Chaetomin

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) <sup>1</sup>	$\delta^1\text{H}$ (ppm), Multiplizität ( $J$ in Hz) (in $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)
5	6.21, s	6.21, s
6-NH	5.35, s	5.36 br s
7	7.34, d (7.6)	7.32, d (7.6)
8	7.31, t (7.6)	7.28, t (7.2)
9	6.95, t (7.6)	6.93, t (7.4)
10	6.80, d (7.6)	6.78, d (7.9)
11A	4.42, d (15.4)	4.40, d (13.9)
11B	3.10, d (15.4)	3.09, d (15.4)
12A	4.35, d (12.6)	4.37, d (12.6)
12B	4.29, d (12.6)	4.27, d (12.6)
13 (NCH <sub>3</sub> )	3.20, s	3.18, s
7'A	3.89, d (15.6)	3.86, d (15.4)
7'B	3.74, d (15.6)	3.70, d (15.8)
9'	7.19, s	7.19, s
11'	7.31, br d (6.7)	7.29, br d (6.6)
12'	7.23, m <sup>a</sup>	7.21, m <sup>a</sup>
13'	7.23, m <sup>a</sup>	7.21, m <sup>a</sup>
14'	7.66, d (6.7)	7.65, d (6.3)
15'A	4.32, d (12.6)	4.33, dd (12.6)
15'B	4.27, d (12.6)	4.26, d (12.3)
16' (NCH <sub>3</sub> )	3.17, s	3.16, s
17' (NCH <sub>3</sub> )	2.96, s	2.95, s

<sup>1</sup> Fujimoto *et al.*, 2004<sup>a</sup> austauschbare Signale

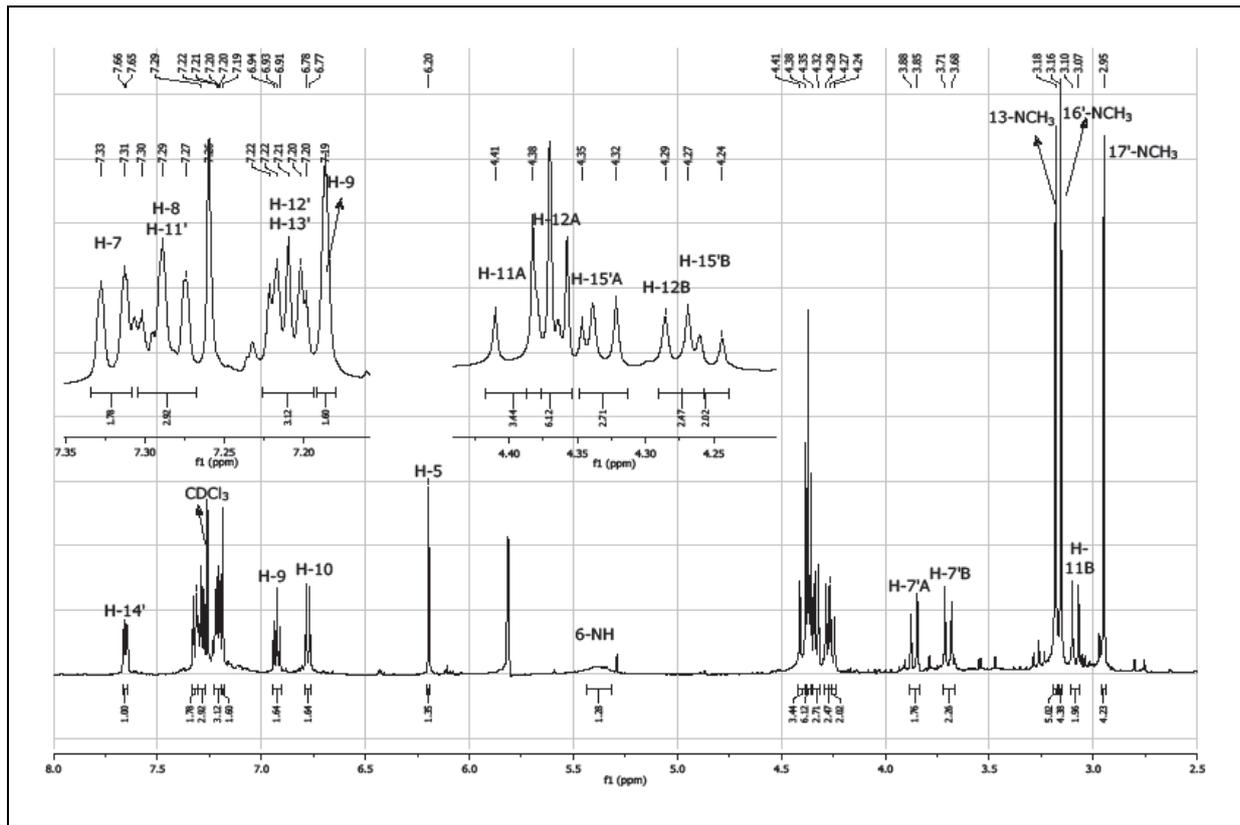


Abb. 97.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Chaetomin, gemessen in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz)

### 3.10. Untersuchung auf Biologische Aktivitäten der aus Endophytischen Pilze erhaltenen Inhaltsstoffe

#### 3.10.1 Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Pleurophoma cava* (SL-5)

Im initialen Screening auf biologische Aktivität konnte für den EtOAc- und BuOH-Extrakt des Pilzes *P. cava* SL-5 keine ausgeprägte Bioaktivität nachgewiesen werden. Die beiden Extrakte zeigten schließlich im Agarplattendiffusionstest lediglich eine schwache Hemmwirkung gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis*.

Die aus dem EtOAc-Extrakt isolierte Substanz Aposphaerin A wurde auf ihr hemmendes Potential gegenüber der Tumorzelllinien L-5178Y (Lymphomzellen der Maus) getestet, und auch in diesem Fall wurde keine deutliche zytotoxische Wirkung festgestellt. Aposphaerin A wurde ebenso hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung an Proteinkinasen geprüft. In Gegensatz zum Ergebnis des vorherigen Testes zeigte die Substanz hier eine ausgeprägte Hemmwirkung auf 4 von 24 getestete Proteinkinasen. Gegenüber den Proteinkinasen IGF1-R, VEGF-R2, SRC und SAK wurde eine Hemmung zwischen 50 und 75% und IC<sub>50</sub>-Werte zwischen  $1.3 - 1.9 \times 10^{-5}$  festgestellt (siehe Tab. 46 und 47).

**Tabelle 37. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *P. cava* (SL-5)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität Wachstum in %
	BS	EC	SC	CC	CH	L5178Y
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	10 µg/ml
<b>SL-5 EtOAc</b>	7	5	5	5	5	-
<b>SL-5 BuOH</b>	7	5	5	5	5	-
<b>Aposphaerin A</b>	-	-	-	-	-	94.4

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

#### 3.10.2. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Penicillium chrysogenum* (HN-B2)

Der EtOAc-Extrakt von *P. chrysogenum* Stamm HN-B2 wurde auf antibiotische und zytotoxische Aktivität getestet. Der Extrakt zeigte eine mittelstarke antimikrobielle Wirkung gegen *B. subtilis* und *E. coli*. Gegenüber der Tumorzelllinie L-5178Y konnte für den Extrakt

sowie für die daraus isolierten Verbindungen Terrestrinsäure, Viridicatin und Viridicatol keine signifikante Wachstumshemmung nachgewiesen werden. Lediglich Roquefortin C zeigte in dem genannten Bioassay eine moderate Hemmung der L-5178Y-Zellen. Dennoch zeigte diese Substanz keine nennenswerte Hemmwirkung gegen die getestete Proteinkinasen (siehe Tab. 46).

**Tabelle 38. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *P. chrysogenum* (HN-B2)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität Wachstum in %
	BS	EC	SC	CC	CH	L5178Y
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	10 µg/ml
<b>HN-B2 EtOAc</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	6	5	5	110.5
<b>Terrestrinsäure</b>	-	-	-	-	-	107.1
<b>Viridicatin</b>	-	-	-	-	-	94.8
<b>Viridicatol</b>	-	-	-	-	-	94.8
<b>Roquefortin C</b>	-	-	-	-	-	<b>57.8</b>

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.3. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Botryosphaeria rhodina* (BT-3)

Für den EtOAc-Extrakt von *B. rhodina* (BT-3) konnte im antibiotischen Test eine ausgeprägte antimykotische Aktivität gegenüber *Cladosporium curcumerinum* und *C. herbarum*, aber keine erwähnenswerte Toxizität gegenüber den getesteten Bakterien- und Hefestämmen ermittelt werden. Der Extrakt zeigte außerdem eine leichte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzelllinie L-5178Y. Auf Grund der geringeren Probemenge konnten Griseofulvin, Dechlorogriseofulvin und Cycloaspeptid A keinen weiteren Bioassays unterzogen werden. Sclerotigenin zeigte gegenüber den murinen Lymphomazellen eine sehr starke Wachstumshemmung, wobei einen EC<sub>50</sub>-Wert von 1.8 µg/ml bestimmt wurde. Allerdings konnte für Sclerotigenin im Test auf inhibitorische Aktivität gegenüber Proteinkinasen keine deutliche Wirkung auf die getestete Enzyme festgestellt werden (siehe Tab. 46).

**Tabelle 39. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *B. rhodina* (BT-3)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität	
	BS	EC	SC	CC	CH	L5178Y Wachstum in %	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	10 µg/ml	
<b>BT-3 EtOAc</b>	5	7	6	20	13	74.2	-
<b>Sclerotigenin</b>	-	-	-	-	-	-1.4	1.8

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.4. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Neurospora discreta* (NE-8)

Der EtOAc-Extrakt aus dem Pilzen *N. discreta* sowie der daraus gewonnene Naturstoff Kojisäure wies im Test eine schwache antibakterielle Wirkung gegenüber dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis* auf.

**Tabelle 40. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *N. discreta* (NE-8)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)				
	BS	EC	SC	CC	CH
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg
<b>NE-8 EtOAc</b>	7	5	5	5	5
	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg
<b>Kojisäure</b>	8	5	5	5	5

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.5. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Fusarium incarnatum* (MGC-1.3)

Für den EtOAc-Extrakt des Pilzes *F. incarnatum* (MGC-1.3) konnte eine antibiotische Aktivität gegenüber *B. subtilis* nachgewiesen werden. Gegen die Testorganismen *C. curcumerinum* und *C. herbarum* wurde eine starke antifungale Aktivität beobachtet. Weiterhin erwies sich der EtOAc-Extrakt auch als zytotoxisch aktiv gegen Maus-Lymphom-Zellen (L-5178Y). Sowohl Fusapyron wie Desoxyfusapyron erwiesen sich als stark aktiv im antifungalen Test und zeigten ebenso eine bedeutende antibakterielle Aktivität. Auch

Equisetin zeigte eine starke antimikrobielle Wirkung, allerdings lediglich gegen die gram-positiven Testbakterie.

**Tabelle 41. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *F. incarnatum* (MGC-1.3)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität		
	BS	EC	SC	CC	CH	Brine Shrimp Assay (Überlebensrate in %)		L5178Y (Wachstum in %)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	1000 µg	10 µg/ml
<b>MGC-1.3 EtOAc</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	100	95	<b>36.2</b>
	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	-	-	-
<b>Fusapyron</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>35</b>	<b>18</b>	-	-	-
<b>Desoxyfusapyron</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	-	-	-
<b>Equisetin</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	-	-	-

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.6. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Neurospora terricola* (MGC-5.1)

Der Ethylacetat-Extrakt des Pilzes *N. terricola* (MGC-5.1) wurde den bisher beschriebenen antibiotischen und zytotoxischen Assays unterzogen. Der Extrakt zeigte bei den Tests keine biologische Aktivität. Auf Grund der geringeren Probenmengen und den vorherigen negativen Ergebnissen wurden die aus diesem Extrakt isolierten Verbindungen Diaportinsäure, Diaportinol und 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol keinen weiteren Biotests unterzogen.

**Tabelle 42. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *N. terricola* (MGC-5.1)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität		
	BS	EC	SC	CC	CH	Brine Shrimp Assay (Überlebensrate in %)		L5178Y (Wachstum in %)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	1000 µg	10 µg/ml
<b>MGC-5.1 EtOAc</b>	5	5	5	5	5	100	100	102.1

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.7. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Xylaria* sp. (MGC-12.3)

Der Ethylacetat-Extrakt aus dem Pilz *Xylaria* sp. Stamm MGC-12.3 wies im Agarplattendiffusionstest eine moderate antifungale Aktivität gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* auf. Allerdings wurde gegenüber den anderen Testorganismen keine biologische Aktivität des Extrakts festgestellt. Eine potente zytotoxische Wirkung zeigte der Extrakt hingegen im *Brine Shrimp Assay*, hierfür wurde eine Überlebensrate unter Einwirkung des Extrakts in den beiden getesteten Dosen von null beobachtet. Ebenso bemerkenswert war das Ergebnis des Tests zur Bestimmung des zytotoxischen Potentials gegenüber Maus-Lymphomzellen (L-5178Y), wo der Extrakt eine 100%ige Hemmung des Wachstums der eingesetzten Testzellen bewirkte. Des Weiteren zeigten die isolierten Reinsubstanzen (*E*)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat, Cytochalasin E und den neuen Naturstoff 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure ebenfalls eine potente Zytotoxizität gegenüber der L-5178Y-Zelllinie mit  $EC_{50}$ -Werte  $\leq 1.0$  µg/ml. Dagegen besaß lediglich (*E*)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat eine bedeutende Hemmungswirkung gegen die getesteten Proteinkinasen. Besonders nennenswert war die durch die Substanz erzielte Hemmung zwischen 44 und 50% für die Proteinkinasen EGF-R, VEGF-R2 und SRC (siehe Tab. 46).

**Tabelle 43. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Xylaria* sp. (MGC-12.3)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Brine Shrimp Assay		Zytotoxizität	
	BS	EC	SC	CC	CH	Überlebensrate (%)		L5178Y Wachstum in %	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	1000 µg	10 µg/ml	
<b>MGC-12.3 EtOAc</b>	5	5	<b>10</b>	5	5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-1.1</b>	-
	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg				
<b>Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.9</b>	<b>0.5</b>
<b>Cytochalasin E</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>1.6</b>	<b>&lt;0.1</b>
<b>1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>-0.8</b>	<b>1.0</b>

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.8. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Hypoxylon fragiforme* (BT-III.1)

Die EtOAc- und MeOH-Extrakte von *Hypoxylon fragiforme* (BT-III.1) wurde dem initialen Screening auf biologische Aktivität unterzogen. Dabei zeigten die beiden Extrakte im Antibiotikatest gegen *Bacillus subtilis* eine schwache Aktivität. Gegen die anderen Mikroorganismen konnte keine Wirkung beobachtet werden. In weiteren Untersuchungen zur Zytotoxizität mit den L-5178Y-Zelllinien wiesen die Extrakte dagegen eine starke antiproliferative Aktivität auf. Das stark zytotoxische Potential des Extrakts ließ sich zu einem Teil auf die 99.3%ige Hemmungswirkung des Cytochalasins H (EC<sub>50</sub> 1.4 µg/ml) zurückführen, aber auch auf die starke Aktivität des neuen Naturstoffes 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-Dihydro-2-benzofuran-1-on sowie des bekannten Antibiotikums RF-3192-C. Orsellinsäure und Mitorubrinol konnten das Wachstum der Testzellen nicht hemmen. Mitorubrinsäure zeigte im Test nur eine mäßige Aktivität. Neben den genannten Tests wurden die isolierten Reinsubstanzen RF-3192-C, Orsellinsäure, Mitorubrinsäure und Cytochalasin H ebenso hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung an Proteinkinasen untersucht. Dabei zeigten

Cytochalasin H und Orsellinsäure keine ausgeprägte Aktivität. RF-3192-C und Mitorubrinsäure waren dagegen am aktivsten und wurden für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung ausgewählt (siehe Tab. 47). RF-3192-C zeigte in Testung mit den Proteinkinasen EGF-R, IGF1-R, SRC, VEGF-R3 und SAK eine Hemmung zwischen 81 und 88%. IGF1-R, SRC, VEGF-R2 und SAK zeigte unter Einwirkung der Mitorubrinsäure eine Hemmung zwischen 47 und 52% (siehe Tab. 46).

**Tabelle 44. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Hypoxyton fragiforme* (BT-III.1)**

Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität	
	BS	EC	SC	CC	CH	L5178Y Wachstum in %	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	10 µg/ml	
<b>BT-III.1EtOAc</b>	<b>11</b>	5	5	5	5	<b>2.8</b>	-
<b>BT-III.1MeOH</b>	<b>10</b>	6	5	5	5	<b>5.5</b>	-
	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg		
<b>Orsellinsäure</b>	-	-	-	-	-	150.3	-
<b>3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on</b>	-	-	-	-	-	<b>11.5</b>	<b>7.8</b>
<b>RF-3192-C</b>	-	-	-	-	-	<b>38.8</b>	-
<b>Mitorubrinsäure</b>	-	-	-	-	-	79.1	-
<b>Mitorubrinol</b>	-	-	-	-	-	112.4	-
<b>Cytochalasin H</b>	-	-	-	-	-	<b>0.7</b>	<b>1.4</b>

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

### 3.10.9. Biologische Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Eurotium rubrum* (BT-1)

Der EtOAc-Extrakt des Pilzes *Eurotium rubrum* (BT-1) zeigte im Agarplattendiffusionstest eine moderate Aktivität gegen *Bacillus subtilis* sowie eine mäßige Aktivität gegen *Escherichia coli*, aber keine antifungale Wirkung gegenüber *Saccharomyces cerevisiae*. Im Zytotoxizitätstest bewirkte der Extrakt eine 99.8%ige Hemmung des Wachstums der L-5178Y-Zelllinien. Die aus dem Ethylacetat-Extrakt isolierten Substanzen Cochliodinol und Chaetomin wiesen ebenso eine sehr starke Hemmungswirkung auf die Testzellen auf. Beim Proteinkinaseassay zeigten beide Substanzen inhibitorische Wirkung

gegenüber Proteinkinasen, wobei Chaetomin am aktivsten war. Unter dessen Einwirkung wurde eine Hemmung zwischen 85 und 96% bei den Proteinkinasen B-RAF-VE, IGF1-R, SRC, VEGF-R2 und MET festgestellt (siehe Tab. 46).

**Tabelle 45. Untersuchung der biologischen Aktivität der Inhaltsstoffe aus *Eurotium rubrum* (BT-1)**

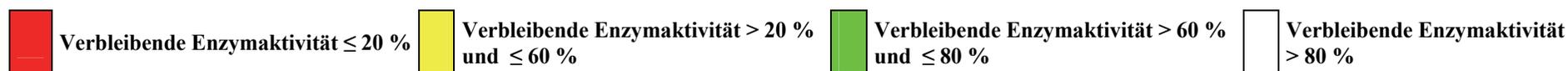
Probe	Antibiotische Aktivität HH (mm)					Zytotoxizität	
	BS	EC	SC	CC	CH	L5178Y Wachstum in %	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	10 µg/ml	
<b>BT-1 EtOAc RLS</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	-	-	<b>0.2</b>	-
	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg		
<b>Cochliodinol</b>	-	-	-	-	-	<b>1.2</b>	<b>2.4</b>
<b>Chaetomin</b>	-	-	-	-	-	<b>-0.4</b>	-

BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CC: *Cladosporium curcumerinum*, CH: *Cladosporium herbarum*  
Durchmesser der Filterscheibe: Ø 5 mm

**Tabelle 46. Bioaktivität von 10 ausgewählten Substanzen auf 24 verschiedene humane tumorrelevante Proteinkinasen (Verbleibende Enzymaktivität in %)<sup>1</sup>**

Substanz (1 mg/ml)	AKT1	ARK5	Aurora-A	Aurora-B	B-RAF-VE	CDK2/Cyc A	CDK4/Cyc D1	CK2- alpha1	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK	IGF1-R	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3	COT	PLK1	SAK	TIE2	FLT3	INS-R	MET	PDGFR- beta
<b>Aposphaerin A</b>	106	104	96	88	76	136	96	103	61	83	87	97	34	25	48	85	88	110	50	99	131	113	118	117
<b>Roquefortin C</b>	115	100	107	100	105	129	122	108	111	86	103	109	96	95	103	112	119	110	89	96	139	97	110	110
<b>Sclerotigenin</b>	76	97	93	95	110	102	100	98	92	88	104	93	95	95	97	99	103	92	104	112	100	99	98	107
<b>(E)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat</b>	103	105	100	92	78	107	96	89	56	75	67	67	71	50	53	68	75	106	110	98	94	118	111	108
<b>Cytochalasin E</b>	96	95	96	87	99	109	97	98	89	103	90	89	95	93	88	95	96	107	93	103	94	96	102	98
<b>1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)- 3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure</b>	99	96	102	90	111	90	102	96	96	94	100	98	104	96	99	89	108	103	90	93	86	96	98	101
<b>RF-3192-C</b>	97	88	78	61	65	151	66	89	16	72	44	97	19	12	13	44	62	92	12	70	36	80	90	101
<b>Orsellinsäure</b>	104	99	94	91	102	98	96	98	94	100	100	107	84	75	83	96	114	109	85	84	94	98	101	90
<b>Mitorubrinsäure</b>	81	95	100	71	89	175	81	92	70	95	77	98	52	48	53	89	92	103	50	92	81	76	101	107
<b>Cytochalasin H</b>	103	98	104	101	111	126	107	104	97	97	94	101	95	93	92	104	123	113	109	106	105	103	106	111
<b>Cochliodinol</b>	97	77	92	96	63	92	92	89	85	75	93	82	58	39	64	83	90	103	90	97	88	91	84	97
<b>Chaetomin</b>	53	34	59	74	15	65	34	56	22	40	63	66	9	15	10	28	29	47	44	80	39	85	4	39

<sup>1</sup> ProQinase GmbH, Freiburg



**Tabelle 47. Bioaktivität von 3 ausgewählten Substanzen auf 24 verschiedene humane tumorrelevante Proteinkinasen (IC<sub>50</sub> in g/ml)<sup>1</sup>**

Substanz	AKT1	ARK5	Aurora-A	Aurora-B	B-RAF-VE	CDK2/Cyc A	CDK4/Cyc D1	CK2-alpha1	EGF-R	EPHB4	ERBB2	FAK
Aposphaerin A	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	5.1 × 10 <sup>-6</sup>	9.3 × 10 <sup>-6</sup>	3.9 × 10 <sup>-6</sup>	4.3 × 10 <sup>-6</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	2.5 × 10 <sup>-6</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	6.3 × 10 <sup>-6</sup>	8.5 × 10 <sup>-6</sup>
RF-3192-C	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.1 × 10 <sup>-6</sup>	3.0 × 10 <sup>-6</sup>	1.4 × 10 <sup>-6</sup>	6.9 × 10 <sup>-7</sup>	8.7 × 10 <sup>-6</sup>	1.7 × 10 <sup>-6</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	2.7 × 10 <sup>-7</sup>	2.1 × 10 <sup>-6</sup>	1.0 × 10 <sup>-6</sup>	4.6 × 10 <sup>-6</sup>
Mitorubrinsäure	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	2.4 × 10 <sup>-6</sup>	4.4 × 10 <sup>-6</sup>	1.6 × 10 <sup>-6</sup>	2.9 × 10 <sup>-6</sup>	9.7 × 10 <sup>-6</sup>	2.5 × 10 <sup>-6</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.7 × 10 <sup>-6</sup>	5.4 × 10 <sup>-6</sup>	4.0 × 10 <sup>-6</sup>	9.4 × 10 <sup>-6</sup>

Substanz	IGF1-R	SRC	VEGF-R2	VEGF-R3	FLT3	INS-R	MET	PDGFR-beta	PLK1	SAK	TIE2	COT
Aposphaerin A	1.3 × 10 <sup>-6</sup>	1.7 × 10 <sup>-6</sup>	1.9 × 10 <sup>-6</sup>	4.3 × 10 <sup>-6</sup>	5.3 × 10 <sup>-6</sup>	9.0 × 10 <sup>-6</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	>1.0 × 10 <sup>-5</sup>	1.8 × 10 <sup>-6</sup>	6.1 × 10 <sup>-6</sup>	3.7 × 10 <sup>-6</sup>
RF-3192-C	2.8 × 10 <sup>-7</sup>	6.0 × 10 <sup>-7</sup>	5.8 × 10 <sup>-7</sup>	1.1 × 10 <sup>-6</sup>	7.5 × 10 <sup>-7</sup>	1.5 × 10 <sup>-6</sup>	3.5 × 10 <sup>-6</sup>	3.5 × 10 <sup>-6</sup>	4.2 × 10 <sup>-6</sup>	2.9 × 10 <sup>-7</sup>	1.1 × 10 <sup>-6</sup>	1.3 × 10 <sup>-6</sup>
Mitorubrinsäure	1.3 × 10 <sup>-6</sup>	1.7 × 10 <sup>-6</sup>	1.7 × 10 <sup>-6</sup>	5.2 × 10 <sup>-6</sup>	1.2 × 10 <sup>-6</sup>	1.5 × 10 <sup>-6</sup>	4.8 × 10 <sup>-6</sup>	4.8 × 10 <sup>-6</sup>	5.6 × 10 <sup>-6</sup>	7.3 × 10 <sup>-7</sup>	3.2 × 10 <sup>-6</sup>	6.3 × 10 <sup>-6</sup>

<sup>1</sup> ProQinase GmbH, Freiburg

 IC<sub>50</sub> (g/ml) zwischen 1 × 10<sup>-6</sup> und 1 × 10<sup>-7</sup>
 IC<sub>50</sub> (g/ml) zwischen 1 × 10<sup>-5</sup> und 1 × 10<sup>-6</sup>
 IC<sub>50</sub> (g/ml) über 1 × 10<sup>-5</sup>

#### 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat eine aktuelle und wichtige Fragestellung der Wirkstoffforschung zum Gegenstand: Mit den endophytischen Pilzen wurde eine bisher nur unvollständig erschlossene Quelle neuer biologisch aktiver Substanzen näher untersucht.

Die Vorteile der Gewinnung neuer Wirkstoffe aus endophytischen Mikroorganismen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, bestehen gegenüber Makroorganismen vor allem darin, dass die Gewinnung nahezu beliebiger Substanzmengen durch Fermentierung ohne Belastung natürlicher Ressourcen möglich ist und somit das Problem des Substanznachschubs, das die Entwicklung von Naturstoffen zu Arzneistoffen bereits in vielen Fällen stark behindert hat, prinzipiell einfacher lösbar ist. Somit stellen Endophyten bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe und anderer biologisch aktiver Substanzen besonders wertvolle Ressourcen mit wachsender Bedeutung dar. Aus diesen Gründen ist eine Intensivierung der Erforschung von Sekundärstoffen aus endophytischen Pilzen besonders aussichtsreich und bildete demzufolge den Schwerpunkt dieser Dissertation.

Eine gezielte Auswahl der Wirtsorganismen ist für das Auffinden von Endophyten mit der Fähigkeit zur Produktion neuartiger biologisch aktiver Sekundärstoffe von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Isolierung der endophytischen Pilzen Wirtsorganismen ausgewählt, die nach in der Literatur etablierten Kriterien (Strobel *et al.*, 2004) als vielversprechende Quellen zählen dürften, weil sie aus ungewöhnlichen Habitaten stammen oder bekannte biologische Wirkungen besitzen. Die chinesische Mangrovepflanzen *Hertiera littoralis*, *Bruguiera gymnorhiza* und *Aegiceras corniculatum* stammen aus einem Ökosystem mit extremen Bedingungen, die ein hohes Ausmaß an Anpassungsstrategien von seinen Bewohnern erfordern. Die Produktion von einzigartigen Naturstoffen sei eine solche Strategie (Bandaranayake, 1998). Darüber hinaus finden die oben genannten Mangrovepflanzen in der traditionellen Medizin ihre Anwendung als Mittel gegen Asthma, Diabetes, Rheumatismus (*A. corniculatum*), Augenkrankheiten (*B. gymnorhiza*) und Diarrhöe (*H. littoralis*) (Bandaranayake, 1998). Die auf dem Campus der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gesammelten Pflanzen *Iris pseudacorus* (Sumpf-Schwertlilie) und *Corylus avellana* (Haselnuss) spielen ebenso eine ethnobotanische Rolle als Arzneimittel. In der Volksmedizin werden den Haselnussblättern eine adstringierende, vasoprotektive und antiödematöse Wirkung zugeschrieben, die zur Behandlung von Hämorrhoiden,

Krampfaderbeschwerden, Phlebitis und Ödemen der unteren Glieder eingesetzt werden (Oliveira *et al.*, 2007). Die Sumpf-Schwertlilie soll ebenso eine adstringierende sowie tonische Wirkung besitzen. Ihre Wurzel und Rhizome finden bei Atemwegsinfektionen, Pneumonie, Magengeschwüren, Harnwegsentzündungen und Dysmenorrhoe Verwendung (Rakhimov *et al.*, 2006). Die in Nigeria gesammelte Bonko-Frucht *Morinda lucida* wird ebenfalls naturheilkundlich eingesetzt. In der traditionellen westafrikanischen Heilkunde findet sie sich als Mittel gegen Malaria, Fieber, Geschwüre, Gonorrhöe und Bluthochdruck. Außerdem werden ihr sedative sowie laxative Effekte zugeschrieben (Durodola, 1974; Olajide *et al.*, 1998). Ferner wurde das Lebermoos *Bazzania trilobata*, das aus dem Siebengebirge in der Nähe von Rheinbreitbach entstammte, in der vorliegenden Arbeit ebenso als Wirtsorganismus einbezogen. *B. trilobata* ist der Hauptbestandteil des kommerziellen Pflanzenstärkungsmittels zur Vorbeugung von Pilzkrankungen und Bakteriosen „Lebermooser“ (<http://www.jan-peter-frahm.de/Moosextrakt/Moosextrakt.htm>; <http://www.niem-handel.de>) und somit einer der wenigen Lebermoose, die praktische Bedeutung erlangt haben. Zudem erschien dieses Lebermoos als ein vielversprechender Wirt, was insbesondere in seinen für Moose ungewöhnlich chlorierten phenolischen Inhaltsstoffen sowie in seiner Vielzahl an fungiziden Naturstoffen begründet liegt (Martini *et al.*, 1997; Scher *et al.*, 2004).

Aus den dreizehn gesammelten Pflanzen, davon ein Lebermoos, wurden achtzehn Pilzstämme isoliert, identifiziert (siehe Tab. 2) und einem biologischen bzw. chemischen Primärscreening unterzogen. Auf Grund ihrer biologisch sowie chemisch analytisch aussichtsreich erscheinenden Extrakte wurden neun Pilzstämme (siehe Tab. 3) zur weiteren Untersuchung ausgewählt und bearbeitet. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Pilzstämme gehören, wie die meistens der endophytischen Pilze, zu den Ascomyceten (Arnold, 2007). Zu dieser Abteilung zählen bisher circa 32 800 Arten, darunter viele bekannte und wirtschaftlich bedeutende Pilze sowie zahlreiche Erreger bedeutender Pflanzenkrankheiten (Raven *et al.*, 2006). Unter den isolierten Pilzen befanden sich die ubiquitär verbreiteten Vertreter der Gattungen *Pleurophoma*, *Botryosphaeria*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Xylaria* und *Hypoxylon*, bei denen nicht davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um wirtsspezifische Symbionten handelte.

Die 33 isolierten Verbindungen entstammen unterschiedliche Substanzklassen wie Chinolin-, Indol-, Benzodiazepin- und Bis-Indolylquinon-Alkaloide, Tetron- und Tetransäurederivate, zyklische Pentapeptide, Azaphilone, Epipolythiodioxopiperazine, Isocoumarine, Cytochalasine, Pyronderivate sowie weitere Polyketide, von denen ein Isocoumarin und zwei Phthalide neue Sekundärstoffe darstellen. Die erwähnten

Verbindungen zeigen deutlich die chemische Variabilität der verschiedenen Stämme und somit das Potential endophytischer Pilze als Produzenten einer Vielfalt an biologischen aktiven, teils neuartigen Sekundärstoffen.

#### 4.1. Der Pilz *Pleurophoma cava* (SL-5) und seine Naturstoffe

Die Gattung *Pleurophoma* lebt weit verbreitet im Boden und auf Pflanzenmaterial. Viele Pilze dieser Gattung, wie hier *Pleurophoma (Phoma) cava* (siehe Synonymen unter 2.1.4.1.), treten häufig als opportunistische Pflanzenpathogene besonders bei Holzpflanzen auf, aber gelegentlich kommt es auch zu Infektionen beim Menschen und Tieren (De Gruyter *et al.*, 2009; Zaitz *et al.*, 1997). *Pleurophoma cava* und andere Pathogene derselben Gattung, die mit dem Eichensterben in Verbindung gebracht wurden, bleiben als Endophyten im Inneren des gesunden Pflanzengewebes unauffällig, bis ungünstige Klimaverhältnisse die Bäume anfälliger für Pilzbefall machen. Art und Erscheinung der verursachten Krankheitssymptome, die von diesen Pathogenen hervorgerufen werden, deuten darauf hin, dass phytotoxische Substanzen in der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen involviert sind (Linaldeddu *et al.*, 2009 und Maddau *et al.*, 2009). Aus *P. cava* wurde bereits das tetrasubstituierte Benzoesäurederivat Cavoxin isoliert, das ein phytotoxischer Sekundärstoff darstellt und somit den Ablauf der Krankheitsprozesse beeinflussen könnte. Neben Cavoxin wurden aus *P. cava* noch ein weiteres Benzoesäurederivat, Cavoxinin, sowie die Chroman-4-one Cavoxon und Cavoxinon isoliert, bei denen jedoch keine Phytotoxizität gezeigt werden konnte (Evidente *et al.*, 1985; Evidente *et al.*, 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus *P. cava* das Chroman-4-on-Derivat Aposphaerin A isoliert werden. Aposphaerin A und B wurden erstmals als Sekundärstoffe des aus einer Birke isolierten endophytischen Pilzes *Aposphaeria* sp. beschrieben (Krohn *et al.*, 1996). Aposphaerine, sowie Cavoxon und Cavoxinon, erhalten eine seltene 2-Vinylchroman-4-on-Substruktur, die eine vielversprechende Leitstruktur für die Entwicklung neuer Antibiotika gegen Gram-positive Bakterien sowie multiresistente Stämme, wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), darstellt (Langer, 2008). Untersuchungen zur Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehung haben gezeigt, dass die Anwesenheit einer unsubstituierten Vinylgruppe am Kohlenstoff C-2 der Chroman-4-on-Struktur für eine nennenswerte Aktivität

gegen verschiedene humanpathogene Bakterien und Hefen unbedingt erforderlich ist. Während Derivate mit einer substituierten Vinylgruppe, wie im Fall der natürlich vorkommenden 2-Vinylchroman-4-one, eine deutlich schwächere Aktivität zeigen, führt die Anwesenheit eines Chlor- oder Bromatoms zu einer Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung (Lalk *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2005; Langer, 2008; Hoettecke *et al.*, 2008).

In Übereinstimmung mit den Angaben aus der Literatur konnte im initialen Screening auf biologische Aktivität für den EtOAc-Extrakt, in dem Aposphaerin A der dominierende Inhaltsstoff war, lediglich eine schwache Hemmwirkung gegen das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden. Hingegen wurde bisher in der Literatur keine Angabe über eine Antitumoraktivität der 2-Vinylchroman-4-one gemacht. In der vorliegenden Arbeit konnte für Aposphaerin A eine ausgeprägte inhibitorische Aktivität gegenüber einigen Proteinkinasen nachgewiesen werden, jedoch keine deutliche zytotoxische Wirkung im Test mit der Zelllinie L-5178Y (Lymphomzellen der Maus). Das abweichende Ergebnis der Bioassays liegt womöglich daran, dass in den getesteten Lymphomzellen die gehemmten Proteinkinasen nicht vorliegen, nicht entscheidend für das Überleben der Zellen sind oder die Substanz während des Zellmetabolismus abgebaut oder modifiziert wird.

#### **4.2. Der Pilz *Penicillium chrysogenum* (HN-B2) und seine Naturstoffe**

*Penicillium chrysogenum* ist ein ubiquitär verbreiteter Pilz, der als einer der am häufigsten vorkommenden Schimmelpilze oft in der Raumluft sowie als Wandschimmel in Innenräumen in Erscheinung tritt (Fischer *et al.* 2003; Nielsen 2003). Konidien dieser *Penicillium*-Art sind auch aus diesem Grund einer der bedeutendsten Auslöser von Allergien (Mücke und Lemmen, 2004). Darüber hinaus kann *Penicillium chrysogenum* auch in Böden und auf verschiedenen Lebensmitteln, absterbenden Pflanzenteilen und Papier sowie Papierprodukten gefunden werden (Antranikian, 2006; Singh *et al.*, 2009). Ferner wurde der Saprotroph *P. chrysogenum* aus einer Vielzahl von Monokotyledonen, wie *Festuca* spp. (Poaceae), *Paris polyphylla* (Melanthiaceae) und *Oryza sativa* (Poaceae) (An *et al.*, 1993; Xuan *et al.*, 2010 und Naik *et al.*, 2009), sowie von Dicotyledonen, wie *Sesbania bispinosa* (Fabaceae), *Hyoscyamus muticus* (Solanaceae) und *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) (Anita *et al.*, 2009; Abdel-Motaal *et al.*, 2010 und Gazis und Chaverri, 2010), als Endophyt isoliert.

Die weitgehende Verbreitung von endophytischem Saprotrroph in vaskulären Pflanzen deutet auf einen starken Selektionsdruck durch den Wettbewerb zwischen den verschiedenen Arten um geeignete organische Substrate hin. Saprotrrophe Pilze, wie *P. chrysogenum*, die die Fähigkeit zur endophytischen Besiedlung der Pflanze im jungen Stadium besitzen, sind in einer privilegierten Stellung. Sobald der Seneszenz-Prozess beginnt, haben sie als Erstbesiedler einen Wettbewerbsvorteil, der zu erfolgreicherer Kolonisierung der absterbenden Pflanzenteile führen kann (Fisher und Petrini, 1992; Rodriguez und Redman, 1997). Die große Anpassungsfähigkeit von *P. chrysogenum* wird außerdem durch sein Vorkommen im marinen Habitat demonstriert, für das Mangroven- sowie Schwamm-assoziierte Stämme dieser Art bereits mehrfach beschrieben wurden. (El-Morsy, 1999; Bringmann *et al.*, 2005; Devi *et al.*, 2009; Anita *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2010; Bringmann *et al.*, 2010)

Als Quelle biologisch aktiver Naturstoffe wurde *P. chrysogenum*, früher *P. notatum* genannt, weltweit bekannt, nachdem A. Flemming im Jahr 1929 die antibiotische Wirkung dieses Schimmelpilzes entdeckte. Im 1940 isolierten Chain und Florey daraus den Wirkstoff Penicillin und setzten ihn klinisch ein (Nosek *et al.*, 1997). Industriell ist *P. chrysogenum* weiterhin ein wichtiger Penicilin-Produzent und die daraus hergestellten semisynthetischen Penicilline gehören immer noch zu den wichtigsten kommerziellen Antibiotika, die weltweit bei der Behandlung vor allem von durch Gram-positive Bakterien hervorgerufenen Infektionen Anwendung finden (Mücke und Lemmen, 2004; Frisvad *et al.*, 2004; Yunhua, H. *et al.*, 2007). Abgesehen von den Penicillinen ist *P. chrysogenum* dafür bekannt, eine bemerkenswerte Vielfalt an Sekundärstoffen, insbesondere mit antibiotischer Aktivität, zu produzieren. Die Metaboliten, die am häufigsten in dieser Art gefunden werden, sind die Roquefortine sowie verwandte Verbindungen (Frisvad *et al.*, 2004; Bringmann *et al.*, 2005). Penicilline, Roquefortine und Chrysogine gelten als chemotaxonomische Marker dieser Art (Kozlovsky *et al.*, 2009; Zhelifonova *et al.*, 2010). Des Weiteren ist aus diesem Saprotrroph ein breites Spektrum an lytischen Enzymen, wie Cellulasen, Hemicellulasen, Xylanasen und Amylasen bekannt (Yunhua, H. *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten aus *P. chrysogenum* die Naturstoffe Terrestrinsäure, Viridicatin, Viridicatol sowie Roquefortin C isoliert werden. Die genannten Substanzen sind charakteristische Sekundärstoffe für *Penicillium*-Arten der Subgattung *Penicillium*, zu der *P. chrysogenum* gehört (Frisvad *et al.*, 2004).

Diese Metaboliten spielen wahrscheinlich eine ökologische Rolle bei der Besiedelung des Wirtes sowie dem darauffolgenden Wachstum und der Vermehrung des Pilzes. Die Ablagerung von Metaboliten wie Roquefortin C, das dem Roquefortin/Oxalin-Biosyntheseweg entstammt und als eine Art extrazelluläre Stickstoffquelle für den Metabolismus des wachsenden Myceliums von Bedeutung sein könnte, sowie die synergistische Funktion von Terrestrinsäure und Viridicatin aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften, könnte eine Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit des Pilzes gegenüber konkurrierender Mikroorganismen bedingen (Overy *et al.*, 2005).

Roquefortin C ist ein modifiziertes Diketopiperazin-Mykotoxin, das biosynthetisch von den Aminosäuren Tryptophan und Histidin sowie der Prenyleinheit Dimethylallylpyrophosphat abgeleitet wird. Diese Substanz wurde zum ersten Mal aus *Penicillium roqueforti* isoliert (Ohmomo *et al.*, 1975). Ihre Struktur wurde jedoch erst später nach Reisolierung der Substanz aus derselben Pilz-Art aufgeklärt (Scott *et al.*, 1976). Zur Bioaktivität dieses in *Penicillium*-Arten häufig vorkommenden Mykotoxins liegen widersprechende Angaben in der Literatur vor. Roquefortin C gilt als neurotoxisch und soll bei Mäusen zu anfallsartigen Krämpfen führen, wobei dieser Befund allerdings bei nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte (Scott *et al.*, 1976; Arnold *et al.*, 1978; Clark *et al.*, 2005). Ebenso abweichend sind die LD<sub>50</sub>-Werte nach intraperitonealer Applikation in Mäusen, die zwischen 15-20 bzw. 20 mg/kg (Scott *et al.*, 1976; Ohmomo, 1982) und 169-189 bzw. 340 mg/kg variieren (Arnold *et al.*, 1978; Pitt, 1994). Wagener *et al.* (1980) beschrieben für diese Verbindung neurotoxische Eigenschaften gegenüber Eintagsküken, wohingegen Häggblom (1990) über das Auftreten von Paralysen bei Milchkühen, die mit Roquefortin C-haltiger Silage gefüttert wurden, berichtete. Dagegen bewirkte die Verfütterung von Roquefortin C-haltigem Käse an Mäuse (0,238 mg/kg/Tag) keinerlei klinische Symptome (Schoch *et al.*, 1984). Kopp und Rehm (1979) untersuchten die antibakterielle Wirkung dieses Naturstoffes und zeigten eine Hemmwirkung gegen Gram-positive Bakterien, die über Atmungskettencytochrome und Katalase verfügen. Weitere Untersuchungen von Kopp und Rehm (1981) zeigten, dass Roquefortin C die bakterielle RNA-Synthese hemmt, aber nur eine schwache Wirkung auf die DNA- und Protein-Synthese besitzt (Richard *et al.*, 2004). Der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte zytotoxische Test zeigte für Roquefortin C eine moderate Hemmung der Maus-Lymphom-Zelllinie L-5178Y. Clark *et al.* (2005) beschrieben für diesen Naturstoff ebenfalls eine moderate Zytotoxizität gegenüber Myelom-Zellen NS-1 (LD<sub>99</sub> 50 µg/ml). Diese zytotoxische Wirkung könnte möglicherweise auf die hemmende Aktivität von Roquefortin C gegen verschiedenen

Cytochromen P450 zurückzuführen sein (Aninat *et al.*, 2001). Gegen den getesteten Proteinkinasen konnte keine nennenswerte Hemmwirkung festgestellt werden.

Terrestrinsäure wurde zum ersten Mal 1936 als Metabolit des Pilzes *P. terrestre* von Birkinshaw und Raistrick beschrieben, für die sie jedoch eine falsche Struktur postulierten. Erst gegen Ende der 70er Jahre wurde mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie erkannt, dass die Verbindung als ein Isomerengemisch vorlag, und dem Naturstoff die richtige Struktur und absolute Konfiguration zugeordnet (Jacobsen *et al.* 1978). Terrestrinsäure, die eine wichtige Rolle in der Chemotaxonomie der Subgattung *Penicillium* spielt, ist eine Tetronsäure, die vermutlich direkt aus dem Zitronensäurezyklus gebildet wird (Lund und Frisvad, 1994; Frisvad *et al.*, 2004). Tetronsäure-Derivate kommen häufig in der Natur vor, wobei Ascorbinsäure (Vitamin C) ihr bekanntester Vertreter ist, gefolgt von Penicillinsäure. Solche 4-Hydroxy-(5H)furan-2-one besitzen eine Vielfalt an pharmakologischen Eigenschaften, wie antibiotische, antivirale, insektizide, herbizide, analgetische, antineoplastische, antikoagulatorische, antiepileptische und entzündungshemmende Aktivität, sowie eine Hemmwirkung gegenüber der HIV-1-Protease (Haynes und Plimmer, 1960; Effenberger und Syed, 1998; Athanasellis *et al.*, 2010). Untersuchungen der biologischen Aktivität von Terrestrinsäure weisen auf antibiotische, kardiotoxische und phytotoxische Wirkungen hin (Giarmar, 1948; Manabu, 1988; Frisvad und Samson, 2004; Overy *et al.*, 2005).

Die andere beiden aus *P. chrisogenum* isolierten Verbindungen, Viridicatin und Viridicatol, besitzen ebenso eine bedeutende chemotaxonomische Relevanz für die Subgattung *Penicillium* (Frisvad *et al.*, 2004). Viridicatin ist erstmalig aus *P. viridicatum* im Jahr 1953 und Viridicatol zehn Jahre später aus einem anderen Stamm derselben Gattung isoliert worden (Birkinshaw *et al.*, 1963). Biogenetisch entstehen die beiden Chinolinalkaloide aus den Aminosäuren Anthranilsäure, Phenylalanin und Methionin, wobei die Benzodiazepinderivate Cyclophenin und Cyclophenol als Vorstufen für Viridicatin und Viridicatol angesehen werden (Luckner, 1967; Luckner *et al.*, 1980). Viridicatin zeigt eine starke antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien sowie wachstumshemmende Eigenschaften auf Blätter und Wurzeln von Reiskeimlingen (Taniguchi und Satomura, 1970). Beide Chinolinon-Derivate sowie ihre biogenetischen Vorstufen zeigen eine hemmende Wirkung auf die Larvalentwicklung des Schadinsekts *Spodoptera littoralis*, wobei Viridicatol die stärkste Aktivität aufweist (Proksch *et al.*, 2008). Darüber hinaus zeigt Viridicatol eine moderate Hemmwirkung des Enzyms Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), ein Target für Immunsuppressiva, sowie auf die Proliferation von Milzlymphozyten nach Gabe von Concanavalin A (Lin *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Terrestrinsäure, Viridicatin und Viridicatol auf ihre Zytotoxizität untersucht, wobei keine Wachstumshemmung gegenüber der Tumorzelllinie L-5178Y nachgewiesen wurde.

#### **4.3. Der Pilz *Botryosphaeria rhodina* (BT-3) und seine Naturstoffe**

Der Pilz *Botryosphaeria rhodina* ist ein kosmopolitischer Pilz, der häufig als Endophyt auftritt, aber auch als opportunistisches Pathogen in mehr als 500 Pflanzenarten in den Tropen und Subtropen beschrieben wurde. Der pathogene Pilz *Lasiodiplodia theobromae*, ein asexuelles Entwicklungsstadium von *B. rhodina*, verursacht Trieb- und Zweigsterben an tropischen und subtropischen Bäumen und Sträuchern sowie Bläue (Mohali *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2006).

Zu den bisher beschriebenen Naturstoffen von *B. rhodina* gehören u.a. Verbindungen wie das ubiquitäre Phytohormon Jasmonsäure und seine Derivate (Matsuura *et al.*, 1998), das antileukämische Lasiodiplodin sowie seine Derivate (Lee *et al.*, 1982) und die fungiziden Depsidone Botryorhodin A-D (Abdou *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurden aus diesem Pilz vier Exopolysaccharide isoliert, darunter Botryosphaeran, das antimutagene und immunmodulatorische Wirkung besitzt (Vasconcelos *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte aus *B. rhodina* (BT-3), ein endophytischer Pilz aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata*, die Naturstoffe Griseofulvin, Dechlorgriseofulvin, Sclerotigenin und Cycloaspeptid A gewonnen werden. Bei früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ist bereits ein Stamm von *B. rhodina* isoliert worden, allerdings aus einem indonesischen Ditabaum *Alstonia scholaris* (Diesel, 2009). Trotz der unterschiedlichen Herkunft der einzelnen Pilzstämme wurde auch von Diesel (2009) die Benzofuranderivate Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin aus diesem Endophyt erhalten.

Griseofulvin, ein wichtiges Antimykotikum, wurde erstmals im Jahr 1939 aus dem Mycel von *Penicillium griseofulvum* isoliert. Seitdem wurde das chlorhaltige Polyketid vor allem aus mehreren *Penicillium*-Arten gewonnen (Grove *et al.*, 1952; Harris *et al.*, 1976; Simpson und Holker, 1977). Dennoch sind andere Pilzarten, wie *Aspergillus versicolor*, *A. lanosus*, *Memnoniella echinata*, *Xylaria* spp., *Khauskia (Nigrospora) oryzae*, *K. sacchari*,

*Nigrospora musae*, *N. sphaerica* und *Phomopsis* sp., sowie der Actinomycet *Streptomyces albolongus*, ebenso in der Lage diesen Naturstoff zu produzieren (Kingston *et al.*, 1976; Jarvis *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2005; Cafêu *et al.*, 2005; Řezanka und Spížek, 2005; Larsen *et al.*, 2005).

Griseofulvin findet Anwendung hauptsächlich in der Human- und Veterinärmedizin gegen pilzliche Hauterkrankungen und gelegentlich in der Rheumatologie (Cohen *et al.*, 1960; Ferri *et al.*, 1986; Dubost *et al.*, 2003). Die fungistatische Wirkung der Substanz gegenüber Dermatophyten (*Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton*) beruht vorwiegend auf der Störung der Funktion der Mikrotubuli und somit auf einer Mitosehemmung. Darüber hinaus stört Griseofulvin bei empfindlichen Pilzen den Aufbau chitinhaltiger Zellwände und ruft dabei charakteristische Kräuselung („curling effect“) und Wandverdickungen hervor (Finkelstein *et al.*, 1996; Dingermann *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden in der Literatur für die Substanz eine Hemmwirkung der Replikation des Hepatitis-C-Virus sowie eine antiproliferative Aktivität auf Krebszellen beschrieben (Ho *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2005; Rebacz *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; Rønneest *et al.*, 2010).

Dechlorgriseofulvin, ein halogenfreies Derivat des Griseofulvins, wurde erstmals 1951 aus *Penicillium griseofulvum* und *P. janczewskii* isoliert (MacMillan, 1951). Im Vergleich zu Griseofulvin zeigte Dechlorgriseofulvin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine viel schwächere antimykotische Aktivität (MacMillan, 1951; Park *et al.*, 2005).

Bei dem EtOAc-Extrakt (BT-3 EtOAc) von *B. rhodina* wurde in durchgeführten antibiotischen Tests eine ausgeprägte antimykotische Aktivität gegenüber *Cladosporium curcumerinum* und *C. herbarum* nachgewiesen. Der Extrakt zeigte außerdem eine leichte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzelllinie L-5178Y. Die antimykotische sowie zytotoxische Wirkung könnten auf die Anwesenheit von Griseofulvin in dem Extrakt zurückgeführt werden, da sich die genannten biologischen Aktivitäten in Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturangaben befinden. Auf Grund der geringen Probenmenge konnten Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin keinen weiteren Bioassays unterzogen werden.

Das zyklische Pentapeptid Cycloaspeptid A wurde zum ersten Mal aus einem *Aspergillus*-Stamms isoliert (Kobayashi *et al.*, 1986), später ebenfalls aus Stämmen von *Penicillium* spp. und *Tricothecium* sp. (Dalsgaard *et al.*, 2004; Dalsgaard *et al.*, 2005; Lewer *et al.*, 2006; Frisvad *et al.*, 2006). Cycloaspeptid A wurde in unserem Arbeitskreis hinsichtlich seiner Zytotoxizität untersucht. Dabei zeigte die Substanz einen zytostatischen Effekt

gegenüber humanen Leukämie-Zellen mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration abhängig von der Zellart zwischen 2 und 9 µg/ml (Hiort, 2002). Darüber hinaus zeigt Cycloaspeptid A eine moderate Aktivität (IC<sub>50</sub> 3.5 g/ml) gegen den Erreger der Malaria *Plasmodium falciparum* (Dalsgaard *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Dissertation wurde Cycloaspeptid A hinsichtlich seiner Bioaktivität auf Grund der geringeren Probenmenge nicht untersucht.

Sclerotigenin wurde erstmalig als synthetische Verbindung bekannt (Harrison *et al.*, 1977; Mhaske *et al.*, 2006). Später wurde dieses Benzodiazepin-Chinazolinon Derivat als Hauptkomponente eines Dichlormethan-Extrakts aus Sklerotien von *P. sclerotigenum* isoliert (Joshi *et al.*, 1999). Da die Verbindung eine stark insektizide Wirkung in Tests mit dem Baumwollkapselwurm *Helicoverpa zea* zeigte, schlugen Joshi *et al.* (1999) für Sclerotigenin eine Rolle bei der Langlebigkeit der Sklerotien vor. Larsen *et al.* (2000) konnten in einem UV-geleiteten Screening Sclerotigenin aus Myzelien und Sporen von insgesamt sechs verschiedenen *Penicillium*-Arten identifizieren, was sie ebenfalls zu dem Schluss veranlasste, dass die Substanz zum chemischen Schutz von Myzelien und Sporen beitragen könnte. Bei den in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf biologische Aktivität zeigte Sclerotigenin mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 1.8 µg/ml eine sehr starke zytotoxische Wirkung gegen die murine Lymphomazelllinie L-5178Y.

#### **4.4. Der Pilz *Neurospora discreta* (NE-8) und seine Naturstoffe**

Während die bisher beschriebenen Pilzarten in der Forschung als Produzenten für bioaktive Naturstoffe beschrieben wurden, dient die Gattung *Neurospora* traditionell als Modellorganismus für molekularbiologische Entwicklungsprozesse (Fuchs, 2007). Vor allem die Leitart *N. crassa* entwickelte sich zum Lehrbuchbeispiel und wird ausgiebig für genetische, biochemische und molekulare Studien verwendet. *N. crassa* ist schließlich auch der erste Schlauchpilz (Ascomycet), für den 2003 eine vollständige Genomsequenz veröffentlicht wurde (Turner *et al.*, 2001; Galagan *et al.*, 2003; Kück, 2004).

Die Gattung *Neurospora* ist ubiquitär verbreitet in feuchten tropischen und subtropischen Regionen (Turner *et al.*, 2001). Allerdings können Vertreter dieser Gattung

auch in den gemäßigten Zonen als primäre Kolonisatoren von Bäumen und Sträuchern, die durch Waldbrände gestorben sind, vorkommen (Jacobson *et al.*, 2004a und 2004b).

Der Name der in dieser Arbeit untersuchte *Neurospora*-Art, *N. discreta*, deutet auf ihre charakteristische strenge reproduktive Isolation von anderen Arten dieser Gattung hin (Perkins und Raju, 1986). *N. discreta* eignet sich besonders gut für populationsgenetische Untersuchungen (Jacobson *et al.*, 2004a und 2004b), wohingegen Sekundärstoffe aus *N. discreta* bislang nur wenig untersucht wurden (Sowemimo *et al.*, 2008).

Aus der Kultivierung der Stamm NE-8 von *N. discreta* auf Wickerham-Flüssigmedium wurde ein EtOAc-Extrakt gewonnen, welcher das  $\gamma$ -Pyrone Kojisäure als dominierenden Inhaltstoff enthielt. Diese bekannte Verbindung wurde bereits 1907 von Saito aus *Aspergillus oryzae* (japanisch: „Koji“) aus gedämpftem Reis isoliert. Die Struktur der Kojisäure wurde erst in 1924 von Yabuta aufgeklärt. Die Substanz wird von verschiedenen Pilzen gebildet, darunter *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Lecytophora* sp., sowie einigen Vertretern der Bakteriengattung *Acetobacter* (Yabuta, 1916; Parrish *et al.*, 1966; Brtko *et al.*, 2004; Diesel, 2009; Mohamad *et al.*, 2010).

Kojisäure ist ein multifunktionaler sauerstoffhaltiger Heterocyclus mit mehreren wichtigen Reaktionszentren, die Additionsreaktion, Oxidation und Reduktion, Alkylierung und Acylierung, nukleophile und elektrophile Substitution sowie eine Ringöffnungsreaktion ermöglichen. Darüber hinaus bildet Kojisäure stabile, wasserunlösliche Metallchelate. Ferner ist sie leicht löslich in Wasser, Ethanol, Aceton und Ethylacetat. All diese Eigenschaften machen aus Kojisäure eine vorteilhafte Leitstruktur für die Gewinnung neuer Wirkstoffe (Wilson, 1966; Brtko *et al.*, 2004).

Kojisäure hat viele industrielle Anwendungen und das Interesse an ihr und ihren Derivaten steigt enorm, insbesondere in der Kosmetikindustrie. Mohamad *et al.* (2010) haben in einem Artikel die verschiedenen Anwendungen der Kojisäure zusammengefasst. Sie wird in erster Linie weltweit als Ausgangsmaterial für die Herstellung von hautaufhellenden Cremes, Hautschutz-Lotionen, Bleichseifen und Zahnpflegeprodukten verwendet. Ihre bleichende Eigenschaft wird durch ihre starke hemmende Wirkung auf das Enzym Tyrosinase, und somit die Einschränkung der Melanin-Bildung, verursacht. Des Weiteren wird in der Literatur für Kojisäure fungizide, antibakterielle, insektizide und antioxidative Aktivität angegeben (Brtko *et al.*, 2004; Bentley, 2006; Mohamad *et al.*, 2010). In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tests auf antimikrobielle Aktivität wies

Kojisäure lediglich eine schwache antibakterielle Wirkung gegenüber dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* auf.

#### 4.5. Der Pilz *Fusarium incarnatum* (MGC-1.3) und seine Naturstoffe

Die Gattung *Fusarium* ist weltweit im Boden und an unter- und oberirdischen Pflanzenteilen, Pflanzenresten oder anderem organischen Substraten verbreitet. Sie kommt vor allem in tropischen und gemäßigten Gebieten vor, aber auch dort wo raueste klimatische Bedingungen herrschen, wie in Wüsten oder in alpinen und arktischen Gebieten (Nelson *et al.*, 1994; Zain, 2010). Diese Gattung enthält neben saprophytischen Vertretern auch einige wirtschaftlich bedeutsame Pflanzenparasiten, sowie einige opportunistische Endophyten. Weil *Fusarium*-Arten imstande sind Zellulose zu zersetzen, besitzen sie zudem auch eine gewisse Bedeutung für den Humushaushalt des Bodens (Gerlach und Nirenberg, 1982; Adler und Lew, 1995).

*Fusarium*-Arten spielen ebenso als Mykotoxin-Produzenten eine wichtige Rolle. In den letzten Jahrzehnten wurden ihre Sekundärstoffe ausführlich untersucht, weil sie Naturstoffe produzieren, die eine Gefährdung für die tierische und menschliche Gesundheit darstellen (Zain, 2010). Aus der Gattung *Fusarium* wurden fast 450 unterschiedliche Verbindungen isoliert und charakterisiert, darunter Mykotoxine, Pigmente, Antibiotika und Phytotoxine (DNP Online, Jan. 2011). Zu den häufigsten von *Fusarium* spp. gebildeten Toxinklassen gehören die Trichothecene (darunter T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Deoxynivalenol, Fusarenon X und Nivalenol), die Fumonisine (insbesondere Fumonisin B<sub>1</sub>), die Cyclopeptide (Enniatin, Fusaproliferin und Beauvericin) und die Zearalenone (Nelson *et al.*, 1993; Bottalico, 1998; Hornbogen *et al.*, 2000; Fotso *et al.*, 2002).

*Fusarium incarnatum* (Synonym: *F. semitectum*) ist eine kosmopolitische Pilzart in tropischen bis subtropischen Klimazonen. Sie ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung als Erreger der Lagerfäule an tropischen Nutzpflanzen, besonders an Obst und Kartoffeln (Khoa *et al.*, 2004). Als Mykotoxinbildner wurde *F. incarnatum* dagegen bisher nur wenig untersucht. Li *et al.* (2008) isolierten aus einem Stamm dieser Art, der aus der chinesischen Mangrovepflanze *Aegiceras corniculatum* stammte, zwei neue Pyrrolalkaloide und ein neues

Indolderivat, sowie die drei bekannten Substanzen (-)-3a-Hydroxyfuroindolin, (3aR,8aS)-1-Acetyl-1,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2,3-b]-indol-3a-ol und N-Acetyltryptamin A. Rukmini und Bhat (1978) berichten von der Isolierung des T2-Toxins aus *F. incarnatum*, der aus einer verschimmelten Hirse isoliert wurde. Des Weiteren bildet *F. semitectum* die Toxine Beauvericin, Fusapyron und Desoxyfusapyron (Gupta *et al.*, 1991; Evidente *et al.*, 1994; Altomare *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Stamm MGC-1.3 aus der chinesischen Mangrovenpflanze *Heritiera littoralis* die Naturstoffe Fusapyron, Desoxyfusapyron und Equisetin isoliert.

Das Pyron Fusapyron wurde erstmals von Chalet *et al.* (1989) aus *Fusarium* sp. isoliert. Wenige Jahre später beschrieben Evidente *et al.* (1994) aus einem Stamm von *F. semitectum* diesselbe Verbindung sowie ihr 33-Desoxy-Derivat Desoxyfusapyron und belegten für beide eine antifungale Aktivität. Fusapyron und Desoxyfusapyron wurden ursprünglich als  $\alpha$ -Pyron-Derivate beschrieben (Chalet *et al.* 1989; Evidente *et al.*, 1994). Allerdings wiesen Hiramatsu *et al.* (2006) nach, dass sie in der Tat  $\gamma$ -Pyrone darstellen, als sie mit Neofusapyron ein weiteres Derivat isolierten, dessen Struktur der des ursprünglichen Fusapyrons entsprach. Anstelle der früher postulierten Struktur als 4-Hydroxy-2-pyron-Derivat wurde in Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten für Fusapyron eine 2-Hydroxy-4-pyron-Grundstruktur vorgeschlagen, während Neofusapyron auf der Grundlage empirischer IR-Daten, insbesondere der Streckschwingung der C=O-Bindung, einen 4-Hydroxy-2-pyron-Ring besitzen muss (Hiramatsu *et al.* 2006; Honma *et al.* 2010).

In der Literatur wird für die beiden  $\gamma$ -Pyrone eine bemerkenswert antifungale Aktivität sowie ein breites Wirkungsspektrum beschrieben (Chalet *et al.*, 1989; Evidente *et al.*, 1994; Altomare *et al.*, 2004; Hiramatsu *et al.* 2006). Im Bouillondilutionstest wies Desoxyfusapyron die niedrigsten minimale Hemm-Konzentrationen (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ) auf, was darauf hinweist, dass die Anwesenheit einer Hydroxygruppe an Position 33 eine Verminderung der antifungalen Aktivität bewirkt (Altomare *et al.*, 2004; Hiramatsu *et al.* 2006). Die mittels Agardiffusionmethode erhobenen Ergebnisse (Hemmhof in mm) ergaben dagegen stets Fusapyron als die aktivere der beiden Verbindungen (Altomare *et al.*, 2000).

**Tabelle 48. Antifungale Aktivität von Fusapyron und Desoxyfusapyron<sup>a,b</sup>**

Art (Stamm)	<i>Penicillium brevicompactum</i> (ITEM-449)		<i>Aspergillus flavus</i> (ITEM 9)	<i>A. flavus</i> (3)
	Hemmhof (mm) <sup>b, c</sup>	MHK (µg/ml) <sup>a</sup>	Hemmhof (mm) <sup>b, c</sup>	MHK (µg/ml) <sup>b</sup>
Fusapyron	30.0	1.56	27.3	1.56
Desoxyfusapyron	10.5	0.78	12.4	1.56
Nystatin	18.3	-	29.0	-
Benomyl	-	0.19	-	-
Dicloran	-	3.12	-	-

<sup>a</sup> Altomare *et al.*, 2004 <sup>b</sup> Altomare *et al.*, 2000 <sup>c</sup> 15µg/Disk

Da die beiden Methoden unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden, fällt es schwer die Ergebnisse zu vergleichen (s. Tab. 48). In erster Linie ist das Verhalten der Wirkstoffe in den jeweiligen Nährmedien als wichtiger Faktor zu berücksichtigen, da der Kontakt zwischen Wirkstoff und Testorganismus in einer Bouillon eine andere Kinetik als auf einer Agar-Oberfläche zeigt. Während im Agardiffusionsmethode die Wirkstoffe durch den festen Nährboden zum Mikroorganismus diffundieren müssen, werden im Bouillondilutionstest beide in einer Suspension in direktem Kontakt vermischt. Somit liegt es nahe, dass das unterschiedliche Diffusionsverhalten der Substanzen einen Einfluss auf die Ergebnisse des Agardiffusionstests hat. Die unterschiedliche Solubilität der Substanzen könnte ebenso die Ergebnisse in beiden Methoden beeinflussen. Eine schwer lösliche Substanz bzw. ein ungeeignetes Lösungsmittel könnten dazu führen, dass die tatsächliche Konzentration der Wirkstoffe unterschiedlicher ausfallen würde.

Die beiden  $\gamma$ -Pyrone wurden außerdem auf ihre antiproliferative Wirkung *in vitro* gegen sechs verschiedene Krebszelllinien mit Hilfe des MTT-Test untersucht, wobei lediglich gegenüber einer Zelllinie eine schwache Aktivität ( $IC_{50} < 100 \mu M$ ) beobachtet wurde (Balde *et al.*, 2010). Weiterhin wurde für die beiden Substanzen eine moderate Toxizität im Bioassay mit *Artemia salina* beschrieben, wohingegen im „Tomato Cutting Assay“ keine Phytotoxizität auftrat (Altomare *et al.*, 2000). Des Weiteren zeigte Fusapyron keine akute oder chronische Toxizität in Test mit weiblichen Charles River CD-1®-Mäusen (100 mg/kg, i.p.) (Chaeit *et al.*, 1989). Darüber hinaus zeigte Desofusapyron eine regulierende Wirkung auf das Pflanzenwachstum, wie beispielsweise die Förderung des Wachstums von

Tomatenkeimlingen. Aufgrund ihrer bemerkenswerten antimykotische Aktivität sowie ihre geringe Phyto- und Zootoxizität stellen  $\gamma$ -Pyrone deshalb interessanten Modellschubstanzen für die Entwicklung von neuen umweltverträglichen Fungiziden mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der Landwirtschaft dar (Chaeit *et al.*, 1989; Altomare *et al.*, 2000).

Equisetin wurde erstmals aus dem Schimmelpilz *Fusarium equiseti* und später aus weiteren Fusarien wie *F. heterosporum* und *F. pallidoroseum* isoliert (Burmeister *et al.*, 1974; Singh *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 1999). Dieses Toxin der Tetramsäureklasse ist ein aus *N*-Methylserin gebildeter Heterozyklus, der wiederum ein substituiertes Octalin-Gerüst mit fünf Stereozentren enthält (Burke *et al.*, 2000; Burke *et al.*, 2005). Wie andere Acyl-Tetramsäure-Derivate besitzt auch Equisetin bemerkenswerte biologische Eigenschaften, wie ausgeprägte antibiotische, phytotoxische, zytotoxische und antivirale Aktivitäten.

Equisetin ist aktiv gegen gram-positive Bakterien, inklusive Mycobakterien, jedoch nicht gegen Hefen, Pilze und gram-negative Bakterien, außer *Neisseria perflava* (Burmeister *et al.*, 1974; Vesonder *et al.*, 1979). Des Weiteren zeigten Untersuchungen zu phytotoxischen Effekten, dass Equisetin bei Konzentrationen zwischen 2.5 und 10  $\mu\text{g/ml}$  eine signifikante Reduktion der Keimrate sowie die Hemmung des Wachstums der Keimlinge von verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzen bewirkt. Zusätzlich verursacht Equisetin Nekrosen an den Wurzeln, Kotyledonen und Koleoptilen der getesteten Sämlinge. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Equisetin an der Phytopathogenität von *Fusarium*-Arten beteiligt sein könnte (Wheeler *et al.*, 1999).

Weiterhin wurde die akute Toxizität  $\text{LD}_{50}$  von Equisetin durch intraperitoneale Applikation bei Mäusen zu 63 mg/kg Körpergewicht bestimmt (Burmeister *et al.*, 1974), wobei der Wirkmechanismus seiner Toxizität auf einer spezifischen Hemmung der Anionen-Carrier für ATP, Orthophosphat und Succinat innerhalb der inneren Mitochondrienmembran beruht (König *et al.*, 1993). Darüber hinaus zeigt Equisetin eine stark inhibitorische Wirkung auf die HIV-1 Integrase. Equisetin bindet spezifisch an die HIV-Integrase, verhindert dadurch den Einbau der Provirus-DNA ins Wirts-Zellgenom und somit die Replikation des HIV-Virus (Singh *et al.*, 1998; Savarino, 2007).

Für den EtOAc-Extrakt des Pilzes *Fusarium incarnatum* (MGC-1.3) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine antibiotische Aktivität gegen den verwendeten gram-positiven Stamm nachgewiesen werden. Gegen die Testorganismen *Cladosporium curcumerinum* und *C. herbarum* wurde eine bedeutende antifungale Aktivität beobachtet. Die

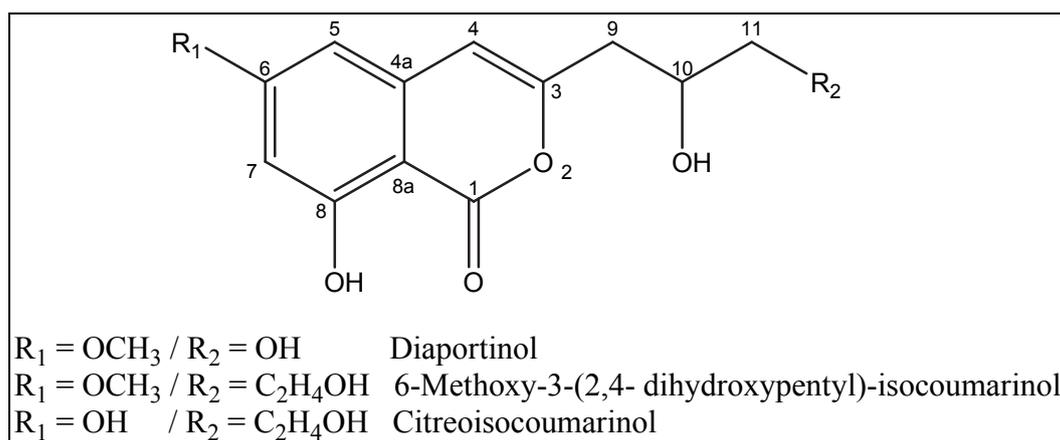
antimikrobielle Aktivität des Extraktes ist sehr wahrscheinlich auf Fusapyron und Desoxyfusapyron zurückzuführen, da sich beide Inhaltsstoffe als stark aktiv im antifungalen Test erwiesen. Ebenso konnten die durchgeführten Bioassays die starke antimikrobielle Wirkung von Equisetin und Fusapyron gegen das gram-positive Testbakterium bestätigen. Weiterhin erwies sich der EtOAc-Extrakt auch als zytotoxisch aktiv gegen Maus-Lymphom-Zellen (L-5178Y), was auf der Anwesenheit von Fusapyron oder Equisetin begründet sein könnte.

#### **4.6. Der Pilz *Neurospora terricola* (MGC-5.1) und seine Naturstoffe**

*Neurospora* wird in Genforschung sehr geschätzt. Erstens ist diese Gattung einfach zu kultivieren, zum anderen besitzt dieser Pilz einen einfachen Lebenszyklus, der besonders geeignet für genetische Studien ist. Weil seine Eigenschaften ideal für wissenschaftliche Forschung sind, gelten *Neurospora*-Arten, insbesondere *N. crassa*, als ein Modellorganismus (s. weitere Diskussionen über *Neurospora* unter 4.4.).

Sekundärstoffe aus *N. terricola* wurden zum ersten Mal von Zhang *et al.* (2009) beschrieben. Es handelte sich dabei um die neue Allenylphenylether Terricollenen A-C und die ebenso neuen Alkynylphenylether Terricolynen. *N. terricola* wurde als endolichenischer Pilz aus der chinesischen Flechte *Everniastrum cirrhatum* isoliert. Endolichenische Pilze besiedeln, analog zu den endophytischen Arten, asymptomatisch die Interzellularräume von Flechtenthalli (Zhang *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden aus dem Stamm MGC-5.1 von *Neurospora terricola*, der aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Bruguiera gymnorhiza* stammte, erstmalig die Isocoumarine Diaportinsäure, Diaportinol und der neuen Naturstoff 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol isoliert. Weiterhin wurden Dichlordiaportin, Indol-3-carbaldehyd und p-Hydroxybenzaldehyd anhand spektroskopischer Methoden im EtOAc-Extrakt identifiziert.



Der neue Naturstoff 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol stellt im Vergleich zum Diaportinol ein Dihomologes dar. Zu einem anderen bekannten Isocoumarin, Citreoisocoumarinol, zeigt die neue Verbindung ebenfalls eine weitgehende strukturelle Übereinstimmung; an C-6 besitzt sie eine Methoxygruppe anstelle der Hydroxygruppe des Citreoisocoumarinols (Lai *et al.*, 1991). Citreoisocoumarinol und andere verwandte Verbindungen stellen Heptaketide dar und entstammen somit dem Polyketid-Stoffwechsel, wobei die Carbonylgruppe in ihrer Seitenketten unterschiedliche Reduktionsgrade aufweisen (Watanabe *et al.*, 1998; Crawford *et al.*, 2008).

Diaportinsäure, Diaportinol und Dichlordiaportin wurden erstmals aus einem mit Käse assoziierten Lebensmittelpathogen, dem Pilz *Penicillium nalgiovense*, isoliert (Larsen und Breinholt, 1999). Organische Extrakte aus *P. nalgiovense*, welche mehrheitlich Diaportine enthielten, wurden mittels MTT-Zellkulturtest untersucht und zeigten eine starke zytotoxische Wirkung (Larsen *et al.*, 2002). Die biologische Aktivität der Reinsubstanzen wurde bisher nicht bestimmt (Sørensen *et al.*, 2010). Dennoch besitzen Isocoumarine bekannterweise ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten wie antifungale (Authrine *et al.*, 1996), genotoxische (Varanda *et al.*, 1997), antitumorale (Yin *et al.*, 2001), Anti-*Helicobacter pylori*-, entzündungshemmende, antitumorale (Pinchuk *et al.*, 2001), Antimalaria-, Antituberkulose- (Kongsaeree *et al.*, 2003), antimikrobielle (Devienea *et al.*, 2005), herbicide (Qadeer *et al.*, 2007), algizide (Zhang *et al.*, 2008) und zytotoxische Wirkung (Aly *et al.*, 2008).

Der Ethylacetat-Extrakt des Pilzes *N. terricola* (MGC-5.1) zeigte bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten antibiotischen und zytotoxischen Tests keine biologische Aktivität. Auf Grund der geringeren Probenmengen und den vorherigen negativen Ergebnissen wurden Diaportinsäure, Diaportinol und 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol keinen weiteren Bioassays unterzogen.

#### 4.7. Die Xylariaceae spp. und ihre Naturstoffe

Die Ascomyceten-Familie Xylariaceae ist bekannt für die große Biodiversität vieler ihrer Arten und Gattungen. Die rund 70 Gattungen umfassende Familie zeigt ihre größte Vielfalt in den Tropen, obwohl sie generell weltweit vertreten ist (Whalley, 1996; Lumbsch und Huhndorf, 2007). Vertreter der Xylariaceae sind in der Regel Saprophyten, kommen aber auch häufig als Endophyten und in einigen Fällen als Pflanzenpathogen vor (Tang *et al.*, 2009). Im Hinblick auf die Produktion von Sekundärstoffen gehören die Xylariaceae zu den am besten untersuchten filamentösen Pilzen. Sie produzieren eine beeindruckende Reihe von Naturstoffen, von denen viele sich als neuartige Strukturen erwiesen (Chen *et al.*, 1974; Steglich *et al.*, 1974; Pedersen *et al.*, 1980; Gunawan *et al.*, 1990). Die wichtigsten Substanzen aus den verschiedenen untersuchten Vertretern der Xylariaceae lassen sich in folgenden Klassen zusammenfassen: Dihydroisocoumarine und Derivate (Anderson *et al.*, 1983; Whalley und Edwards, 1998), Bernsteinsäure und Derivate (Anderson *et al.*, 1985; Adeboya *et al.*, 1996; Whalley und Edwards, 1998), Butyrolactone (Edwards und Whalley, 1975; Anderson *et al.*, 1982; Whalley und Edwards, 1998), Cytochalasine (Edwards *et al.*, 1989a; Whalley und Edwards, 1998), Azaphilone (Steglich *et al.*, 1974), Sesquiterpenalkohole (Punctaporonine) (Anderson *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1989b; Whalley und Edwards, 1998), Griseofulvin und Derivate (Whalley und Edwards, 1995 und 1998), Naphthalin-Derivate (Whalley und Edwards, 1995 und 1998) sowie langkettige Fettsäuren (Adeboya *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1991; Whalley und Edwards, 1998). Die zahlreichen Berichte über neue biologisch aktiven Verbindungen mit Potenzial für die Anwendung in der Veterinär- und Humanmedizin oder als Pflanzenschutzmittel, sowie die große Zahl von neuen Taxa, die bisher noch unerforscht bleiben, machen diese Familie von Ascomyceten zu einem sogenannten „Hotspot“ der molekularen Vielfalt. Darüber hinaus sind die Sekundärstoffe sehr wichtig für die taxonomische Einordnung der Xylariaceae (Whalley und Edwards, 1995; Whalley, 1996; Stadler und Hellwig, 2005).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei endophytische Pilze der Familie Xylariaceae chemisch und biologisch untersucht. Der Pilz *Xylaria* sp. (Stamm MGC-12.3) wurde aus der Rinde der chinesischen Mangrovenpflanze *Aegiceras corniculatum* isoliert, während der Stamm BT-III.1 von *Hypoxylon fragiforme* aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* aus Deutschland erhalten wurde.

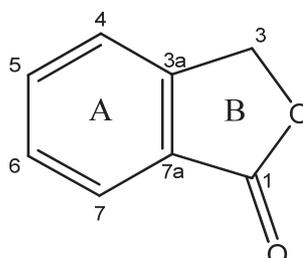
#### 4.7.1. Der Pilz *Xylaria* sp. (MGC-12.3) und seine Naturstoffe

*Xylaria* ist die erste beschriebene Gattung der Xylariaceae. Sie bilden in der Regel aufrechte längliche schwarze holzige Stromata (Sammelfruchtkörper) mit in dem oberen Teil eingebettete Perithezien. Ihre geographische Verteilung ist wahrscheinlich weltweit und reicht von tropischen Wäldern bis zur arktischen und alpinen Tundra (Rogers, 1979; Petrini, 1984). Die *Xylaria*-Arten leben meist saprobiontisch an abgestorbenen Holzteilen, manchmal auch schwach bis stark parasitär an Gehölzen (Lee *et al.*, 2000). *Xylaria*-Arten können auch endophytisch in gesunden pflanzlichen Geweben leben und eine Vielzahl von Wirtspflanzen besiedeln, darunter Araceae, Bromeliaceae, Coniferen, Ericaceae, Orchidaceae, Poaceae, Palmae, Fagaceae, Betulaceae oder Bryophyta, Pteridophyta und Flechten (Brunner und Petrini, 1992). Die endophytische Existenz von *Xylaria* wird manchmal als opportunistisch angesehen, d.h. seine Anwesenheit in lebenden Pflanzen gibt dem Pilz einen Vorteil gegenüber anderen Saprotrophen, nachdem der Wirt gestorben ist (Whalley, 1993 und 1996; Petrini *et al.*, 1995; Bayman *et al.*, 1997). Doch immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass einige Xylariaceae nur als Endophyten existieren können (Rogers, 2000). Die Produktion von aktiven Naturstoffen, die toxisch gegen Herbivore oder Pflanzenpathogene sind, ist ein allgemeines Merkmal vieler endophytischen Mutualismen. *In vitro*-Untersuchungen bestätigen *Xylaria*-Arten als Produzenten von verschiedenen aktiven Sekundärstoffen, wie Multiplolide, Xyloketale, Depudecin, Phaseolinon, Phomenon, Epoxycytochalasine, Xylarenale und Griseofulvine. Diese Produktion könnte auch in den Geweben des lebenden Pflanzenwirts stattfinden. Dennoch wurde bislang keine offensichtlichen Nutzen aus der Association mit Xylariaceae für die Wirtspflanzen dokumentiert (Davis *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005).

Aus dem *Xylaria*-Stamm MGC-12.3 wurden im Rahmen dieser Arbeit die Naturstoffe 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure, Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat, Cytochalasin E und 5-Carboxymellein isoliert.

Mit dem Isobenzofuran-Derivat 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure konnte ein neuer Naturstoff der Klasse der Phthalide isoliert werden. Das chemische Grundgerüst der Phthalide stellt ein 1(3H)-Isobenzofuranon dar, welches aus einem mit einem  $\gamma$ -Lacton (Ring B) zwischen den Positionen C-1 und C-3 fusionierten Benzolring (Ring A) besteht. Die Strukturen der Derivate besitzen entweder das

substituierte Grundgerüst mit einer oder mehreren Gruppen an verschiedenen Positionen oder enthalten eine reduzierte Form mit einer, zwei oder gar keiner Doppelbindung(en) im Benzolring und verschiedenen Substituenten an unterschiedlichen Positionen. Dennoch gehören etwa zwei Drittel der natürlich vorkommenden Phthalide zu den 3-substituierten Phthaliden (Lin *et al.*, 2005).



In der Literatur finden sich nur wenige Angaben zur Biosynthese der Phthalide; es ist aber anzunehmen, dass die Phthalide aus Acetat-Einheiten durch Kopf-Schwanz-Kondensation über den Polyketid-Weg entstehen (Beck und Chou, 2007).

Mehr als 180 natürlich vorkommende Phthalid-Derivate wurden bisher identifiziert, die meisten davon aus Pflanzen. Dennoch kommt diese Klasse von Naturstoffen auch in Lebermoosen, Pilzen und Bakterien vor (Lin *et al.*, 2005). Die meisten der Phthalide zeigen sich biologisch aktiv mit einer Vielzahl von pharmakologischen Aktivitäten, darunter antibiotische und antileukemische (Fuska *et al.*, 1979), anti-tumorale (Mullady *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2010), antifungale (Höller *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2008), zytotoxische (Prachyawarakorn *et al.*, 2008), antioxidative (Strobel, *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2010) und entzündungshemmende (Yoshikawa *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Dissertation wurde für das neue Phthalid 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure eine starke zytotoxische Wirkung gegenüber den Maus-Lymphom-Zellen (L-5178Y) mit einem  $EC_{50}$ -Werte von 1.0  $\mu\text{g/ml}$  festgestellt.

Eine Untersuchung zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Phthaliden zeigte, dass die antikonvulsive Eigenschaft von 3-substituierten Phthaliden mit einem aromatischen Ring A von verschiedenen Faktoren abhängt, darunter der Konfiguration des 3-Substituenten, der Lipophilie und der Elektronendichte an der Position 6 des Benzolringes. Demnach wiesen Verbindungen mit einer *R*-Konfiguration an Position 3, sowie diejenigen mit größerer Lipophilie höhere antikonvulsive Aktivität auf. Darüber hinaus schienen elektronenziehende Substituenten an Position 6 die antikonvulsive Eigenschaft der Phthalide ebenfalls zu erhöhen, wobei kritisch anzumerken ist, dass in dieser Untersuchung nur eine begrenzte Anzahl von Phthaliden analysiert wurde (Guo, 1995; Lin, 2005).

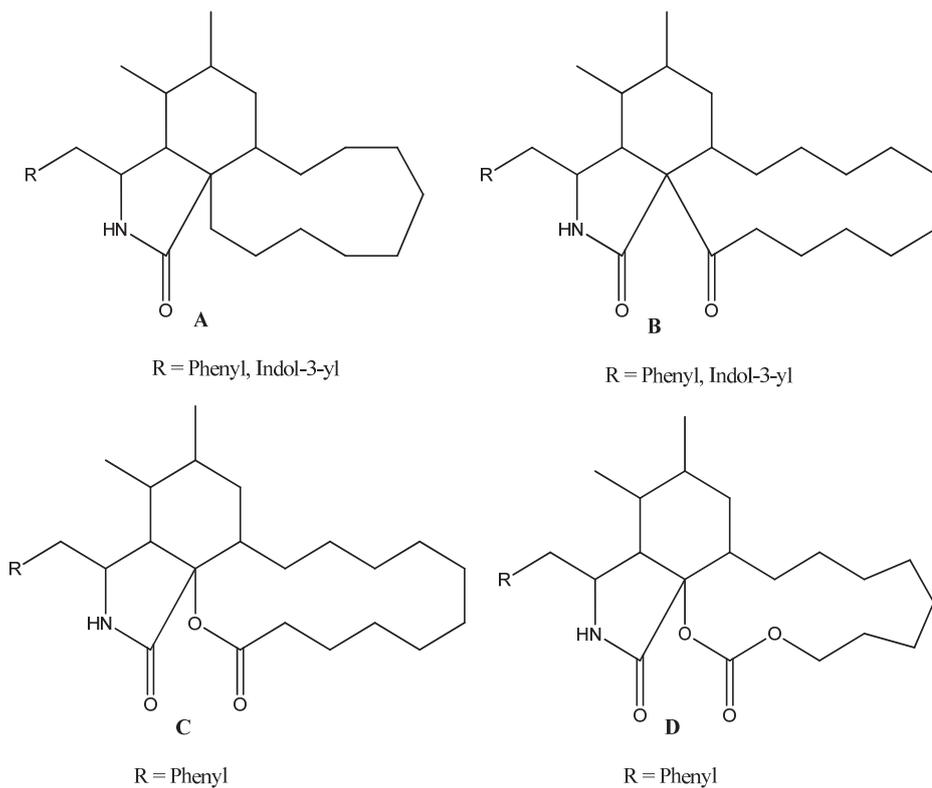
Darüber hinaus haben Kobayashi und Mitarbeiter die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von zehn natürlich vorkommenden Phthaliden auf Kulturen von glatten Muskelzellen untersucht (Kimura *et al.* 1989; Kobayashi *et al.* 1992, 1993). Die Substanzen, die an Position 3 mit einer Hydroxygruppe oder einer hydroxylierte Seitenkette substituiert waren, zeigten keine anti-proliferativen Eigenschaften. Eine 3-Alkylseitenkette zeigte sich dagegen essentiell für die anti-proliferative Wirkung auf die Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen. Darüber hinaus scheinen eine 6,7-Disubstitution sowie ein höherer Sättigungsgrad in Ring A sich positiv auf die anti-proliferative Aktivität auszuwirken (Kimura *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1992 und 1993; Lin, 2005).

(*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat wurde erstmals als Naturstoff aus dem Pilz *Poronia punctata* beschrieben, der zu einer mit *Xylaria* eng verwandten Gattung gehört (Anderson *et al.*, 1988). Später wurde dieser Ester zusammen mit Cytochalasinen und anderen Mykotoxinen aus Stämmen von *Xylaria* isoliert (Abate *et al.*, 1997; Isaka *et al.*, 2000). Allerdings war die Substanz vorher bereits als Syntheseprodukt bekannt (Kajimoto *et al.*, 1973). Die Verbindung wurde auf biologische Aktivitäten getestet und zeigte dabei eine moderate Antimalaria-Aktivität *in vitro* (EC<sub>50</sub>-Wert 19 µg/ml), jedoch keine Zytotoxizität in Tests mit humanen epidermoiden Karzinom- (KB) und humanen Brustkrebs- (BC-1) Zelllinien (Isaka *et al.*, 2000). Dagegen besaß (*E*)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat gegenüber den L-5178Y-Zelllinien eine potente zytotoxische Aktivität mit einem EC<sub>50</sub>-Werte von 0.5 µg/ml sowie eine bedeutende Hemmwirkung gegen einige humane tumorrelevante Proteinkinasen, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde.

Die Cytochalasine sind biosynthetisch eng miteinander verwandte makrozyklische Polyketide aus Pilzen. Sie besitzen eine hochsubstituierte hydrierte Isoindolon-Einheit, die verknüpft ist mit einem 11- bis 14-gliedrigen Makrozyklus, wobei sich vier Grundstrukturtypen A–D unterscheiden lassen (siehe S. 205). Der große Ring kann carbozyklisch oder heterozyklisch (Lacton oder Kohlensäurediester) sein. In Fütterungsexperimenten wurden Acetat, Propionat, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan als Biosynthesestufen der Cytochalasine nachgewiesen (Binder und Tamm, 1973; Williams und Stocking, 2003).

Seit ihrer ersten Isolierung wurde diese Naturstoffklasse zum Gegenstand intensiver Forschung, die zur Entdeckung vieler neuer Eigenschaften sowie einen großen Anzahl von Cytochalin-Derivaten geführt hat. Alle Vertreter dieser Klasse zeigen eine mehr oder weniger ausgeprägte spezifisch zytostatische Wirkung. Zu den wichtigsten biologischen

Wirkungen der Cytochalasine gehören die Hemmung der Spaltung des Zytoplasmas, reversible Hemmung der Zellbewegung, Induktion der Ausstoßung der Zellkerne (Carter, 1967; Krishan, 1971), Hemmung von Phagozytose (Allison *et al.*, 1971; Malawista *et al.*, 1971; DeFife *et al.*, 1999), Hemmung der Aggregation der Blutplättchen und des Abbaus von Blutgerinnseln (Haslam *et al.*, 1975; Carroll *et al.*, 1981), Hemmung des Glukosetransports (Bloch, 1973), Hemmung der Schilddrüsensekretion (Williams und Wolff, 1971); Hemmung der Ausschüttung von Wachstumshormonen (Schofield, 1971) und die Hemmung der HIV-1 Protease (Lingham *et al.*, 1992).



Cytochalasin E wurde erstmalig als Produkt von *Rosellinia necatrix* beschrieben (Aldridge *et al.*, 1972) und wurde somit zum ersten Vertreter des Grundtypus D der Cytochalasine (Binder und Tamm, 1973). Cytochalasin E zeigte sich toxisch bei Ratten mit einem LD<sub>50</sub>-Wert von 2.6 mg/kg (i.p.) und führte zu Kreislaufkollaps aufgrund massiven extravaskulären Ergusses des Plasmas (Büchi *et al.*, 1973).

Darüber hinaus erwies sich Cytochalasin E als ein wirksamer und selektiver Hemmstoff der Zellproliferation in Tests mit bovinen Kapillarendothel-Zellen (BCE - bovine capillary endothelial). Mittels Phalloidin-Färbung wurde gezeigt, dass die Störung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin E nur bei relativ hohen Konzentrationen auftrat. Die Untersuchung zeigte ebenfalls, dass bei niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes eine Hemmung der BCE-Zellproliferation ohne Zerstörung des Aktinzytoskeletts stattfindet. *In*

*in vivo* hemmte dieses Mykotoxin die durch basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) induzierte Angiogenese um 40-50% im Maus-Hornhaut-Assay, und hemmte das Wachstum von Lewis-Lungentumoren um etwa 72%. Cytochalasin E zeigte sich somit als ein potenter antiangiogener Wirkstoff mit vielversprechendem Potential zur Behandlung von Krebs und anderen Arten von pathologischer Angiogenese (Udagawa *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für Cytochalasin E die starke Zytotoxizität der Cytochalasine bestätigt werden. In Tests mit den Maus-Lymphom-Zellen (L-5178Y) wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von  $<0.1 \mu\text{g/ml}$  ermittelt.

5-Carboxymellein ist ein typisches Isocoumarin, das bereits aus verschiedenen Ascomyceten isoliert wurde, beispielsweise *Phomopsis oblonga* aus der Familie Diaporthaceae (Claydon *et al.*, 1985), *Valsa ceratosperma* aus der Familie Valsaceae (Okuno *et al.*, 1986), *Tubercularia* sp. aus der Familie Nectriaceae (Wang *et al.*, 2000), sowie *Hypoxylon illitum* (Anderson *et al.*, 1983), *Nummulariella marginata* (Whalley und Edwards, 1985) und *Halorosellinia oceanica* (Chinworrungsee *et al.*, 2001) aus der Familie Xylariaceae. In Studien zur Bioaktivität von 5-Carboxymellein wurden neben einer starken Phytotoxizität (Okuno *et al.*, 1986) eine moderate zytotoxische Wirkung gegen KB- und BC-1-Zelllinien, sowie eine moderate Antimalaria-Aktivität gegen einen multiresistenten Stamm von *P. falciparum* festgestellt (Chinworrungsee *et al.*, 2001).

#### 4.7.2. Der Pilz *Hypoxylon fragiforme* (BT-III.1) und seine Naturstoffe

Mit derzeit mindestens 130 anerkannten Arten und Varietäten ist *Hypoxylon* eine der größten Gattungen innerhalb der Xylariaceae. Die Gattung ist weltweit verbreitet, obwohl sie die höchste Diversität in den Tropen und Subtropen zeigt. Die meisten Arten wurden, wahrscheinlich wegen ihrer asymptomatischen Kolonisierung der lebenden Wirtsgewebe, als Saprobien aus abgestorbenem Holz beschrieben. Allerdings berichteten verschiedene Autoren über viele Arten, die als Endophyten lebende Pflanzen bewohnen. *H. fragiforme* ist in der Nordhemisphäre weit verbreitet, lebt als Endophyt in einer großen Diversität von Wirtspflanzen, bildet aber Fruchtkörper in erster Linie auf *Fagus* spp. (Sánchez-Ballesteros *et al.*, 2000; Hellwig *et al.*, 2005).

Aus dem Stamm BT-III.1 wurden die für *H. fragiforme* typischen Naturstoffe Mitorubrinol, Mitorubrinsäure, Orsellinsäure und Cytochalasin H (Stadler *et al.*, 2006), sowie die biogenetisch verwandten Scytalon, 4-Hydroxyscytalon und das Antibiotikum RF-3192-C (Bode and Zeeck, 2000), isoliert. Darüber hinaus wurde mit 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on ein neuer Naturstoff isoliert.

Mitorubrinol wurde zusammen mit Mitorubrin erstmalig als Pigment eines Stammes von *Penicillium rubrum* beschrieben (Büchi *et al.*, 1965). Ein dritter Vertreter dieser Substanzengruppe, Mitorubrinsäure, wurde später aus einer Kultur von *P. funiculosum* isoliert, wobei Mitorubrin und Mitorubrinol ebenfalls vorhanden waren (Locci *et al.*, 1967). Das gemeinsame natürliche Vorkommen der drei Azaphilon-Derivate weist offensichtlich auf einen gemeinsamen Biosyntheseweg mit unterschiedlichen Oxidationsgraden hin (Chong *et al.*, 1971). Azaphilone sind eine strukturell vielfältige Klasse pilzlicher Pigmente, die eine hoch oxidierte bicyclische Pyron-Chinon-Kernstruktur sowie ein chirales quartäres Zentrum besitzen (Osmanova *et al.*, 2010).

Azaphilon-Derivaten zeigen ein breites Spektrum an interessanten biologischen Aktivitäten, wie antimikrobielle, antimykotische, antivirale, antioxidative, zytotoxische, nematizide und entzündungshemmende Wirkungen. Diese starken, aber meist unselektiven biologischen Aktivitäten der Azaphilone könnten mit der Produktion von vinylogem  $\gamma$ -Pyridonen in Verbindung stehen (Osmanova *et al.*, 2010). Für Mitorubrinol und Mitorubrinsäure werden antifungale, antimikrobielle, und nematizide Wirkungen sowie hemmende Aktivität auf Stickstoffmonoxid-Produktion in RAW 264.7-Zellenlinien beschrieben (Stadler *et al.*, 2006; Quang *et al.*, 2006; Osmanova *et al.*, 2010). Ferner erwies sich Mitorubrinsäure als Trypsinhemmer ( $IC_{50}$  41.05  $\mu\text{mol/l}$ ) sowie als eine morphogenetische Substanz, wobei sie die Bildung von Chlamydosporen bei *Cochliobolus lunatus* induziert (Lesova *et al.*, 2000; Natsume *et al.*, 1985). Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit für Mitorubrinsäure ein starker inhibitorischer Effekt gegenüber den Proteinkinasen IGF1-R, SRC, VEGF-R2 und SAK festgestellt.

Orsellinsäure, ein möglich biogenetischer Präkursor der Mitorubrine (Büchi *et al.*, 1965; Zhu und Porco, 2006), gehört zu den ersten Sekundärmetaboliten, bei dem die Kopf-Schwanz-Kondensation von Acetat-Einheiten nach der „Acetattheorie“ gezeigt wurde (Mosbach, 1960). Von allen polyketidartigen Phenolen ist Orsellinsäure biogenetisch eine der einfachsten (Gaucher und Shepherd, 1968). Orsellinsäure weist unter anderem Pflanzenwachstum hemmende (Nishitoba *et al.*, 1987), antifungale (Woodward *et al.*, 1983),

antibakterielle (Gomes *et al.*, 2003) und , antioxidative Eigenschaften (Lopes *et al.*, 2008) auf, und hemmt zudem die neuronale Apoptose (Ryan *et al.*, 2007) .

Cytochalasin H (Kodo-Cytochalasin-1, Paspalin P1) ist ein Stoffwechselprodukt von *Phomopsis paspali*, ein Phytopathogen aus der indischen Kodohirse *Paspalum scrobiculatum* (Patwardhan *et al.*, 1974). Dieser Vertreter der Cytochalasine gehört dem Grundtypus A an (s. Abb.), bei dem an die Stelle des 13-gliedrigen Lactonringes von Cytochalasin E (s. Diskussion in 5.7.1) ein 11-gliedriger Carbocyclus vorhanden ist. Cytochalasin H zeigte mit einem LD<sub>50</sub>-Wert von 12.5 mg/kg bei Eintagsküken eine hohe Toxizität (Wells *et al.*, 1976) sowie eine starke Zytotoxizität mit IC<sub>50</sub>-Werten < 1.25 µg/ml<sup>-1</sup> gegen die aus humanen oralen Epidermoidkarzinom entstammten KB- und KBv200-Zellen (Tao *et al.*, 2008). In Tests mit Tabak, Weizen und Bohnen wurden außerdem signifikante wachstumshemmende oder phytotoxische Wirkungen der Substanz gezeigt (Wells *et al.*, 1976). Darüber hinaus wies eine Studie der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Cytochalasins H darauf hin, dass die Hydroxygruppen an Position C-18, sowie in geringerem Umfang der NH-Gruppe an N-2, notwendig sind für die hemmende Wirkung des Pflanzenwachstums im Weizen-Koleoptil-Test (Cox *et al.*, 1983). Weiterhin weisen die in der Literatur publizierten pharmakologischen Tests der Substanz auf antibakterielle, antifungale, nematozide und antitumorale Aktivitäten hin (Bottalico *et al.*, 1990). Die starke Zytotoxizität von Cytochalasin H konnten im Rahmen dieser Arbeit auch bestätigt werden. Die Substanz zeigte im Test mit den L-5178Y-Zelllinien 99.3%ige Hemmungswirkung auf die Zellproliferation.

Stadler *et al.* (2006) vermuten, dass sowohl die Cytochalasine als auch die Azaphilone an unspezifischen chemischen Abwehrreaktionen im Fruchtkörper der Hypoxyloideae beteiligt sein könnten, da sie nicht-selektive biologische Wirkmechanismen besitzen, viele dieser Verbindungen in außerordentlich großen Mengen gebildet werden, und da sich diese sich in den peripheren Teilen der Stomata befinden, die am ehesten potentiellen Fraßfeinden ausgesetzt sind. .

Scytalon ist ein Zwischenprodukt aus der pilzlichen Biosynthese von Melanin, einem wichtigen schwarzen Pigment von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (Bell und Wheeler, 1986). Für die Pilze stellt Melanin sowohl einen Protektiv- wie einen Pathogenitäts-Faktor dar. Die stark melanierte Zellwand schützt das Pathogen sowohl vor den Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus als auch vor DNA-schädigendem UV-Licht. Die Bildung von melanierten Appressorien ist von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Penetration des Wirtsgewebes (Wheeler und Stipanovic, 1985). Scytalon ist

ebenso eine Vorstufe im Biosyntheseweg des mit RF-3192C (siehe folgender Absatz) strukturell verwandten Bisnaphthalin-Derivates Sphaerolon (Bode und Zeeck, 2000). Dieses Dihydronaphthalin-Derivat wurde erstmals aus *Scytalidium* spp. beschrieben (Findlay und Kwan, 1973a und 1973b) und später aus verschiedenen pilzlichen Quellen wie *Ceratocystis minor*, *Phialophora lagerbergii*, *Penicillium carneolutescens* und *Verticillium dahliae* isoliert (Bell und Wheeler, 1986). 4-Hydroxyscytalon wurde erstmalig aus einem Stamm von *Pyricularia oryzae* isoliert (Iwasaki *et al.*, 1973). Im Gegensatz zu Scytalon stellt 4-Hydroxyscytalon keine Vorstufe der Melanin-Biosynthese dar, sondern entsteht durch biologische Reduktion von Scytalon (Bell *et al.*, 1976).

Die Bisnaphthalin-Derivate RF-3192 A-C wurden erstmals von Yoshida *et al.* (1994) aus dem Stamm *Chaetomella circinoseta* RF-3192 isoliert. Die drei patentgeschützten Substanzen werden als Aldose-Reduktase-Inhibitoren beschrieben, wobei RF-3192C die schwächste inhibitorische Wirkung (IC<sub>50</sub> 130 ng/ml) zeigte. RF-3192C wurde zuvor in unserem Arbeitskreis aus Kulturen von *Aspergillus niger* (Rusman, 2006) und *Nodulisporium* sp. (Riebe, 2009) isoliert. Die Verbindung wies eine starke antiproliferative Aktivität gegen L-5178Y-Zelllinien sowie hemmenden Eigenschaften gegenüber verschiedenen Proteinkinasen auf:

Das als Naturstoff bisher unbekannte 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on ist ein mit Isochracein (Isochracin) strukturell verwandtes Phthalid, das bereits als Syntheseprodukt beschrieben wurde (Clayden *et al.*, 2005). Die beiden Verbindungen unterscheiden sich lediglich an die Position 7, wo Isochracein eine Hydroxygruppe und das neue Phthalid-Derivat eine Methoxygruppe trägt. Isochracein ist ein Sekundärstoff aus *H. fragiforme*, u. a. *Hypoxylon* spp., der eine chemotaxonomische Relevanz aufweist (Anderson und Edwards, 1983). Dagegen wird Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zum ersten Mal als pilzlicher Sekundärstoff beschrieben. Wie im Fall des aus *Xylaria* sp. MGC-12.3 isolierten Phthalids gehört auch Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on zu den 3-substituierten Phthaliden (s. Diskussion unter 5.7.1.). Die Substanz zeigte eine starke zytotoxische Aktivität gegenüber L-5178Y-Zelllinien (EC<sub>50</sub> 7.8 µg/ml). Dennoch beruht ihre diese offensichtlich nicht auf einer Interaktion mit Proteinkinasen, da in den entsprechenden Assays keine signifikanten inhibitorischen Wirkungen gegenüber den 24 verschiedenen humanen tumorrelevanten Proteinkinasen festgestellt wurde.

#### 4.8. Der Pilz *Eurotium rubrum* (BT-1) und seine Naturstoffe

Die Gattung *Eurotium* enthält mehrere Arten, die hervorragend bei niedriger Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) wachsen können. Sie treten daher relativ häufig als Kontaminanten in Lebensmitteln und Futtermitteln mit hohen Konzentrationen von NaCl oder Zucker auf (Butinar *et al.*, 2005). Dennoch gibt es keine systematischen ökologischen Untersuchungen über die Biodiversität von Vertretern dieser Gattung in natürlichen Habitaten mit niedriger Wasseraktivität. Gelegentlich wurden unterschiedliche *Eurotium* spp. aus mäßig salinen Böden und Gewässern isoliert. Neuerdings wurden bei Untersuchungen mykologischer Diversität in hypersalinen Gewässern *Eurotium* spp., darunter *E. rubrum*, aus dem Toten Meer sowie aus einem aktiven slowenischen Solarteich mit einem hohen Salzgehalt isoliert (Kis-Papo *et al.*, 2001; Butinar *et al.*, 2005). *E. rubrum* (anamorphe Form: *Aspergillus rubrobrunneus*) ist ein weit verbreiteter xerophiler Pilz, der etwas häufiger in wärmeren Regionen vorkommt. Er besiedelt eine Vielzahl  $a_w$ -wert-reduzierter Lebensmittel wie getrocknete Pflaumen, Kokosnüsse und Pfannkuchensirup, sowie verschiedene Getreide, insbesondere Weizen, Mais und Reis (Pitt und Hocking, 2009).

Mehrere Veröffentlichungen belegen, dass *Eurotium*-Arten eine Reihe an Mykotoxinen produzieren, wobei sie dennoch eine bisher sicherlich unvollständig erforschte Quelle biologisch aktiver Substanzen darstellen (Pitt und Hocking, 2009). Chemische Untersuchungen über einen mit marinen Algen assoziierten *E. rubrum* zeigten, dass dieser Stamm drei verschiedene Klassen von Sekundärstoffen produzierte, nämlich prenylierte Hydrochinone (wie Flavoglaucin), Diketopiperazin-Indolalkaloide (wie Neoechinulin A) und aromatische Polyketide (wie Physcion) (Davies-Coleman und Beukes, 2004). Aus einem endophytischen Stamm aus der Mangrovenpflanze *Hibiscus tiliaceus* wurden vier neue und sieben bekannte Benzaldehyd-Derivate isoliert, von denen die neue Verbindung Eurotirumin ein neuartiges Kohlenstoffgerüst mit einem Cyclopentabenzopyran-Ringsystem aufwies (Li *et al.*, 2008a). Aus demselben Pilz wurden außerdem neben acht bekannten Diketopiperazinen die neuen Vertreter Dehydrovariecolorin L und Dehydroechinulin, sowie das neue spirozyklische Diketopiperazinalkaloid 7-O-Mmethylvariecoloritid A, zusammen mit Variecoloritid A-C isoliert und identifiziert (Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Lebermoos *Bazzania trilobata* isolierten *E. rubrum* die Naturstoffe Cochliodinol und Chaetomin erhalten.

Cochliodinol war erstmals 1968 aus *Chaetomium cochliodes* und *C. globosum*

Stämme isoliert worden (Brewer *et al.*, 1968). Die chemische Struktur dieses Bis(indolyl)chinons wurde dennoch erst später von derselben Arbeitsgruppe aufgeklärt (Jerram *et al.*, 1975). Untersuchungen über den Biosyntheseweg von Cochliodinol mittels Fütterungsversuchen mit <sup>13</sup>C- und <sup>14</sup>C-markierten Vorstufen bestätigten die Vermutung, dass die Substanz aus der Aminosäure Tryptophan und einer von Mevalonsäure abgeleiteten Isopentenyleinheit gebildet wird, wobei zugleich gezeigt wurde, dass der Benzochinonring aus den Seitenketten der Tryptophanmoleküle gebildet wird (Taylor und Walter, 1978).

Für Cochliodinol werden antibiotische Aktivitäten beschrieben, unter anderem antibakterielle gegen das humanpathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, fungizide gegen *Botrytis allii* und *Fusarium moniliforme* und fungistatische gegen *F. oxysporum* (Brewer *et al.*, 1970; Meiler und Taylor, 1971). Ferner wirkt die Substanz zytotoxisch auf HeLa-Zellen mit einer Dosis von 10 µg/ml (Brewer *et al.*, 1975). Im Zytotoxizitätstest, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wies Cochliodinol eine 98.8%ige Hemmwirkung des Wachstums der L-5178Y-Zelllinien sowie darüber hinaus eine inhibitorische Wirkung gegenüber Proteinkinasen auf.

Waksman und Bugie gelang es im Jahr 1944 einen Stamm von *Chaetomium cochliodes* zu isolieren, der eine antibakterielle Substanz produzierte, welche Chaetomin (auch Chetomin) genannt wurde. Geiger *et al.* (1944) untersuchten später die isolierte Verbindung chemisch und biologisch, aber die endgültige Strukturaufklärung gelang erst 30 Jahre später (Safe und Taylor, 1972). Chaetomin, ein Epipolythiodioxopiperazin (ETP), zeigt eine starke antibakterielle Aktivität und hemmt spezifisch die virale Ribonukleinsäure-Synthese in einigen Zelllinien (Safe und Taylor, 1972). Epipolythiodioxopiperazine sind toxische Sekundärstoffe, die ausschließlich von Pilzen produziert werden. Die Toxizität der ETPs beruht auf dem Vorhandensein von Disulfidbrücken, die Proteine durch Reaktion mit Thiolgruppen inaktivieren und reaktive Sauerstoffverbindungen durch Redox-Reaktionen produzieren können (Gardiner *et al.*, 2005).

Weiterhin zeigt Chaetomin eine stark immunsuppressive Aktivität gegenüber Milzlymphozyten der Maus nach Gabe von Con A (T-Zellen) und LPS (B-Zellen) (Fujimoto *et al.*, 2004). Ferner agiert Chaetomin als Antagonist des Chemokinezeptors CCR2 (Herath *et al.*, 2005). Die Chemokine MCP-1 sowie CCL2 und deren Rezeptor CCR2 scheinen Entzündungen in der Lunge und einigen anderen Organen zu regulieren. Der MCP-1/CCR2 Komplex wird auch mit einer Reihe von anderen Krankheitstargets wie Autoimmunerkrankungen, darunter rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose und

Infektionskrankheiten, in Verbindung gebracht (Herath *et al.*, 2005). In einer Konzentration von 10 µg/ml bewirkte Chaetomin eine komplette Hemmung der Testzellen. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Chaetomin im Proteinkinaseassay eine starke inhibitorische Wirkung. So wurden beispielsweise für die Proteinkinasen B-RAF-VE, IGF1-R, SRC, VEGF-R2 und MET Hemmungen zwischen 85 und 96% beobachtet (siehe Tab. 46).

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat eine aktuelle und wichtige Fragestellung der Wirkstoffforschung zum Gegenstand: Mit den endophytischen Pilzen wurde eine bisher nur unvollständig erschlossene Quelle neuer biologisch aktiver Substanzen näher untersucht. Die Vorteile der Gewinnung neuer Wirkstoffe aus endophytischen Mikroorganismen bestehen gegenüber Makroorganismen vor allem darin, dass die Gewinnung nahezu beliebiger Substanzmengen durch Fermentierung ohne Belastung natürlicher Ressourcen möglich ist und somit das Problem des Substanznachschiebs, das die Entwicklung von Naturstoffen zu Arzneistoffen bereits in vielen Fällen stark behindert hat, prinzipiell einfacher lösbar ist. Dieser Forschungszweig wird in Zukunft einen signifikanten Beitrag bei der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von menschlichen Krankheiten oder zur natürlichen Entgegnung von Schädlingen in der Landwirtschaft leisten, was von erheblicher ökologischer und gesellschaftlicher Relevanz sein wird. Somit stellen endophytische Pilze bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe und anderer biologisch aktiver Substanzen besonders wertvolle Ressourcen mit wachsender Bedeutung dar. Aus diesen Gründen ist eine Intensivierung der Erforschung von Sekundärstoffen aus Endophyten besonders aussichtsreich und bildete demzufolge den Schwerpunkt dieser Dissertation.

Der Sammlung von Proben aus terrestrischen Habitaten (Pflanzen und Moosen) sowie aus chinesischen Mangrovenpflanzen folgte eine Isolierung der endophytischen Pilze aus den Wirtsorganismen. Auf Basis der Biostoffverordnung und den Regeln der guten mikrobiologischen Praxis wurde dann die eindeutige Identität des Stammes festgestellt. Das nachfolgende Primärscreening diente der Ermittlung biologisch bzw. chemisch relevanter Extrakte. Das biologische Screening wurde dabei vorwiegend auf Basis des Agarplattendiffusionstests zur Ermittlung antimikrobieller und antifungaler Aktivitäten sowie des „brine shrimp assay“ zur Ermittlung zytotoxischer Wirkungen durchgeführt. Insgesamt wurden biologische sowie chemisch analytisch aussichtsreich erscheinende Extrakte aus neun Pilzstämmen zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Nächster Schritt war dann die Isolierung biologisch aktiver Verbindungen. Die Isolierung erfolgt mittels verschiedener chromatographischer Methoden. Unter Einsatz moderner spektroskopischer Verfahren erfolgte dann die Strukturaufklärung der isolierten Naturstoffe, insbesondere mittels HPLC-UV/VIS- und LC/MS-Spektren, Abgleich mit kommerziell erhältlichen Naturstoffdatenbanken, Ion Trap-LC/MS (ESI und APCI), sowie eindimensionale ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -

NMR, DEPT) und zweidimensionale (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY) NMR-Experimente. Durch Fraktionierung der Extrakte und anschließende Isolierungsschritte wurden insgesamt 33 Verbindungen gewonnen und identifiziert, von denen drei neue Sekundärstoffe darstellen. Abschließend fand die biologische bzw. pharmakologische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen statt, vor allem mittels Untersuchungen ihres hemmenden Potentials gegenüber der Tumorzelllinie L-5178Y (Lymphomzellen der Maus) und Proteinkinasen.

Aus dem Pilz *Pleurophoma cava* SL-5 wurde das Chroman-4-on Derivat Aposphaerin A isoliert. Die aus dem EtOAc-Extrakt isolierte Substanz zeigte keine deutliche zytotoxische Wirkung gegenüber der Tumorzelllinie L-5178Y. Dagegen zeigte die Verbindung eine ausgeprägte Hemmwirkung auf 4 von 24 der getesteten Proteinkinasen.

Aus dem Ethylacetat-Extrakt des Pilzes *Penicillium chrysogenum* HN-B2 konnten die bekannten Mykotoxine Terrestrinsäure, Viridicatol, Roquefortin C und Viridicatin isoliert werden. Gegenüber der Tumorzelllinie L-5178Y zeigten die isolierten Verbindungen Terrestrinsäure, Viridicatin und Viridicatol keine signifikante Wachstumshemmung. Lediglich Roquefortin C führte in dem genannten Bioassay zu einer moderaten Hemmung der L-5178Y-Zellen. Dennoch wies diese Substanz keine nennenswerte Hemmungswirkung gegen die getesteten Proteinkinasen auf.

Aus dem Pilz *Botryosphaeria rhodina* BT-3 wurden die zwei miteinander verwandten Benzofuran-Derivate Griseofulvin und Dechlorgriseofulvin sowie das Peptid Cycloaspeptid A und das Benzodiazepin-Derivat Sclerotigenin erhalten. Auf Grund der geringen Probemenge wurde Griseofulvin, Dechlorgriseofulvin und Cycloaspeptid A nicht den Bioassays unterzogen. Sclerotigenin zeigte gegenüber den murinen Lymphomazellen eine sehr starke Wachstumshemmung, aber keine deutliche Hemmwirkung auf die Proteinkinasen.

Die bekannte Verbindung Kojisäure wurde aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Neurospora discreta* NE-8 isoliert. Der gewonnene Metabolit wies im Test eine schwache antibakterielle Wirkung gegenüber dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* auf.

Die Mykotoxine Equisetin, Fusapyron und Desoxyfusapyron wurden aus *Fusarium incarnatum* MGC-1.3 erhalten. In den Bioassays zeigten sowohl Fusapyron wie Desoxyfusapyron eine starke Aktivität im antifungalen Test sowie eine bedeutende antibakterielle Wirkung. Auch Equisetin zeigte eine starke antimikrobielle Wirkung allerdings lediglich gegen das gram-positive Testbakterium.

Aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Neurospora terricola* MGC-5.1 wurden drei Isocoumarine isoliert. Es handelte sich um die Substanzen Diaportinsäure, Diaportinol und der neue Naturstoff 6-Methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol. Des Weiteren wurden in demselben Extrakt bereits anhand der UV-Spektren und ESI-Massenspektren die Verbindungen Dichlordiaportin, Indol-3-carbaldehyd und p-Hydroxybenzaldehyd detektiert. Der Ethylacetat-Extrakt wurde den bisher beschriebenen antibiotischen und zytotoxischen Assays unterzogen. Der Extrakt zeigte bei den Bioassays keine biologische Aktivität. Auf Grund der geringen Probenmenge und den vorherigen negativen Ergebnissen wurden die isolierten Verbindungen nicht auf ihre Bioaktivität untersucht.

Aus *Xylaria* sp. MGC-12.3 wurden der Ester (*E*)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat, die Mykotoxine Cytochalasin E und 5-Carboxymellein sowie der neue Naturstoff 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure isoliert. Die isolierten Reinsubstanzen (*E*)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat, Cytochalasin E und der neue Naturstoff 1,3-Dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carbonsäure wiesen eine potente Zytotoxizität gegenüber der L-5178Y-Zelllinie mit EC<sub>50</sub>-Werten  $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$  auf. Dagegen zeigte lediglich (*E*)-Methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoat eine ausgeprägte Hemmungswirkung gegen die getesteten Proteinkinasen.

Aus dem endophytischen Pilz *Hypoxylon fragiforme* BT-III.1 wurden die Mykotoxine Scytalon, 4-Hydroxyscytalon, das Antibiotikum RF-3192-C, Mitorubrinsäure, Mitorubrinol, Cytochalasin H, Orsellinsäure und der neue Naturstoff 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on gewonnen. In Untersuchungen zur Zytotoxizität mit der L-5178Y-Zelllinie wiesen die Verbindungen Cytochalasin H, RF-3192-C und 3-Ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-on eine starke antiproliferative Aktivität auf. Orsellinsäure und Mitorubrinol konnten dagegen das Wachstum der Testzellen nicht hemmen, während Mitorubrinsäure eine mäßige Aktivität aufwies. Neben den genannten Tests wurden die isolierten Reinsubstanzen RF-3192-C, Orsellinsäure, Mitorubrinsäure und Cytochalasin H ebenso hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber Proteinkinasen untersucht. Dabei zeigten Cytochalasin H und Orsellinsäure keine ausgeprägte Aktivität; RF-3192-C und Mitorubrinsäure waren dagegen am aktivsten.

Aus dem EtOAc-Extrakt des Pilzes *Eurotium rubrum* (BT-1) wurden die bekannten Mykotoxine Cochliodinol und Chaetomin erhalten. Beide Substanzen bewirkten im Zytotoxizitätstest eine sehr starke Hemmung des Wachstums der L-5178Y-Zelllinien. Auch

beim Proteinkinaseassay zeigten beide inhibitorische Wirkungen gegenüber Proteinkinasen, wobei Chaetomin am aktivsten war.

## Summary

The present study is dealing with the current and important topic in the field of bioactive compounds. Endophytic fungi were subjected to in depth scrutiny since so far, they represent a hardly explored source for discovering new biologically active secondary metabolites. In general terms, endophytic microorganism have certain benefits over macroorganisms, since production of almost unlimited quantities of a given compound by fermentation in principle should be possible without harm to fragile natural resources, thereby tackling the supply issue which has hampered the development of natural products into drugs in the past on many occasions. This field of research will deliver significant contributions in the search for new agents to treat human diseases or to combat pests in agriculture by natural means, and this will be of considerable ecological and social relevance. Thus, endophytic fungi represent a particularly valuable resource of growing importance for the development of new drugs and other biologically active agents. For these reasons, research into secondary metabolites appears rewarding and consequently was in the focus of the present dissertation.

Collection of samples from terrestrial habits (plants and mosses) as well as Chinese mangrove plants was followed by isolation of endophytic fungal strains from their respective host organisms. In accordance with the Ordinance on Biological Agents („Biostoffverordnung“) and the rules of Good Microbiological Laboratory Practice, the identity of any strain was established. Subsequently, a primary screening was conducted to pinpoint biologically or chemically interesting extracts. Biological screening was based mainly on agar plate diffusion assay to establish antimicrobial or antifungal activity, accompanied by the „brine shrimp assay“ to detect cytotoxic properties. In total, nine extracts were identified as biologically or chemically/analytically promising, and were selected for further investigation. The next step was the isolation of biologically active compounds. This was achieved by different chromatographic methods. Structure elucidation of individual natural products involved modern spectroscopic techniques, including HPLC-UV/VIS and LC/MS analysis, comparison of spectral properties with commercially available data bases of natural products; ion trap LC/MS (ESI and APCI), and one-dimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR,

DEPT) as well as two-dimensional (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY) NMR experiments. Fractionation of individual extracts and subsequent isolation efforts resulted in a total of 33 identified compounds, out of which three represent new secondary metabolites. Finally, isolated pure compounds were subjected to biological or pharmacological characterisation, especially with regard to their inhibitory potential towards the tumour cell line L-5178Y (murine lymphoma cells) and protein kinases.

From the fungus *Pleurophoma cava* SL-5 the chroman-4-one derivative aposphaerin A was isolated. The compound which was obtained from the EtOAc extract did not display significant cytotoxic activity towards the L-5178Y tumour cell line, but exhibited pronounced inhibitory activity against 4 out of 24 protein kinases tested.

From the ethyl acetate extract of the fungus *Penicillium chrysogenum* HN-B2, the known mycotoxins terrestric acid, viridicatol, roquefortin C and viridicatin were obtained. Terrestric acid, viridicatol, and viridicatin did not show significant inhibitory properties towards the L-5178Y tumour cell line, while in the same bioassay, roquefortin C led to a moderate growth inhibition of L-5178Y cells. However, the compound did not display relevant inhibitory properties towards the various protein kinases.

The fungus *Botryosphaeria rhodina* BT-3 yielded two related benzofuran congeners griseofulvin and dechlorogriseofulvin in addition to the peptide cycloaspeptide A and the benzodiazepine derivative sclerotigenin. Due to the small amounts of compounds available, griseofulvin, dechlorogriseofulvin and cycloaspeptide A were not subjected to biological testing. On the other hand, sclerotigenin was found to exhibit a strong activity towards murine lymphoma cells, but was devoid of noticeable activity against protein kinases.

The known compound kojic acid was isolated from the EtOAc extract of the fungus *Neurospora discreta* NE-8. The isolated pure compound was found to display weak antibacterial properties against the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

The mycotoxins equisetin, fusapyrone and deoxyfusapyrone were obtained from *Fusarium incarnatum* MGC-1.3. When tested for biological activity, both fusapyrone and deoxyfusapyrone exhibited strong antifungal activity and a remarkable antibacterial profile. Likewise, equisetin was strongly active, albeit only towards the gram-positive test bacterium.

From the EtOAc extract of the fungus *Neurospora terricola* MGC-5.1, three isocoumarins were isolated. This included diaportic acid, diaportinol and the new natural product 6-methoxy-3-(2,4-dihydroxypentyl)-isocoumarinol. Furthermore, in the same extract dichlorodiaportin, indole-3-carbaldehyde and p-hydroxybenzaldehyde were detected based on

their UV spectra and ESI mass spectra. The ethyl acetate extract was subjected to the different assays for antibiotic and cytotoxic activity as described above, but proved inactive. Based on these negative results and due to the low yield of compounds, no further biological testing of isolated pure compounds was conducted.

From *Xylaria* sp. MGC-12.3 the ester (*E*)-methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoate, the mycotoxins cytochalasin E and 5-carboxymellein as well as the new natural product 1,3-dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carboxylic acid were isolated. The isolated pure compounds (*E*)-methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoate, cytochalasin E and the new natural product 1,3-dihydro-4-hydroxy-1-(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carboxylic acid displayed potent cytotoxicity towards the L-5178Y cell line with EC<sub>50</sub> values  $\leq 1.0$   $\mu\text{g/ml}$ . However, only (*E*)-methyl 3-(4-methoxyphenoxy)-propenoate exhibited pronounced inhibitory activity towards the various protein kinases.

From the endophytic fungus *Hypoxylon fragiforme* BT-III.1 the mycotoxins scytalon, 4-hydroxyscytalon, the antibiotic RF-3192-C, mitorubrinic acid, mitorubrinol, cytochalasin H, orsellinic acid as well as the new natural product 3-ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-one were obtained. When assayed for cytotoxicity towards the L-5178Y cell line, cytochalasin H, RF-3192-C and 3-ethyl-7-methoxy-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-one were found to exhibit a strong antiproliferative activity. Orsellinic acid and mitorubrinol were unable to inhibit the growth of the cells tested, while mitorubrinic acid displayed moderate activity. In addition to these tests, the pure compounds RF-3192-C, orsellinic acid, mitorubric acid and cytochalasin H were also investigated with regard to their inhibitory profiles against protein kinases. Cytochalasin H and orsellinic acid did not display pronounced activity, whereas RF-3192-C and mitorubric acid were identified as the most active compounds.

From the EtOAc extract of the fungus *Eurotium rubrum* (BT-1) the known mycotoxins cochliodinol and chaetomin were obtained. In the cytotoxicity assay, both compounds resulted in a very strong growth inhibition of the L-5178Y cell line. Also, in the protein kinase assay both compounds proved active, with chaetomin displaying a higher degree of activity.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abate D, Abraham WR, Meyer H. 1997. Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry* 44(8):1443-1448.
- Abdel-Motaal FF, Nassar MSM, El-Zayat SA, El-Sayed MA, Ito SI. 2010. Antifungal Activity of Endophytic Fungi Isolated from Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Pak. J. Bot* 42(4):2883-2894.
- Abdou R, Scherlach K, Dahse HM, Sattler I, Hertweck C. 2010. Botryorhodines AD, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 71(1):110-116.
- Adeboya M, Edwards R, Laessoe T, Maitland D. 1995. Metabolites of the higher fungi. Part 27. Berteric acid, cameronic acid and malaysic acid, three new polysubstituted fatty acids related to cubensic acid from species of the fungus genus *Xylaria*. *J Chem Res Syn* 9:356-357.
- Adeboya MO, Edwards RL, Maitland DJ, Laessó T, Whalley AJS. 1996. Metabolites of the higher fungi, 30. *threo*- and *erythro*-telfairic acid and 2,3-didehydrotelfairic anhydride from the fungus *Xylaria telfairii*. *Liebigs Annalen* 1996(9):1437-1441.
- Adler A, Lew H. *Mykogeographie der Gattung Fusarium: Untersuchung der Fusarium-Flora in Böden der Kanarischen Inseln*.
- Agerer, R., *Mykologie-warum? Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Mykologie; München, 2001*.
- Albrecht U, Lalk M, Langer P. 2005. Synthesis and structure-activity relationships of 2-vinylchroman-4-ones as potent antibiotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 13(5):1531-1536.
- Aldridge D, Burrows B, Turner W. 1972. The structures of the fungal metabolites cytochalasins E and F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (3):148-149.
- Aldridge D, Davies A, Jackson M, Turner W. 1974. Pentaketide metabolites of the fungus *Phialophora lagerbergii*. *J.C.S. Perkin I* 1540-1541.
- Allison A, Davies P, De Petris S. 1971. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nature* 232(31):153-155.
- Altomare C, Pengue R, Favilla M, Evidente A, Visconti A. 2004. Structure-activity relationships of derivatives of fusapyrone, an antifungal metabolite of *Fusarium semitectum*. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(10):2997-3001.
- Altomare C, Perrone G, Zonno M, Evidente A, Pengue R, Fanti F, Polonelli L. 2000. Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *J. Nat. Prod* 63(8):1131-1135.
- Aly AH, Edrada-Ebel RA, Wray V, Muller WEG, Kozytska S, Hentschel U, Proksch P, Ebel R. 2008. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 69(8):1716-1725.
- An Z, Siegel M, Hollin W, Tsai HF, Schmidt D, Schardl C. 1993. Relationships among non-*Acremonium* sp. fungal endophytes in five grass species. *Applied and environmental microbiology* 59(5):1540.

- Anderson JR, Edwards RL, Whalley AJS. 1983. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3, 4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family Xylariaceae. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:2185-2192.
- Anderson JR, Edwards RL, Poyser JP, Whalley AJS. 1988. Metabolites of the higher fungi. Part 23. The punctaporonins. Novel bi-, tri-, and tetra-cyclic sesquiterpenes related to caryophyllene, from the fungus *Poronia punctata* (Linnaeus: Fries) Fries. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1(4):823-831.
- Anderson JR, Edwards RL, Whalley AJS. 1982. Metabolites of the higher fungi. Part 19. Serpenone, 3-methoxy-4-methyl-5-prop-1-enylfuran-2 (5H)-one, a new -butyrolactone from the fungus *Hypoxylon serpens* (Barrons strain)(Persoon ex Fries) Kickx. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:215-221.
- Anderson JR, Edwards RL, Whalley AJS. 1983. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3, 4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family xylariaceae. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:2185-2192.
- Anderson JR, Edwards RL, Whalley AJS. 1985. Metabolites of the higher fungi. Part 22. 2-Butyl-3-methylsuccinic acid and 2-hexylidene-3-methylsuccinic acid from xylariaceous fungi. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:1481-1485.
- Anderson R. 2008. *Hypoxylon* in Britain and Ireland: 1. Changing perspectives in *Hypoxylon*. Field Mycology 9(1):5-12.
- Aninat C, Hayashi Y, André F, Delaforge M. 2001. Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. Chem. Res. Toxicol 14(9):1259-1265.
- Anita D, Sridhar K, Bhat R. 2009. Diversity of fungi associated with mangrove legume *Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. Wight (Fabaceae). Livestock Research for Rural Development 21(5).
- Anstiss M, Clayden J, Grube A, Youssef LH. 2002. Lithiation and Stereoselective Transformations of 3-Aroyl-2,2,4,4-tetramethyloxazolidines (TMO Amides), a New Class of Acid-labile Atropisomeric Amides. Synlett 33(25):290-294.
- Antibase. 2003. Database of natural products from microorganisms and higher fungi, CD-ROM, Wiley-VCH, Berlin
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21(2-3):51-66.
- Arnold D, Scott P, McGuire P, Harwig J, Nera E. 1978. Acute toxicity studies on roquefortine and PR toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. Food and Cosmetics Toxicology 16(4):369-371.
- Athanasellis G, Igglessi-Markopoulou O, Markopoulos J. 2010. Tetramic and tetronic acids as scaffolds in bioinorganic and bioorganic chemistry. Bioinorganic Chemistry and Applications 2010.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, De Araújo WL. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology 3(1):15-16.
- Baker PW, Kennedy J, Dobson ADW, Marchesi JR. 2009. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from Irish coastal waters. Marine Biotechnology 11(4):540-547.
- Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR. 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development. Human Medicinal Agents from Plants 1:2-12.

- Balde EHS, Andolfi A, Bruyere C, Cimmino A, Lamoral-Theys D, Vurro M, Damme MV, Altomare C, Mathieu V, Kiss R. 2010. Investigations of Fungal Secondary Metabolites with Potential Anticancer Activity. *Journal of Natural Products* 73(5):969-971.
- Bandaranayake W. 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes* 2(3):133-148.
- Bayman P, Lebron LL, Tremblay RL, LODGE D. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* 135(1):143-149.
- Beck JJ, Chou SC. 2007. The Structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *Journal of natural products* 70(5):891-900.
- Belesky DP, Malinowski DP. 2000. Abiotic stresses and morphological plasticity and chemical adaptations of *Neotyphodium*-infected tall fescue plants. *Microbial endophytes*:455-484.
- Bell A, Stipanovic R, Puhalla J. 1976. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: Identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. *Tetrahedron* 32(12):1353-1356.
- Bell A, Wheeler MH. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24(1):411-451.
- Bentley R. 2007. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *ChemInform* 38(18):no-no.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4:14-19.
- Biabani M, Laatsch H. 1998. Advances in chemical studies on low molecular weight metabolites of marine fungi. *Journal für Praktische Chemie/Chemiker Zeitung* 340(7):589-607.
- Bills G, Polishook J. 1992a. A new species of *Mycocleptodiscus* from living foliage of *Chamaecyparis thyoides*. *Mycotaxon* (USA).
- Bills G, Polishook J. 1992b. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides*. *Sydowia* 44:01-12.
- Binder M, Tamm C. 1973. Die Cytochalasane, eine neue Klasse biologisch aktiver Metabolite von Mikroorganismen. *Angewandte Chemie* 85(9):369-381.
- Birkinshaw JH, Gowlland A. 1962. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 110. Production and biosynthesis of orsellinic acid by *Penicillium madriti* G. Smith. *Biochem. J.* 84(2):342-347.
- Birkinshaw JH, Luckner M, Mohammed Y, Mothes K, Stickings C. 1963. Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms. 114. Viridicatol and Cyclophenol, Metabolites of *Penicillium viridicatum* Westling and *Penicillium cyclopium* Westling. *Biochem. J.* 89:196.
- Birkinshaw JH, Raistrick H. 1936. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Isolation, properties and constitution of terrestric acid (ethylcarolic acid), a metabolic product of *Penicillium terrestre* Jensen. *Biochemical Journal* 30(12):2194-2200.
- Bloch R. 1973. Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry* 12(23):4799-4801.
- Bode HB, Zeeck A. 2000. Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments

- from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24'707. *Phytochemistry* 54(6):597-601.
- Boerema G, Dorenbosch MMJ. 1973. The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. *Studies in Mycology* 3:1-50.
- Boerema G, Loerakker W, Hamers M. 1996. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) III-2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of section *Plenodomus* (excluded species). *Persoonia-Leiden*- 16:141-190.
- Bottalico A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80(2):85-103.
- Bottalico A, Capasso R, Evidente A, Randazzo G, Vurro M. 1990. Cytochalasins: Structure-activity relationships. *Phytochemistry* 29(1):93-96.
- Brady SF, Wagenaar MM, Singh MP, Janso JE, Clardy J. 2000. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Organic letters* 2(25):4043-4046.
- Brauers G. 2003. Isolierung und Strukturaufklärung von neuen Naturstoffen aus schwammassoziierten Pilzen-Mittelmeer und Indopazifik. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Brauers G, Edrada RA, Ebel R, Proksch P, Wray V, Berg A, Gräfe U, Schächtele C, Totzke F, Finkenzeller G. 2000. Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases. *Journal of natural products* 63(6):739-745.
- Breen J. 1994. Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology* 39(1):401-423.
- Brewer D, Jerram W, Meiler D, Taylor A. 1970. The toxicity of cochliodinol, an antibiotic metabolite of *Chaetomium* spp. *Canadian Journal of Microbiology* 16(6):433-440.
- Brewer D, Jerram W, Taylor A. 1968. The production of cochliodinol and a related metabolite by *Chaetomium* species. *Canadian Journal of Microbiology* 14(8):861-866.
- Brewer D, Jerram W, Taylor A. 1975. Antibiotic cochliodinol and production by *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium globsum*. *Canadian Patents & Development Ltd.* (US 3917820).
- Bringmann G, Lang G, Bruhn T, Schaffler K, Steffens S, Schmaljohann R, Wiese J, Imhoff JF. 2010. Sorbifuranones AC, sorbicillinoid metabolites from *Penicillium* strains isolated from Mediterranean sponges. *Tetrahedron*.
- Bringmann G, Lang G, Gulder TAM, Tsuruta H. 2005. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. *Tetrahedron* 61(30):7252-7265.
- Brtko J, Rondahl L, Fickova M, Hudecova D, Eybl V, Uher M. 2004. Kojic acid and its derivatives: history and present state of art. *Central european journal of public health* 12(SUPP):16-17.
- Brunner F, Petrini O. 1992. Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycological Research* 96(9):723-733.
- Büchi G, Kitaura Y, Yuan SS, Wright HE, Clardy J, Demain AL, Glinsukon T, Hunt N, Wogan GN. 1973. Structure of cytochalasin E, a toxic metabolite of *Aspergillus clavatus*. *Journal of the American Chemical Society* 95(16):5423-5425.

- Büchi G, White J, Wogan G. 1965. The structures of mitorubrin and mitorubrinol. *Journal of the American Chemical Society* 87(15):3484-3489.
- Bunse A, Holländer-Czytko H, Jeske S, Klämbt C, Klapper R, Wolff K. 2004. *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer, Berlin.
- Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W, Wingfield MJ. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98(3):423.
- Burke L, Dixon D, Ley S, Rodríguez F. 2000. A short stereoselective total synthesis of the *Fusarium* toxin equisetin. *Org. Lett* 2(23):3611-3613.
- Burke L, Dixon D, Ley S, Rodríguez F. 2005. Total Synthesis of the *Fusarium* Toxin Equisetin. *ChemInform* 36(24).
- Burmeister H, Bennett G, Vesonder R, Hesseltine C. 1974. Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 5(6):634.
- Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, Gunde Cimerman N. 2005. The genus *Eurotium*—members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS microbiology ecology* 51(2):155-166.
- Butler MS. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural product reports* 22(2):162-195.
- Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, da SBolzani V, Araújo A, Young MCM, Pfenning LH. 2005. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova* 28(6):991.
- Caporale LH. 1995. Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(1):75.
- Carroll G. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. *Microbiology of the Phyllosphere*:205-222.
- Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Carroll RC, Gerrard JM, Gilliam JM. 1981. Clot retraction facilitates clot lysis. *Blood* 57(1):44.
- Carter S. 1967. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213(5073):261.
- Carter S. 1972. Die Cytochalasine als Hilfsmittel bei cytologischen Untersuchungen. *Endeavour* 31:77-82.
- Chapela I, Petrini O, Hagemann L. 1991. Monolignol glucosides as specific recognition messengers in fungus-plant symbioses. *Physiological and molecular plant pathology* 39(4):289-298.
- Chen G, Lin Y, Wen L, Vrijmoed L, Gareth Jones E. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron* 59(26):4907-4909.
- Chinworrungsee M, Kittakoop P, Isaka M, Rungrod A, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2001. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11(15):1965-1969.
- Chong R, Gray R, King R, Whalley W. 1971. The chemistry of fungi. Part LXII. The synthesis of (±)-mitorubrin, a metabolite of *Penicillium rubrum*. *J. Chem. Soc.*

- C:3571-3575.
- Clark B, Capon RJ, Lacey E, Tennant S, Gill JH. 2005. Roquefortine E, a Diketopiperazine from an Australian Isolate of *Gymnoascus reessii*. *J. Nat. Prod* 68(11):1661-1664.
- Clay K. 1988a. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press, New York:79-105.
- Clay K. 1988b. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69(1):10-16.
- Clay K. 1991. Fungal endophytes, grasses, and herbivores. *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*:199–226.
- Clayden J, Stimson CC, Keenan M. 2005. Asymmetric Ortholithiation of Amides by Conformationally Mediated Chiral Memory: An Enantioselective Route to Naphtho- and Benzofuranones. *Synlett* 16(11):1716-1720.
- Claydon N, Grove JF, Pople M. 1985. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* 24(5):937-943.
- Cohen A, Goldman J, Daniels R, Kanenson W. 1960. Treatment of shoulder-hand syndrome with griseofulvin. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 173(5):542.
- Concepcion G, Lazaro J, Hyde K. 2001. Screening for bioactive novel compounds. *Bio-Exploitation of Filamentous Fungi, Fungal Diversity Research Series* 6:93-129.
- Cox RH, Morris P, Cutler HG, Hurd RE, Cole RJ. 1983. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the conformation of cytochalasin H derivatives and plant growth regulating effects of cytochalasins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31(2):405-408.
- Cragg GM, Boyd MR, Khanna R, Kneller R, Mays TD, Mazan KD, Newman DJ, Sausville EA. 1999. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure and Applied Chemistry* 71(9):1619-1634.
- Crawford JM, Vagstad AL, Whitworth KP, Ehrlich KC, Townsend CA. 2008. Synthetic Strategy of Nonreducing Iterative Polyketide Synthases and the Origin of the Classical “Starter Unit Effect. *Chembiochem* 9(7):1019-1023.
- Czarnik AW. 1996. Guest editorial. *Accounts of Chemical Research* 29(3):112-113.
- Dalsgaard PW, Larsen TO, Christophersen C. 2005. Bioactive cyclic peptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium algidum*. *The Journal of Antibiotics* 58(2):141-144.
- Dalsgaard PW, Larsen TO, Frydenvang K, Christophersen C. 2004. Psychrophilin A and Cycloaspeptide D, Novel Cyclic Peptides from the Psychrotolerant Fungus *Penicillium ribeum*. *Journal of natural products* 67(5):878-881.
- Davies-Coleman MT, Beukes DR. 2004. Ten years of marine natural products research at Rhodes University. *South African journal of science* 100(11 & 12):539-544.
- Davis EC, Franklin JB, Shaw AJ, Vilgalys R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany* 90(11):1661.
- Davis RH, de Serres FJ. 1970. [4] Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in enzymology* 17:79-143.

- De Bary A. 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Engelmann.
- De Gruyter J, Aveskamp MM, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological research* 113(4):508-519.
- DeFife KM, Jenney CR, Colton E, Anderson JM. 1999. Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion. *The FASEB journal* 13(8):823.
- Desjardins A, Proctor R. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology* 119(1-2):47-50.
- Devi P, D'Souza L, Kamat T, Rodrigues C, Naik CG. 2009. Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *IJMS* 38:38-44.
- Diesel, Arnulf. 2009. Endophytische Pilze aus terrestrischen Pflanzen – molekularbiologische und naturstoffchemische Untersuchungen. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Ding G, Liu S, Guo L, Zhou Y, Che Y. 2008. Antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. *Journal of natural products* 71(4):615-618.
- Dingermann T. 2002. Pharmazeutische Biologie: molekulare Grundlagen und klinische Anwendung. Springer.
- Dittrich, Peter. "Pilze" Microsoft® Encarta® Online-Enzyklopädie 2007 <http://de.encarta.msn.com> © 1997.
- DNP-*Dictionary of Natural Products* on CD-ROM, Chapman and Hall/CRC 2007; Hampden Data Services, Boca Raton, USA.
- Dictionary of Natural Products Online - DNP 19.2 Copyright © 2011 Taylor & Francis Group (<http://dnp.chemnetbase.com/>)
- Drexler H, MacLeod R, Borkhardt A, Janssen J. 1995. Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 9(3):480-500.
- Dreyfuss M, Chapela IH. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Biotechnology (Reading, Mass.)* 26:49.
- Dreyfuss M, Petrini O. 1984. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. *Botanica helvetica* 94(1):33-40.
- Dubost JJ, Soubrier M, Ristori JM, Guillemot C, Bussi re JL, Sauvezie B. 2003. Late-onset spondyloarthritis mimicking reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Joint bone spine* 70(3):226-229.
- Durodola J. 1974. Anti-neoplastic property of a crystalline compound extracted from *Morinda lucida*. *Planta Medica* 26(3):208A.
- Edrada RA, Heubes M, Brauers G, Wray V, Berg A, Gr fe U, Wohlfarth M, M hlbacher J, Schaumann K, Sudarsono. 2002. Online Analysis of Xestodecalactones AC, Novel Bioactive Metabolites from the Fungus *Penicillium* cf. *montanense* and their subsequent Isolation from the Sponge *Xestospongia exigua*. *Journal of natural products* 65(11):1598-1604.
- Edwards RL, Maitland DJ, Poyser JP, Whalley AJS. 1989a. Metabolites of the higher fungi. Part 25. Punctaporonin G from the fungus *Poronia punctata* (Linnaeus: Fries) Fries. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1(11):1939-1941.

- Edwards RL, Maitland DJ, Whalley AJS. 1989b. Metabolites of the higher fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q, and R. New cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1(1):57-65.
- Edwards RL, Maitland DJ, Whalley AJS. 1991. Metabolites of the higher fungi. Part 26. Cubenic acid, 3, 7, 11, 15-tetra hydroxy-18-(hydroxymethyl)-2, 4, 6, 10, 14, 16, 20-heptamethyldocosa-4E, 8E, 12E, 16E-tetraenoic acid, a novel polysubstituted C22 fatty acid from the fungus *Xylaria cubensis* (Mont.) Fr. with substituents and substitution pattern similar to the macrolide antibiotics. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1(6):1411-1417.
- Edwards RL, Whalley AJS. 1979. Metabolites of the higher fungi. Part 18. 3-Butyl-4-methylfuran-2 (5H)-one and 3-butyl-4-methylenefuran-2 (5H)-one. New butyrolactones from the fungus *Hypoxylon serpens* (Persoon ex Fries) Kickx. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:803-806.
- Effenberger F, Syed J. 1998. Stereoselective synthesis of biologically active tetronic acids. Tetrahedron: Asymmetry 9(5):817-825.
- El-Morsy ESM. 1999. Microfungi from the ectorrhizosphere-rhizoplane zone of different halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. Mycologia 91(2):228-236.
- Elsässer B, Krohn K, Flörke U, Root N, Aust HJ, Draeger S, Schulz B, Antus S, Kurtán T. 2005. X ray Structure Determination, Absolute Configuration and Biological Activity of Phomoxanthone A. European journal of organic chemistry 2005(21):4563-4570.
- Evidente A. 1987. Cavoxinine, a minor metabolite from *Phoma cava*, and cavoxinone, its corresponding chroman-4-one. Journal of Natural Products 50(2):173-177.
- Evidente A, Conti L, Altomare C, Bottalico A, Sindona G, Segre A, Logrieco A. 1994. Fusapyrone and deoxyfusapyrone, two antifungal Pyrones from *Fusarium semitectum*. Natural Toxins 2(1):4-13.
- Evidente A, Cristinzio G, Capasso R, Andolfi A. 1997. Fungitoxic activity of some cytochalasins and their derivatives on *Phytophthora* species. Natural Toxins 5(6):228-233.
- Evidente A, Randazzo G, Iacobellis N, Bottalico A. 1985. Structure of cavoxin, a new phytotoxin from *Phoma cava* and cavoxone, its related chroman-4-one. Journal of natural products 48(6):916-923.
- Fabrice V, Michel G. 1990. Enantiomeric purity of scytalone from different fungal sources. Tetrahedron 46(8):2827-2834.
- Ferrazzoli Devienne K, Goncalves Raddi M, Gomes Coelho R, Vilegas W. 2005. Structure-antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. Phytomedicine 12(5):378-381.
- Ferri C, Bernini L, Bombardieri S, Pasero G. 1986. Long-term griseofulvin treatment for progressive systemic sclerosis. Scandinavian journal of rheumatology 15(4):356-362.
- Findlay J, Kwan D. 1973a. Scytalone (3, 6, 8-trihydroxytetralone), a metabolite from a *Scytalidium* species. Can. J. Chem 51(10):1617-1619.
- Findlay J, Kwan D. 1973b. Metabolites from a *Scytalidium* species. Canadian Journal of Chemistry 51(19):3299-3301.
- Finkelstein DB, Ball C. 1992. Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. Butterworth-Heinemann.

- Finkelstein E, Amichai B, Grunwald MH. 1996. Griseofulvin and its uses. *International journal of antimicrobial agents* 6(4):189-194.
- Fischer G, Braun S, Dott W. 2003. Profiles of microfungi - *Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*. *International journal of hygiene and environmental health* 206(1):65-67.
- Fisher P, Graf F, Petrini L, Sutton B, Wookey P. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia* 87(3):319-323.
- Fisher P, Petrini O. 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. *Mycological Research* 94(3):313-319.
- Fisher P, Petrini O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 120(1):137-143.
- Fotso J, Leslie JF, Smith JS. 2002. Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Applied and environmental microbiology* 68(10):5195-5197.
- Frisvad JC, Filtenborg O. 1983. Classification of *terverticillate penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl Environ Microbiol* 46(6):1301-10.
- Frisvad JC, Larsen TO, Dalsgaard PW, Seifert KA, Louis-Seize G, Lyhne EK, Jarvis BB, Fettinger JC, Overy DP. 2006. Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56(6):1427.
- Frisvad JC, Samson RA. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne *terverticillate Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49(49).
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol* 49:201-242.
- Fuchs G, Schlegel HG. 2006. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag.
- Fujimoto H, Sumino M, Okuyama E, Ishibashi M. 2004. Immunomodulatory Constituents from an Ascomycete, *Chaetomium seminudum*. *Journal of natural products* 67(1):98-102.
- Furutani Y, Shimada M, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H. 1975. Reticulol, an inhibitor of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. *The Journal of antibiotics* 28(7):558.
- Fuska J, Fuskova A, Nemeč P. 1979. Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects, produced from *Penicillium vermiculatum*. *Biologia* 34:735-739.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma LJ, Smirnov S, Purcell S. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422(6934):859-868.
- Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* 151(4):1021.
- Gardner W, McCoy C, Finkelstein D, Ball C. 1992. Insecticides and herbicides. *Biotechnology of filamentous fungi: technology and products*:335-359.

- Gaucher G, Shepherd M. 1968. Isolation of orsellinic acid synthase. Biochemical and biophysical research communications 32(4):664.
- Gazis R, Chaverri P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecology.
- Geiger WB, Conn JE, Waksman SA. 1944. Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by *Chaetomium cochliodes*: II. Isolation and Concentration. J Bacteriol 48(5):531-536.
- Gerlach W, Nirenberg H. 1982. The genus *Fusarium*--a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem(209).
- Giarman NJ. 1949. Antibiotic lactones and synthetic analogs. II. Cardiotoxic effects on the isolated frog heart. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 96(2):119.
- Gomes AT, Smania Júnior A, Seidel C, Smania EFA, Honda NK, Roesse FM, Muzzi RM. 2003. Antibacterial activity of orsellinates. Brazilian Journal of Microbiology 34(3):194-196.
- Grabley S, Thiericke R. 1999. The impact of natural products on drug discovery. Drug discovery from nature:3-37.
- Grove JF, MacMillan J, Mulholland T, Rogers MAT. 1952. 759. Griseofulvin. Part I. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1952:3949-3958.
- Guo Z. 1995. Structure-activity relationships in medicinal chemistry: development of drug candidates from lead compounds. Pharmacotherapy Library 23:299-320.
- Gupta S, Krasnoff S, Underwood N, Renwick J, Roberts D. 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Mycopathologia 115(3):185-189.
- Hagglblom P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. Applied and environmental microbiology 56(9):2924.
- Harris CM, Roberson JS, Harris TM. 1976. Biosynthesis of griseofulvin. Journal of the American Chemical Society 98(17):5380-5386.
- Harrison D, Kennewell P, Taylor J. 1977. Novel fused ring derivatives of 2 methyl 3 o tolyl 4 (3H) quinazolone; Quinazolino [3, 2a][1, 4] benzodiazepines. Journal of Heterocyclic Chemistry 14(7):1191-1196.
- Haslam R, Davidson M, McClenaghan M. 1975. Cytochalasin B, the blood platelet release reaction and cyclic GMP.
- Hassan A. 2007. Neue Naturstoffe aus endophytischen Pilzen ägyptischer Arzneipflanzen-chemische und biologische Charakterisierung.
- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research 95(6):641-655.
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105(12): 1422-1432.
- Haynes L, Plimmer J. 1960. Tetrionic acids. Quarterly Reviews, Chemical Society 14(3):292-315.
- Hazuda D, Blau C, Felock P, Hastings J, Pramanik B, Wolfe A, Bushman F, Farnet C, Goetz M, Williams M. 1999. Isolation and characterization of novel human immunodeficiency virus integrase inhibitors from fungal metabolites. Antiviral

- chemistry & chemotherapy 10(2):63-70.
- Hellwig V, Ju YM, Rogers JD, Fournier J, Stadler M. 2005. Hypomiltin, a novel azaphilone from *Hypoxylon hypomiltum*, and chemotypes in *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* as inferred from analytical HPLC profiling. *Mycological Progress* 4(1):39-54.
- Herath KB, Jayasuriya H, Ondeyka JG, Polishook JD, Bills GF, Dombrowski AW, Cabello A, Vicario PP, Zweerink H, Guan Z. 2005. Isolation and structures of novel fungal metabolites as chemokine receptor (CCR2) antagonists. *The Journal of antibiotics* 58(11):686-694.
- Hiort J. 2002. Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hiramatsu F, Miyajima T, Murayama T, Takahashi K, Koseki T, Shiono Y. 2006. Isolation and structure elucidation of neofusapyrone from a marine-derived *Fusarium* species, and structural revision of fusapyrone and deoxyfusapyrone. *The Journal of Antibiotics* 59(11):704-709.
- Ho YS, Duh JS, Jeng JH, Wang YJ, Liang YC, Lin CH, Tseng CJ, Yu CF, Chen RJ, Lin JK. 2001. Griseofulvin potentiates antitumorigenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *International journal of cancer* 91(3):393-401.
- Hofbauer W, Breuer K, Sedlbauer K. 2004. Schimmelpilze hinter dem Schrank - *Eurotium rubrum*, ein bemerkenswerter Fall. Fraunhofer-Institut für Bauphysik.
- Honma M, Kudo S, Takada N, Tanaka K, Miura T, Hashimoto M. 2010. Novel neofusapyrones isolated from *Verticillium dahliae* as potent antifungal substances. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20(2):709-712.
- Horn W, Simmonds M, Schwartz R, Blaney W. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 51(14):3969-3978.
- Hornbogen T, Glinski M, Zocher R. 2000. Biosynthesis of the mycotoxin enniatin in *Fusarium* species. *Mycotoxin Research* 16:84-87.
- Hou Y, Wang T, Long H, Zhu H. 2007. Cloning, sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase 1 from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39(2):101.
- Höller U, Gloer JB, Wicklow DT. 2002. Biologically active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*. *Journal of natural products* 65(6):876-882.
- Indriani ID. 2008. Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Cuvillier Verlag.
- Isaka M, Jaturapat A, Kladwang W, Punya J, Lertwerawat Y, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2000. Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *Planta medica* 66(5):473-475.
- Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, Danwisetkanjana K, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2001. Phomoxanthenes A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of natural products* 64(8):1015-1018.
- Iwasaki S, Muro H, Sasaki K, Nozoe S, Okuda S, Sato Z. 1973. Isolations of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* Cavara. *Tetrahedron Letters* 14(37):3537-3542.

- Jacobsen, J.P.; Reffstrup, T.; Cox, R.E.; Holker, J.S.E.; Boll, P.M. 1978. Revision of the naturally occurring acyl tetronic acid: dihydrocarolic acid, terrestric acid and carlic acid. *Tetrahedron Lett.* 19:1081–1084.
- Jacobson DJ, Dettman JR, Adams RI, Boesl C, Sultana S, Roenneberg T, Merrow M, Duarte M, Marques I, Ushakova A. 2006. New findings of *Neurospora* in Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. *Mycologia* 98(4):550.
- Jacobson DJ, Powell AJ, Dettman JR, Saenz GS, Barton MM, Hiltz MD, Dvorachek Jr WH, Glass NL, Taylor JW, Natvig DO. 2004. *Neurospora* in temperate forests of western North America. *Mycologia* 96(1):66.
- Jadulco R. 2002. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine sponges and sponge-derived fungi. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Jarvis BB, Zhou Y, Jiang J, Wang S, Sorenson W, Hintikka EL, Nikulin M, Parikka P, Etzel RA, Dearborn DG. 1996. Toxicogenic molds in water-damaged buildings: dechlorogriseofulvins from *Memnoniella echinata*. *Journal of natural products* 59(6):553-554.
- Jerram W, McInnes A, Maass W, Smith D, Taylor A, Walter J. 1975. The Chemistry of Cochliodinol, a Metabolite of *Chaetomium* spp. *Canadian Journal of Chemistry* 53(5):727-737.
- Jeschke R, Inuma K, Harder A, Schindler M, Murakami T. 2005. Influence of the cyclooctadepsipeptides PF1022A and PF1022E as natural products on the design of semi-synthetic anthelmintics such as emodepside. *Parasitology Research* 97:11-16.
- Jie L, Ai-bing K, Xue-lian Z, Zhi-hui Z, Jing-tong Z, Xin-hua L, Ye-ying L, Xiao-lan C, Ying S, Hua Z. 2008. 2264 A and B, the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitors from metabolites of microorganisms [J]. *Chinese Journal of Antibiotics* 8.
- Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M. 2008. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology Research* 38(9):909-918.
- Johnston D, Francon N, Edmonds DJ, Procter DJ. 2001. Samarium (II)-mediated 4-exo-trig cyclization. A stereocontrolled approach to the core of pestalotiopsin A. *Organic Letters* 3(13):2001-2004.
- Joshi BK, Gloer JB, Donald T, Dowd PF. 1999. Sclerotigenin: A new antiinsectan benzodiazepine from the sclerotia of *Penicillium sclerotigenum*. *Journal of Natural products* 62(4):650-652.
- Ju Y, Sacalis JN, Still CC. 1998. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9):3785-3788.
- Kajimoto O, Kobayashi M, Fueno T. 1973. Transmission of Substituent Effects through Oxygen and Sulfur Atoms. III. The Ionization Equilibrium Constants of Ring-substituted cis- $\beta$ -Phenoxyacrylic Acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 46:1425-1428.
- Khoa L, Hatai K, Aoki T. 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 27(9):507-515.
- Kingston DGI, Chen PN, Vercellotti JR. 1976. Metabolites of *Aspergillus versicolor*: 6, 8-di-O-methylnidurufin, griseofulvin, dechlorogriseofulvin, and 3, 8-dihydroxy-6-

- methoxy-1-methylxanthone. *Phytochemistry* 15(6):1037-1039.
- Kis-Papo T, Grishkan I, Oren A, Wasser SP, Nevo E. 2001. Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. *Mycological Research* 105(6):749-756.
- Kobayashi R, Samejima Y, Nakajima S, Kawai K, Udagawa S. 1987. Studies on fungal products. XI: Isolation and structures of novel cyclic pentapeptides from *Aspergillus* sp. NE-45. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 35(4):1347-1352.
- Kobayashi S, Mimura Y, Naitoh T, Kimura I, Kimura M. 1993. Chemical structure-activity of cnidium rhizome-derived phthalides for the competence inhibition of proliferation in primary cultures of mouse aorta smooth muscle cells. *Japanese journal of pharmacology* 63(3):353.
- Kobayashi S, Mimura Y, Notoya K, Kimura I, Kimura M. 1992. Antiproliferative effects of the traditional Chinese medicine shimotsu-to, its component cnidium rhizome and derived compounds on primary cultures of mouse aorta smooth muscle cells. *Japanese journal of pharmacology* 60(4):397.
- Koenig GM, Wright AD. 1996. Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta medica* 62:193-211.
- Koenig GM, Wright AD. 1997. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Planta medica* 63:186-187.
- Kongsaree P, Prabpai S, Sriubolmas N, Vongvein C, Wiyakrutta S. 2003. Antimalarial Dihydroisocoumarins Produced by *Geotrichum* sp., an Endophytic Fungus of *Crassocephalum crepidioides*. *Journal of Natural Products* 66(5):709-711.
- Kopp B, Rehm H. 1979. Antimicrobial action of roquefortine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6(4):397-401.
- Kopp B, Rehm H. 1981. Studies on the inhibition of bacterial macromolecule synthesis by roquefortine, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 13(4):232-235.
- Kreuter MH, Robitzki A, Chang S, Steffen R, Michaelis M, Kljajic Z, Bachmann M, Schroder HC, Muller WEG. 1992. Production of the cytostatic agent aerophysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 101(1):183-187.
- Krishan A. 1971. Fine structure of cytochalasin-induced multinucleated cells. *Journal of ultrastructure research* 36(1-2):191-204.
- Krohn K, Biele C, Aust HJ, Draeger S, Schulz B. 1999. Herbarulide, a Ketodivinyllactone Steroid with an Unprecedented Homo-6-oxaergostane Skeleton from the Endophytic Fungus *Pleospora herbarum*. *Journal of natural products* 62(4):629-630.
- Krohn K, Biele C, Drogies KH, Steingröver K, Aust HJ, Draeger S, Schulz B. 2002. Fusidilactones, a New Group of Polycyclic Lactones from an Endophyte, *Fusidium* sp. *European Journal of Organic Chemistry* 2002(14):2331-2336.
- Krohn K, Flörke U, John M, Root N, Steingröver K, Aust HJ, Draeger S, Schulz B, Antus S, Simonyi M. 2001. Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron* 57(20):4343-4348.
- Krohn K, Michel A, Bahramsari R, Flörke U, Aust HJ, Draeger S, Schulz B, Wray V. 1996. Biologically Active Metabolites from Fungi 7 1); Aposphaerin A and B Two New

- Chroman-4-ones from *Aposphaeria* sp. Natural Product Research 8(1):43-48.
- König GM, Wright AD, Aust HJ, Draeger S, Schulz B. 1999. Genticulol, a New Biologically Active Diterpene from the Endophytic Fungus *Geniculosporium* sp.. Journal of natural products 62(1):155-157.
- König T, Kapus A, Sarkadi B. 1993. Effects of equisetin on rat liver mitochondria: Evidence for inhibition of substrate anion carriers of the inner membrane. Journal of bioenergetics and biomembranes 25(5):537-545.
- Laessøe T, Lodge DJ. 1994. Three host-specific *Xylaria* species. Mycologia 86(3):436-446.
- Lalk M, Langer P, Albrecht U. 2004. Novel Antimicrobial Chroman-4-ones. Intern. Patent PCT WO 2004/113317 A1, 29.12.2004, Anmeldetag 20.6.2003.
- Lam Y, Hensens O, Ransom R, Giacobbe R, Polishook J, Zink D. 1996. L-755,807, A new non-peptide bradykinin binding inhibitor from an endophytic *Microsphaeropsis* sp. Tetrahedron 52(5):1481-1486.
- Lane GA, Christensen MJ, Miles CO. 2000. Coevolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. Microbial endophytes:341-388.
- Langer P. 2008. 2-Vinylchroman-4-ones as potent antibiotic agents. CHIMICA OGGI 26(1):9.
- Larsen TO, Breinholt J. 1999. Dichlorodiaportin, diaportinol, and diaportinic acid: Three novel isocoumarins from *Penicillium nalgiovense*. Journal of natural products 62(8):1182-1184.
- Larsen TO, Gareis M, Frisvad JC. 2002. Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common penicillia on cheese agar. Journal of agricultural and food chemistry 50(21):6148-6152.
- Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Frisvad JC. 2005. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. Natural product reports 22(6):672-695.
- Lee JS, Ko KS, Jung HS. 2000. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1 5.8 S ITS2 sequences. FEMS microbiology letters 187(1):89-93.
- Lee K, Hayashi N, Okano M, Hall I, Wu R, Mcphail A. 1982. Lasiodiplodin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. Phytochemistry 21(5):1119-1121.
- Lewer P, Graupner PR, Hahn DR, Karr LL, Duebelbeis DO, Lira JM, Anzeveno PB, Stephen C, Gilbert JR, Pearce C. 2006. Discovery, synthesis, and insecticidal activity of cycloaspeptide E. Journal of natural products 69(10):1506-1510.
- Lešová K, Šturdíková M, Rosenberg M. 2000. Factors affecting the production of (-) mitorubrinic acid by *Penicillium funiculosum*. Journal of Basic Microbiology 40(5 6):369-375.
- Li DL, Li XM, Li TG, Dang HY, Proksch P, Wang BG. 2008a. Benzaldehyde derivatives from *Eurotium rubrum*, an endophytic fungus derived from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. Chemical & pharmaceutical bulletin 56(9):1282-1285.
- Li DL, Li XM, Li TG, Dang HY, Wang BG. 2008b. Dioxopiperazine Alkaloids Produced by the Marine Mangrove Derived Endophytic Fungus *Eurotium rubrum*. Helvetica Chimica Acta 91(10):1888-1893.
- Li JY, Sidhu RS, Bollon A, Strobel GA. 1998. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. Mycological Research 102(4):461-464.

- Li LY, Ding Y, Groth I, Menzel K-D, Peschel G, Voigt K, Deng Z-W, Sattler I, Lin W-H. 2008c. Pyrrole and indole alkaloids from an endophytic *Fusarium incarnatum* (HKI00504) isolated from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. Journal of Asian Natural Products Research 10(8):765 - 770.
- Li LY, Ding Y, Groth I, Menzel KD, Peschel G, Voigt K, Deng ZW, Sattler I, Lin WH. 2008d. Pyrrole and indole alkaloids from an endophytic *Fusarium incarnatum* (HKI00504) isolated from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. Journal of Asian natural products research 10(8):765-770.
- Li X, Choi HD, Kang JS, Lee CO, Son BW. 2003. New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyanuthone A and its hydro derivative from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. J. Nat. Prod 66(11):1499-1500.
- Liberra K, Lindequist U. 1995. Marine fungi: a prolific resource of biologically active natural products? Pharmazie 50(9):583-588.
- Linaldeddu B, Sirca C, Spano D, Franceschini A. 2009. Physiological responses of cork oak and holm oak to infection by fungal pathogens involved in oak decline. Forest Pathology 39(4):232-238.
- Lingham RB, Hsu A, SILVERMAN KC, BILLS GF, DOMBROWSKI A, GOLDMAN ME, DARKE PL, Huang L, KOCH G, ONDEYKA JG. 1992. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. III: Biological activity. Journal of antibiotics 45(5):686-691.
- Liu W, Li C, Zhu P, Yang J, Cheng K. 2010. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with two marine sponges: *Haliclona simulans* and *Gelliodes carnosa*, collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. Fungal Diversity 42(1):1-15.
- Locci R, Merlini L, Nasini G, Locci J. 1967. Mitorubrinic acid and related compounds from a strain of *Penicillium funiculosum* Thom. G. Microbiol 15:93–102.
- Lodge DJ, Fisher P, Sutton B. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. Mycologia 88(5):733-738.
- Lopes TIB, Coelho RG, Yoshida NC, Honda NK. 2008. Radical-Scavenging Activity of Orsellinates. Chemical & pharmaceutical bulletin 56(11):1551-1554.
- Lu H, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science 151(1):67-73.
- Luckner M. 1967. Zur Bildung von Chinolinalkaloiden in Pflanzen. European Journal of Biochemistry 2(1):74-78.
- Luckner M. 1980. Alkaloid Biosynthesis in *Penicillium cyclopium* - Does It Reflect General Features of Secondary Metabolism? Journal of Natural Products 43(1):21-40.
- Lumbsch HT, Huhndorf SM. 2007. Outline of Ascomycota–2007. Myconet 13:1-58.
- Lund F, Frisvad JC. 1994. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. Mycological Research 98(5):481-492.
- MacMillan J. 1951. Dechlorogriseofulvin—a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx and *Penicillium Janczewskii* Zal. Chem Ind 719.
- MacMillan J. 1953. 351. Griseofulvin. Part VII. Dechlorogriseofulvin. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1953:1697-1702.

- Maddau L, Perrone C, Andolfi A, Spanu E, Linaldeddu B, Evidente A. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. Forest Pathology.
- Malawista S, Gee J, Bensch K. 1971. Cytochalasin B reversibly inhibits phagocytosis: functional, metabolic, and ultrastructural effects in human blood leukocytes and rabbit alveolar macrophages. The Yale journal of biology and medicine 44(3):286.
- Martini U, Zapp J, Becker H. 1998. Chlorinated macrocyclic bisbibenzyls from the liverwort *Bazzania trilobata*\* 1. Phytochemistry 47(1):89-96.
- Masurekar P. 1992. Therapeutic metabolites. Biotechnology (Reading, Mass.) 21:241.
- Matsuura H, Obara N, Chisaka N, Ichihara A, Yoshihara T. 1998. Novel cyclohexene compound from *Lasiodiplodia theobromae* IFO 31059. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(12):2460-2462.
- Meiler D, Taylor A. 1971. The effect of cochliodinol, a metabolite of *Chaetomium cochliodes*, on the respiration of microspores of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology 17(1):83-86.
- Mhaske SB, Argade NP. 2006. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. Tetrahedron 62(42):9787-9826.
- Miles CO, Di Menna ME, Jacobs SWL, Garthwaite I, Lane GA, Prestidge RA, Marshall SL, Wilkinson HH, Schardl CL, Ball OJP. 1998. Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. Applied and Environmental Microbiology 64(2):601.
- Miranda CCBO, Dekker RFH, Serpeloni JM, Fonseca EAI, Cólus I, Barbosa AM. 2008. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. International Journal of Biological Macromolecules 42(2):172-177.
- Mohali S, Burgess T, Wingfield M. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. Forest Pathology 35(6):385-396.
- Mohamad R, Mohamed MS, Suhaili N, Salleh MM, Ariff AB. 2010. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. Biotechnology and Molecular Biology Reviews 5(2):24-37.
- Morton HE, Kocholaty W, Junowicz-Kocholaty R, Kelner A. 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. Journal of bacteriology 50(5):579.
- Mosbach K. 1960. Die Biosynthese der Orsellinsäure und Penicillinsäure (1). Acta chem. scand 14(2).
- Mullady EL, Millett WP, Yoo HD, Weiskopf AS, Chen J, DiTullio D, Knight-Connoni V, Hughes DE, Pierceall WE. 2004. A phthalide with in vitro growth inhibitory activity from an oidioidendron strain. Journal of natural products 67(12):2086-2089.
- Munk K. 2000. Grundstudium Biologie, Band Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mücke W, Lemmen C. 2004. Schimmelpilze-Vorkommen. Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, Ecomed, Landsberg.
- Mühlbauer A, Triebel D, Persoh D, Wollweber H, Seip S, Stadler M. 2002. Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on

- the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. *Mycological Progress* 1(3): 235-248.
- Müller WEG, Maidhof A, Zahn RK, Schröder HC, Gasi MJ, Heidemann D, Bernd A, Kurelec B, Eich E, Seibert G. 1985. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. *Cancer research* 45(10):4822.
- Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy Y. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiological Research* 164(3):290-296.
- Natsume M, Takahashi Y, Marumo S. 1985. (-)-Mitorubrinic acid, a morphogenic substance inducing chlamydospore-like cells, and its related new metabolite, (+)-mitorubrinic acid B, isolated from *Penicillium funiculosum*. *Agricultural and biological chemistry* 49(8):2517-2519.
- Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual review of phytopathology* 31(1):233-252.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4):479.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66(7):1022-1037.
- Nielsen F. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal genetics and biology* 39(2):103-117.
- Nishitoba Y, Nishimura I, Nishiyama T, Mizutani J. 1987. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 26(12):3181-3185.
- Nosek J, Radzio R, Kück U. 1997. Produktion von  $\beta$ -Lactamantibiotika durch Mikroorganismen. *Chemie in unserer Zeit* 31(4):172-182.
- Nukina M. 1988. Terrestic acid as a phytotoxic metabolite from *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*.
- Ohmomo S, Sato T, Utagawa T, Abe M. 1975. Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agricultural and Biological Chemistry* 39(6):1333-1334.
- Okuno T, Oikawa S, Goto T, Sawai K, Shirahama H, Matsumoto T. 1986. Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and biological chemistry* 50(4):997-1001.
- Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L, Pereira JA. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry* 105(3):1018-1025.
- Osmanova N, Schultze W, Ayoub N. 2010. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*:1-28.
- Ostenfeld Larsen T, Frydenvang K, Christian Frisvad J. 2000. UV-guided screening of benzodiazepine producing species in *Penicillium*. *Biochemical Systematics and Ecology* 28(9):881-886.
- Overy D, Nielsen K, Smedsgaard J. 2005. Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness. *Journal of chemical ecology* 31(10):2373-2390.

- Panda D, Rathinasamy K, Santra MK, Wilson L. 2005. Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(28):9878.
- Park JH, Choi G, Lee HB, Kim K, Jung HS, Lee S, Jang K, Cho K, Kim J. 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(1):112–117.
- Parrish F, Wiley B, Simmons E, Long Jr L. 1966. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* 14(1):139.
- Paz Z, Komon-Zelazowska M, Druzhinina I, Aveskamp M, Shnaiderman A, Aluma Y, Carmeli S, Ilan M, Yarden O. 2010. Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Diversity* 42(1):17-26.
- Pearce C. 1997. Biologically active fungal metabolites. *Advances in applied microbiology* 44:1-80.
- Pereira J, Vieira MLC, Azevedo J. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(1):37-40.
- Pereira J, Azevedo JL, Petrini O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. *Mycologia* 85(3):362-364.
- Perkins DD, Raju NB. 1986. *Neurospora discreta*, a new heterothallic species defined by its crossing behavior. *Experimental mycology* 10(4):323-338.
- Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn: *Biologie der Pflanzen*. 4. Auflage. Gruyter, Berlin, New York 2006. ISBN 978-3-11-018531-7.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial ecology of leaves*:179–197.
- Petrini O, Petrini LE, Rodrigues K. 1995. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatologica Brasiliensis* 20: 531–539.
- Phillips N, Goodwin J, Fraiman A, Cole R, Lynn D. 1989. Characterization of the *Fusarium* toxin equisetin: the use of phenylboronates in structure assignment. *Journal of the American Chemical Society* 111(21):8223-8231.
- Pietra F. 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. *Achievements and prospects. Natural product reports* 14(5):453-464.
- Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Megraud F, Urdaci MC. 2001. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(11):3156.
- Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim Nova* 25:45-61.
- Polishook JD, Dombrowski AW, Tsou NN, Salituro GM, Curotto JE. 1993. Preussomerin D from the endophyte *Hormonema dematioides*. *Mycologia* 85(1):62-64.
- Powell K, Jones D. 1993. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. *Exploitation of microorganisms*.:441-459.
- Prachyawarakorn V, Mahidol C, Sureram S, Sangpetsiripan S, Wiyakrutta S, Ruchirawat S, Kittakoop P. 2008. Diketopiperazines and phthalides from a marine derived fungus of

- the order *Pleosporales*. *Planta medica* 74(1):69.
- Pulici M, Sugawara F, Koshino H, Okada G, Esumi Y, Uzawa J, Yoshida S. 1997. Metabolites of *Pestalotiopsis* spp., endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* 46(2):313-319.
- Pulici M, Sugawara F, Koshino H, Uzawa J, Yoshida S, Lobkovsky E, Clardy J. 1996. Pestalotiopsins A and B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. *The Journal of Organic Chemistry* 61(6):2122-2124.
- Qadeer G, Rama NH, Fan ZJ, Liu B, Liu XF. 2007. Synthesis, herbicidal, fungicidal and insecticidal evaluation of 3-(dichlorophenyl)-isocoumarins and (±)-3-(dichlorophenyl)-3, 4-dihydroisocoumarins. *J. Braz. Chem. Soc* 18(6):1176-1182.
- Quang DN, Hashimoto T, Asakawa Y. 2006. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *The Chemical Record* 6(2):79-99.
- Rakhimov D, Kholmuradova T, Shoyakubov RS. 2006. Polysaccharide accumulation dynamics in *Iris pseudacorus*. *Chemistry of Natural Compounds* 42(3):259-261.
- Rebacz B, Larsen TO, Clausen MH, Rønneest MH, Löffler H, Ho AD, Krämer A. 2007. Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer research* 67(13):6342.
- Rezanka T, Spížek J. 2005. Griseofulvin and other biologically active halogen containing compounds from fungi. *Studies in Natural Products Chemistry* 32:471-547.
- Richard DJ, Schiavi B, Joullié MM. 2004. Synthetic studies of roquefortine C: Synthesis of isoroquefortine C and a heterocycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(33):11971.
- Richardson K, Currah R. 1995. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. La comunidad de hongos asociados con las raíces de algunas epífitas del bosque lluvioso de Costa Rica. *Selbyana*. 16(1):49-73.
- Rodrigues K, Leuchtmann A, Petrini O. 1993. Endophytic species of *Xylaria*: cultural and isozymic studies. *Sydowia* 45(1):116-138.
- Rodrigues KF. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia (USA)*.
- Rodrigues KF, Dias-Filho MB. 1996. Fungal Endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. humidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31:905-909.
- Rodrigues KF, Samuels GJ. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* 94(6):827-830.
- Rodriguez R, Redman R. 1997. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. *Advances in botanical research* 24:169-193.
- Rogers JD. 2000. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research* 104(12):1412-1420.
- Royles B. 1995. Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation, and synthesis. *Chemical Reviews* 95(6):1981-2001.
- Rukmini C, Bhat RV. 1978. Occurrence of T-2 toxin in *Fusarium*-infested sorghum from India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3):647-649.

- Rusman Y. 2007. Isolation of new secondary metabolites from sponge-associated and plant-derived fungi.
- Ryan SD, Harris CS, Mo F, Lee H, Hou ST, Bazan NG, Haddad PS, Arnason JT, Bennett SAL. 2007. Platelet activating factor induced neuronal apoptosis is initiated independently of its G protein coupled PAF receptor and is inhibited by the benzoate orsellinic acid. *Journal of neurochemistry* 103(1):88-97.
- Rønneest MH, Harris P, Gotfredsen CH, Larsen TO, Clausen MH. 2010. Synthesis and single crystal X-ray analysis of two griseofulvin metabolites. *Tetrahedron Letters*.
- Safe S, Taylor A. 1972. Sporidesmins. Part XIII. Ovine III-thrift in Nova Scotia. Part III. The characterisation of chetomin a toxic metabolite of *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium globosum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*:472-479.
- Saito K. 1907. Über die Säurebildung bei *Aspergillus oryzae*. *Japan. J. Botany* 21:7-11.
- Sasaki T, Takagi M, Yaguchi T, Miyadoh S, Okada T, Koyama M. 1992. A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *The Journal of antibiotics* 45(5):692.
- Savarino A. 2007. *In-Silico* docking of HIV-1 integrase inhibitors reveals a novel drug type acting on an enzyme/DNA reaction intermediate. *Retrovirology* 4(1):21.
- Scher JM, Speakman JB, Zapp J, Becker H. 2004. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) SF Gray. *Phytochemistry* 65(18):2583-2588.
- Schlegel HG, Schmidt K. 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. George Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schoch U, Lüthy J, Schlatter C. 1984. Subchronische Toxizitätsprüfung von schimmelgereiften Käsen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 179(2):99-103.
- Schofield J. 1971. Cytochalasin B and release of growth hormone. *Nature* 234(50):215-216.
- Schwantes HO. 1996. *Biologie der Pilze: Eine Einführung in die angewandte Mykologie*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Scott P, Merrien M, Polonsky J. 1976. Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia* 32:140-142.
- Scott PM, Kennedy BPC. 1976. Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(4):865-868.
- Simpson TJ, Holker JSE. 1977. <sup>13</sup>C-NMR studies on griseofulvin biosynthesis and acetate metabolism in *Penicillium patulum*. *Phytochemistry* 16(2):229-233.
- Sims J, Fillmore J, Warner D, Schmidt E. 2005. Equisetin biosynthesis in *Fusarium heterosporum*. *Chemical Communications* 2005(2):186-188.
- Singh S, Zink D, Goetz M, Dombrowski A, Polishook J, Hazuda D. 1998. Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase. *Tetrahedron Letters* 39(16):2243-2246.
- Singh SB, Zink DL, Liesch JM, Ball RG, Goetz MA, Bolessa EA, Giacobbe RA, Silverman KC, Bills GF. 1994. Preussomerins and deoxypreussomerins: novel inhibitors of ras farnesyl-protein transferase. *The Journal of Organic Chemistry* 59(21):6296-6302.
- Sitte P, Weiler E, Kadereit J, Bresinsky A, Körner C. 2002. *Strasburger-Lehrbuch der*

- Botanik, 35. Auflage. Spektrum Heidelberg.
- Sowemimo A, Edrada-Ebel R, Ebel R, Proksch P, Omobuwajo O, Adesanya S. 2008. Major constituents of the predominant endophytic fungi from the nigerian plants *Bryophyllum pinnatum*, *Morinda lucida* and *Jathropha gossypifolia*. *Natural Product Communications* 3(8):1217-1222.
- Sridhar K, Raviraja N. 1995. Endophytes: a crucial issue. *Current science* 69(7):570-571.
- Stadler M, Hellwig V. 2005. Chemotaxonomy of the Xylariaceae and remarkable bioactive compounds from Xylariales and their associated asexual stages. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, Vol. 9:41-93.
- Stahl M, Schopfer U, Frenking G, Hoffmann RW. 1996. Assignment of Relative Configuration to Acyclic Compounds Based on <sup>13</sup>C NMR Shifts. A Density Functional and Molecular Mechanics Study. *The Journal of Organic Chemistry* 61(23):8083-8088.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260(5105):214.
- Stierle DB, Stierle AA, Ganser BK. 1999. Isolation of two highly methylated polyketide derivatives from a yew-associated *Penicillium* species. *Journal of natural products* 62(8):1147-1150.
- Stone JK, Bacon CW, White J. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial endophytes* 3:29-33.
- Strobel G, Ford E, Worapong J, Harper JK, Arif AM, Grant DM, Fung PCW, Ming Wah Chau R. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60(2):179-183.
- Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142(2):435.
- Strobel GA. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical reviews in biotechnology* 22(4):315-333.
- Strobel GA, Long DM. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News* 64(5):263-68.
- Susan JA. 1996. Changing Technologies Help Herbicide Producers Compete In Mature Market. *Chemical & Engineering News* 74(18):35-42.
- Sánchez-Ballesteros J, González V, Salazar O, Acero J, Portal MA, Julián M, Rubio V, Bills GF, Polishook JD, Platas G. 2000. Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia* 92(5):964-977.
- Sørensen J, Aveskamp M, Thrane U, Andersen B. 2010. Chemical characterization of *Phoma pomorum* isolated from Danish maize. *International journal of food microbiology* 136(3):310-317.
- Tang A, Jeewon R, Hyde K. 2009. A re-evaluation of the evolutionary relationships within the Xylariaceae based on ribosomal and protein-coding gene sequences. *Fungal Diversity* 34:127-155.
- Taniguchi M, Satomura Y. 1970. Isolation of viridicatin from *Penicillium crustosum*, and physiological activity of viridicatin and its 3-carboxymethylene derivative. *Agric. Biol. Chem.* 34(4):506-10.
- Tao Y, Zeng X, Mou C, Li J, Cai X, She Z, Zhou S, Lin Y. 2008. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR

- assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). *Magnetic Resonance in Chemistry* 46(5):501-505.
- Taylor A, Walter JA. 1978. Determination of low levels of incorporation of <sup>13</sup>C-labelled precursors. Biosynthesis of the 2, 5-dihydroxycyclohexadiene-1, 4-dione system of cochliodinol. *Phytochemistry* 17(6):1045-1048.
- Teuscher F. 2005. Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Thienhirun S, Whalley A. 2004. Xylariaceae. *Thai Fungal Diversity*:71-77.
- Tringali C. 2001. Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterisation and biological properties. CRC.
- Turner BC, Perkins DD, Fairfield A. 2001. *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal Genetics and Biology* 32(2):67-92.
- Udagawa T, Yuan J, Panigrahy D, Chang YH, Shah J, D'Amato RJ. 2000. Chemotherapy, Antibiotics, and Gene Therapy - Cytochalasin E, an Epoxide Containing *Aspergillus*-Derived Fungal Metabolite, Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294(2):421-427.
- Varanda EA, Raddi MSG, de Luz Dias F, Araujo MCP, Gibran SCA, Takahashi CS, Vilegas W. 1997. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 17(2):85-95.
- Vasconcelos AFD, Monteiro NK, Dekker RFH, Barbosa AM, Carbonero ER, Silveira JLM, Sasaki GL, da Silva R, de Lourdes Corradi da Silva M. 2008. Three exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruits. *Carbohydrate Research* 343(14):2481-2485.
- Vesonder R, Tjarks L, Rohwedder W, Burmeister H, Laugal J. 1979. Equisetin, an antibiotic from *Fusarium equiseti* NRRL 5537, identified as a derivative of N-methyl-2, 4-pyrrolidone. *The Journal of antibiotics* 32(7):759.
- Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Andrei, C. C. 2001. Plantas Inseticidas. In: Simões, C. M. O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. rev. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC.
- Viret O, Petrini O. 1994. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). *Mycological Research* 98(4):423-432.
- Waksman SA, Bugie E. 1944. Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by *Chaetomium cochliodes*: I. Formation and Properties. *Journal of Bacteriology* 48(5):527.
- Wang J, Hsung RP, Ghosh SK. 2004. Stereoselective Ketal-Tethered Intramolecular Diels-Alder Cycloadditions. An Approach to the 2-Oxadecalin Spiroketal Core of Antifungal Agent Fusidilactone C. *Organic Letters* 6(12):1939-1942.
- Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology letters* 193(2):249-253.
- Weber H, Arnold GRW. 1993. *Allgemeine Mykologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.

- Wells JM, Cutler HG, Cole RJ. 1976. Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis* sp. Canadian Journal of Microbiology 22(8):1137-1143.
- Whalley A. 1996. The xylariaceous way of life. Mycological Research 100(8):897-922.
- Whalley A, Edwards R. 1985. *Nummulariella marginata*: its conidial state, secondary metabolites and taxonomic relationships. Transactions of the British Mycological Society 85(3):IN1, 385-390.
- Whalley A, Edwards R. 1995. Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. Canadian journal of botany 73(S1):802-810.
- Whalley A, Edwards R. 1998. The Xylariaceae: A Case Study in Biological and Chemical Diversity. Pure Appl. Chem. 70(11):2123-2133.
- Wheeler M, Stipanovic R, Puckhaber L. 1999. Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. Mycological Research 103(8):967-973.
- Wheeler MH, Stipanovic RD. 1985. Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. Archives of microbiology 142(3):234-241.
- Whyte AC, Gloer JB, Scott JA, Malloch D. 1996. Cercophorins AC: novel antifungal and cytotoxic metabolites from the coprophilous fungus *Cercophora areolata*. Journal of natural products 59(8):765-769.
- Williams J, Wolff J. 1971. Cytochalasin B inhibits thyroid secretion. Biochemical and Biophysical Research Communications 44(2):422-425.
- Williamson B. 1994. Latency and quiescence in survival and success of fungal plant pathogens. Ecology of plant pathogens:187-207.
- Wilson BJ. 1966. Toxins other than aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 30(2):478.
- Wilson D, Carroll G. 1994. Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. Mycologia 86(5):635-647.
- Woodward S, Sultan HY, Barrett DK, Pearce RB. 1993. Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. J Gen Microbiol 139(1):153-159.
- Xuan Q, Bao F, Pan H, Liu A. 2010. Isolating fungal endophyte from *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* and identifying their antibacterial ability. African Journal of Microbiology Research 4(10):1001-1004.
- Yabuta T. 1916. On a new organic acid (kojic acid) formed by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc. Japan 37:1185-1233.
- Yin L, Ohno T, Weichselbaum R, Kharbanda S, Kufe D. 2001. The Novel Isocoumarin 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) Propionic Acid (NM-3) Induces Lethality of Human Carcinoma Cells by Generation of Reactive Oxygen Species. Molecular Cancer Therapeutics 1(1):43.
- Yongcheng L, Jun W, Shining Z, EB GJ. 2001. New isocoumarins from the mangrove endophytic fungus 2533. Chem. J. Internet 3(7):30-33.
- Yoshida T, Kato T, Kawamura Y, Matsumoto K, Itazaki H. 1993 Aldose reductase inhibitors manufacture with *Chaetomella*. Eur. Pat. Appl., EP 1993-102793

- Yoshikawa K, Kokudo N, Hashimoto T, Yamamoto K, Inose T, Kimura T. 2010. Novel Phthalide Compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A—C, Exhibiting Anti-cancer Related Activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* 33(8):1355-1359.
- Yun SH, Berbee ML, Yoder O, Turgeon BG. 1999. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10):5592.
- Zain M. 2010. Biochemical Markers in Taxonomy of the Genus *Fusarium*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 6(1):1-7.
- Zhang F, Liu S, Lu X, Guo L, Zhang H, Che Y. 2009. Allenyl and Alkynyl Phenyl Ethers from the Endolichenic Fungus *Neurospora terricola*. *Journal of natural products* 72(10):1782-1785.
- Zhang W, Krohn K, Draeger S, Schulz B. 2008. Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of natural products* 71(6):1078-1081.
- Zhu J, Porco Jr JA. 2006. Asymmetric Syntheses of (-)-Mitorubrin and Related Azaphilone Natural Products. *Organic Letters* 8(22):5169-5171.

---

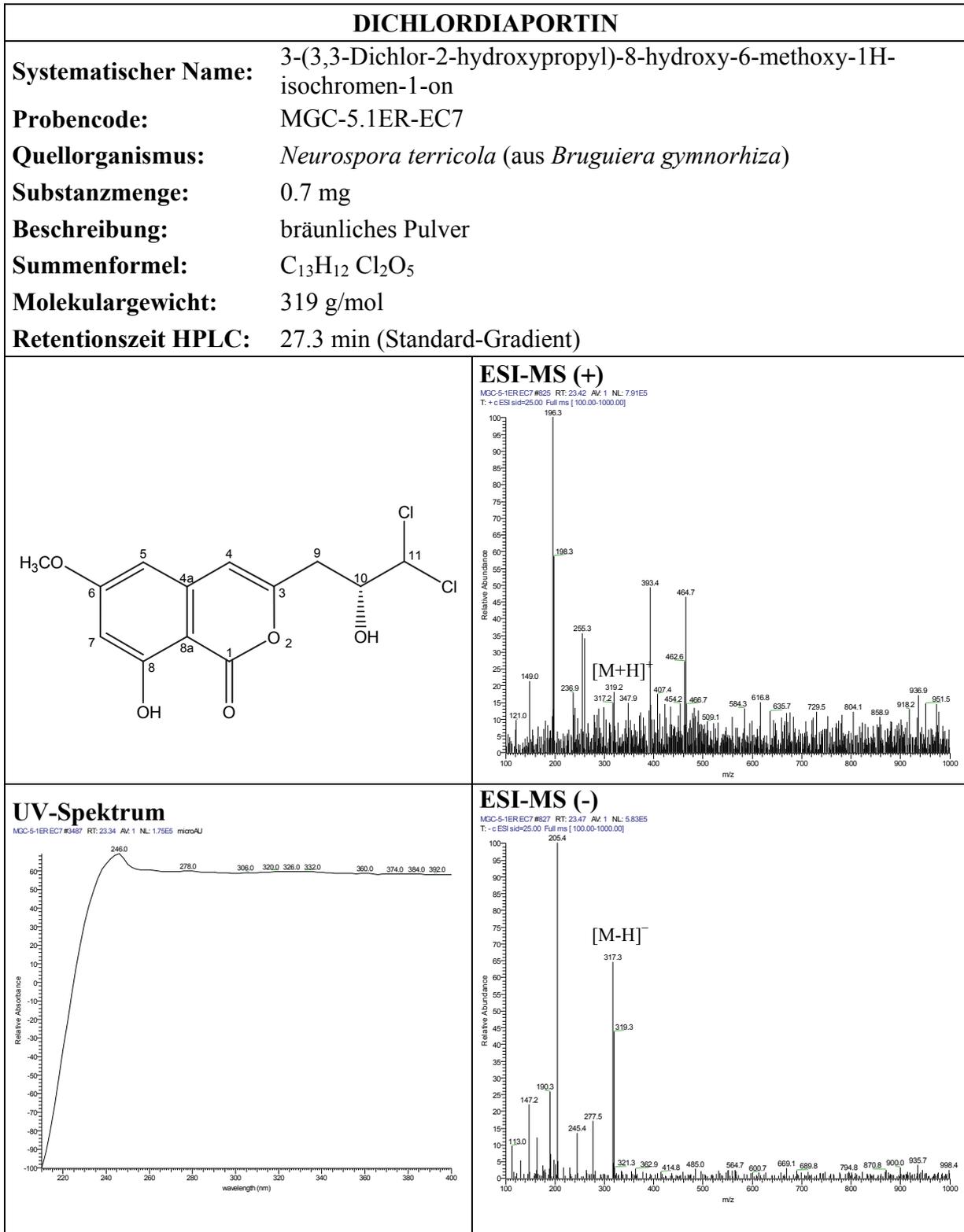
**7. Abkürzungen**

Abb	Abbildung
amu	Atomic Mass Unit
b	breites NMR- Signal
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy (meist H-H-COSY)
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EI	Electron Impact Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
FPLC	Flüssig/Flüssigverteilungschromatographie
h	Stunde
g	Gramm
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Coherence
HMQC	Hetero Multinuclear Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-DAD	HPLC mit Diodenarray-Detektor

HPLC-UV	HPLC mit UV-Detektor
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration (bei halbmaximaler Wirkung)
l	Liter
LC	Tödlicher Konzentration (Lethal Concentration)
LC-MS	HPLC mit Massendetektor
m	Multipllett
M	Molar
MeOH	Methanol
MHz	Mega Hertz
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ml	milliliter
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Wasserstoffionen-Exponent
ppm	parts per million
q	Quartett

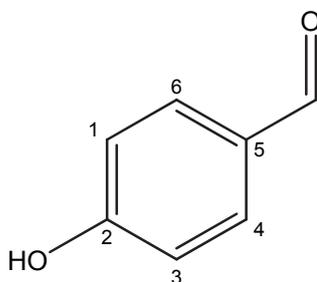
s	Singulett
t	Triplett
Tab	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vgl	Vergleich
VLC	Vakuum-Flüssigchromatographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

## 8. Anhang

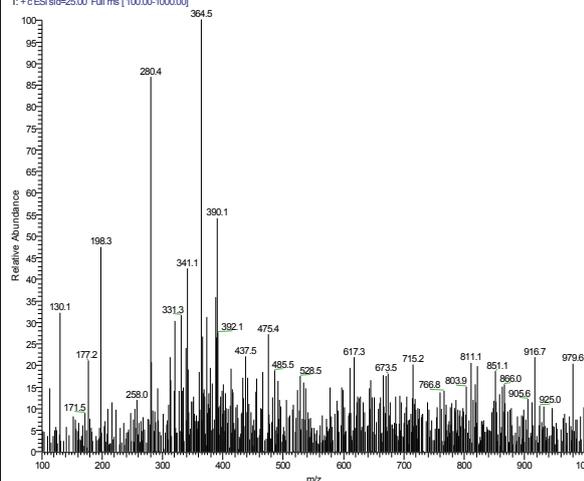


**p-HYDROXYBENZALDEHYD**

<b>Systematischer Name:</b>	4-Hydroxybenzaldehyd
<b>Probencode:</b>	MGC-5.1ER-EC13
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora terricola</i> (aus <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	0.8 mg
<b>Beschreibung:</b>	weiße Kristalle
<b>Summenformel:</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht:</b>	122 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	14.0 min (Standard-Gradient)

**ESI-MS (+)**

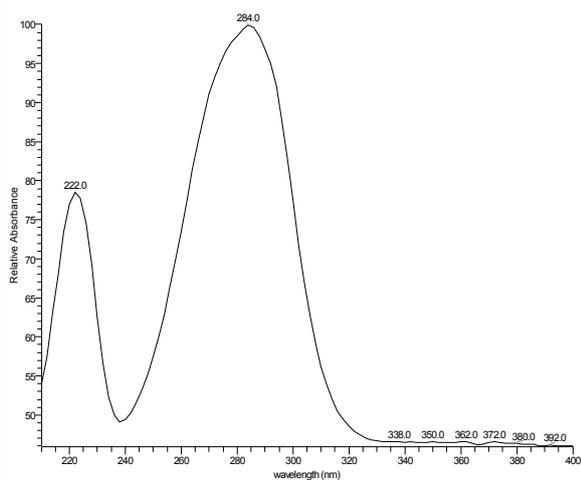
MGC-92EM/HP4 #232 RT: 7.37 AV: 1 NL: 1.59E5  
T: + c ESI s/d=25.00 Full ms [100.00-1000.00]



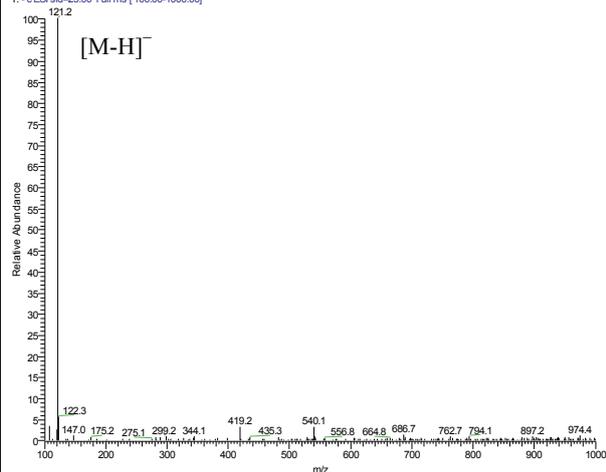
\*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden

**UV-Spektrum**

deca211 #1445 RT: 9.88 AV: 1 NL: 2.22E5 microAU

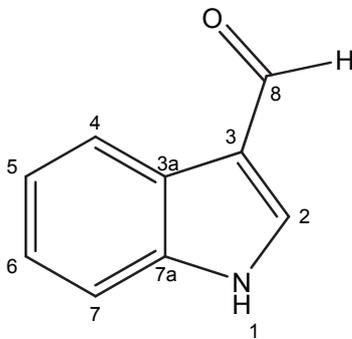
**ESI-MS (-)**

deca211 #344 RT: 9.84 AV: 1 NL: 1.86E6  
T: - c ESI s/d=25.00 Full ms [100.00-1000.00]



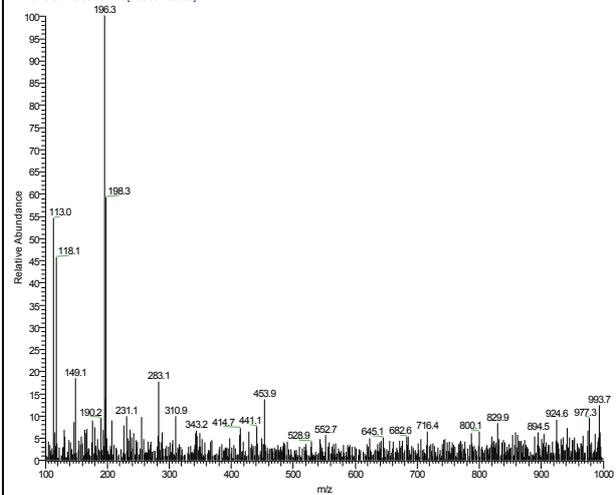
## INDOL-3-CARBALDEHYD

<b>Systematischer Name:</b>	1H-Indol-3-carbaldehyd
<b>Probencode:</b>	MGC-5.1ER-EC10
<b>Quellorganismus:</b>	<i>Neurospora terricola</i> (aus <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )
<b>Substanzmenge:</b>	2.2 mg
<b>Beschreibung:</b>	gelbliches Öl
<b>Summenformel:</b>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> ONO
<b>Molekulargewicht:</b>	145 g/mol
<b>Retentionszeit HPLC:</b>	14.7 min (Standard-Gradient)



### ESI-MS (+)

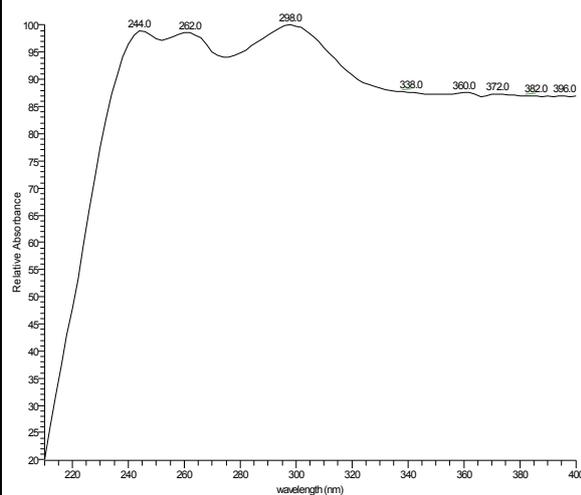
MGC-5.1ER-EC10 #507 RT: 14.43 Av. 1 NL: 1.34E5  
T: + c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]



\*Im positiven Modus konnte keine Ionisation erzielt werden

### UV-Spektrum

deda210 #2169 RT: 14.71 Av. 1 NL: 1.17E5 microAU



### ESI-MS (-)

deda210 #513 RT: 14.58 Av. 1 NL: 1.90E6  
T: - c ESI sid=25.00 Full ms [ 100.00-1000.00]

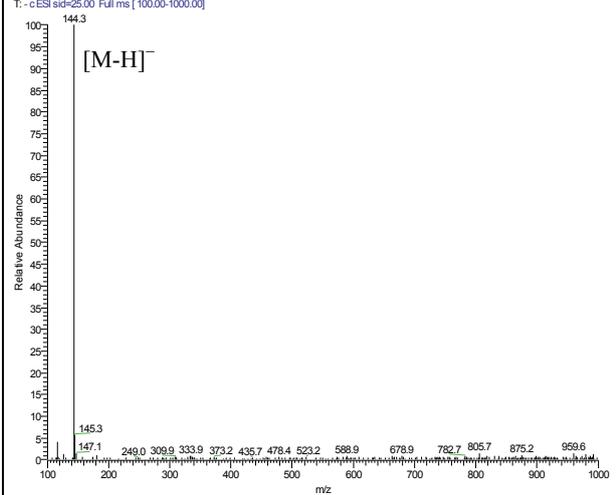
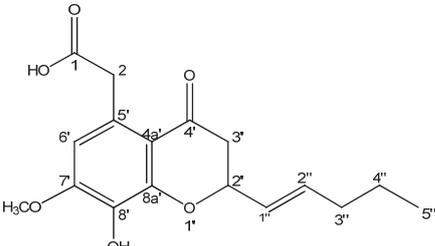
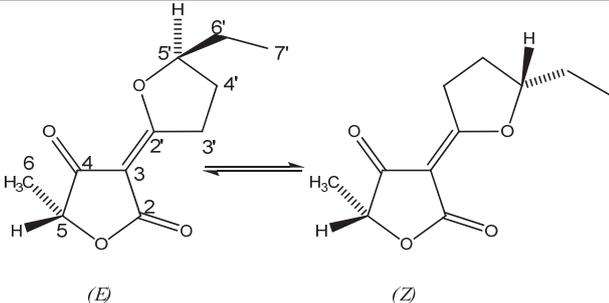
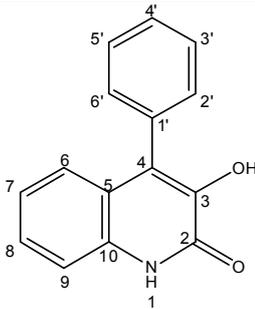
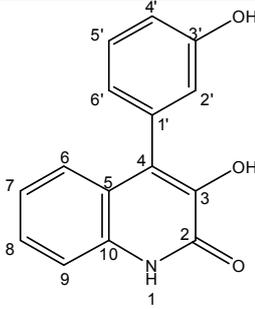
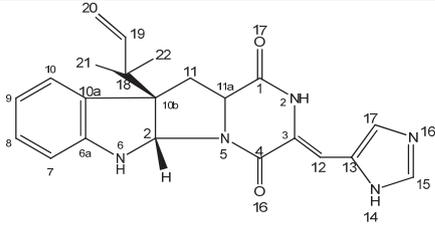
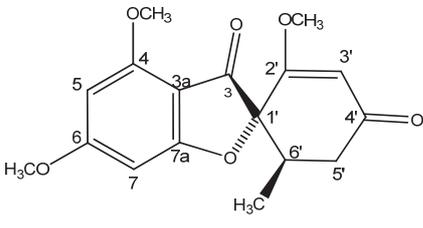
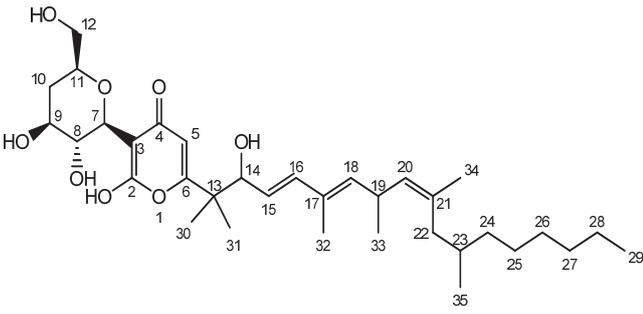
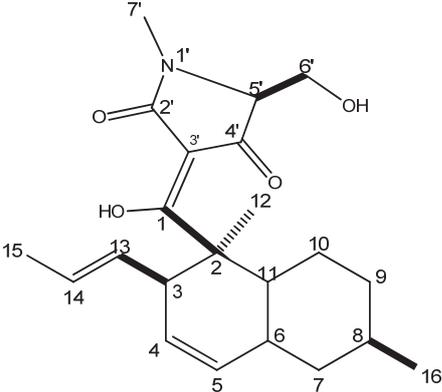
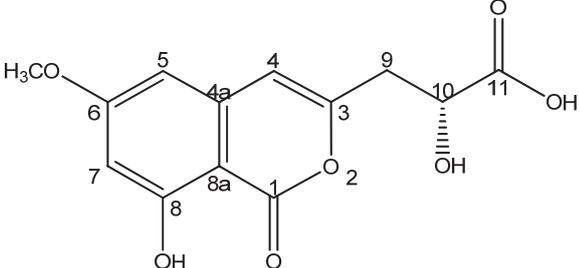
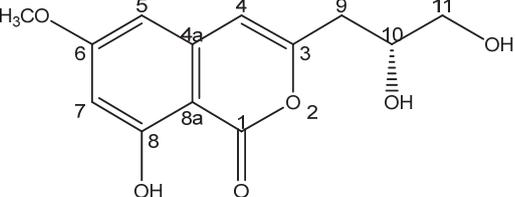
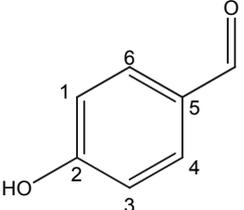
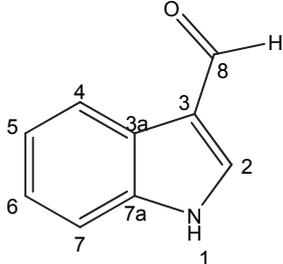
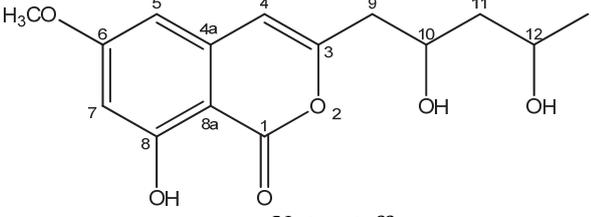
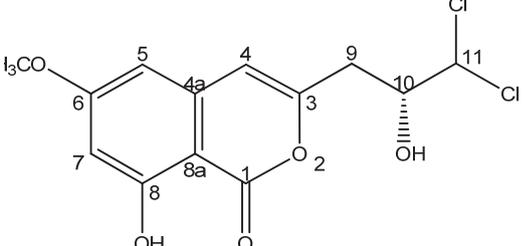
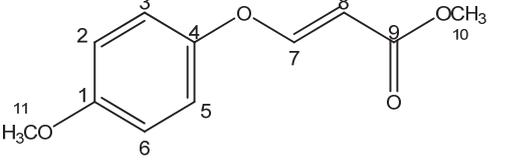
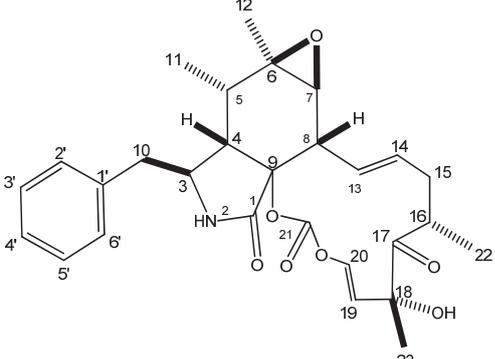
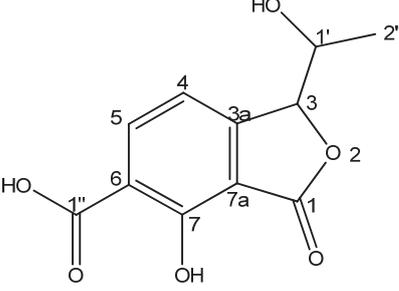
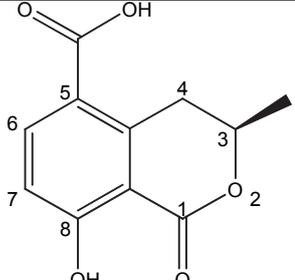


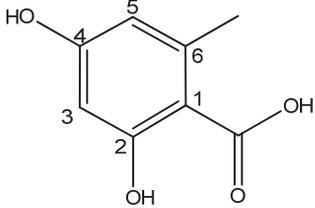
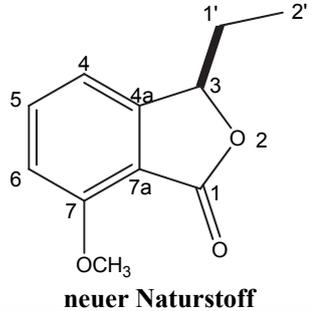
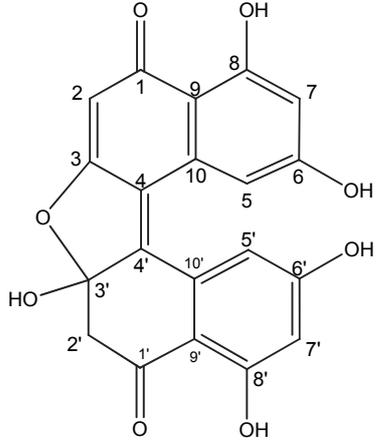
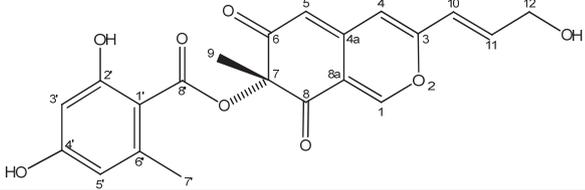
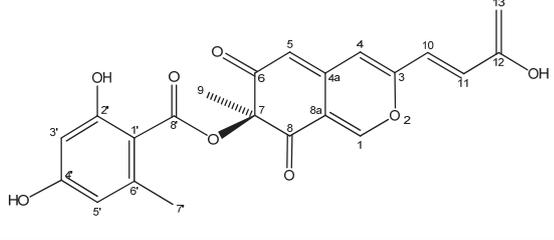
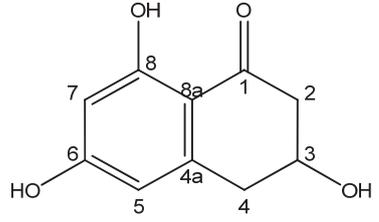
Tabelle 49. Im Rahme dieser Arbeit isolierte bzw. identifizierte Reinsubstanzen

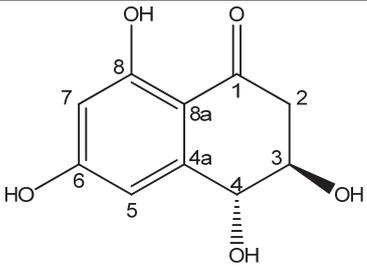
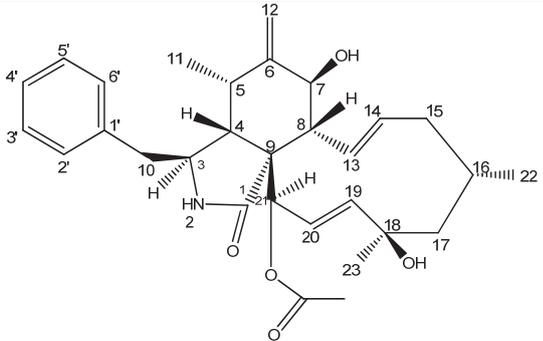
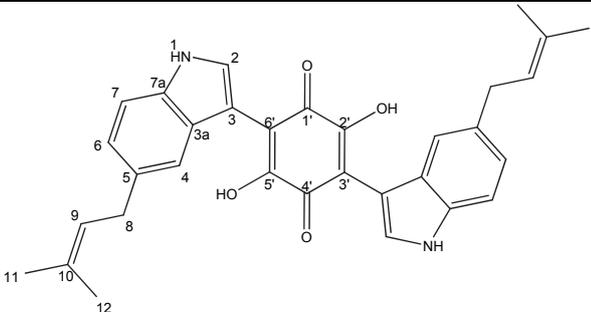
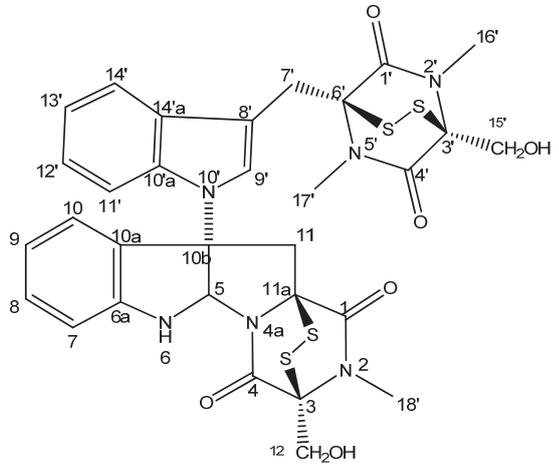
Substanz	Struktur	Herkunft Summenformel Molekulargewicht
AOSPHAERIN A		<i>Pleurophoma cava</i> $C_{17}H_{20}O_6$ MW 320
TERRESTRINSÄURE		<i>Penicillium chrysogenum</i> $C_{11}H_{14}O_4$ MW 210
VIRIDICATIN		<i>Penicillium chrysogenum</i> $C_{15}H_{11}NO_2$ MW 237
VIRIDICATOL		<i>Penicillium chrysogenum</i> $C_{15}H_{11}NO_3$ MW 253
ROQUEFORTIN C		<i>Penicillium chrysogenum</i> $C_{22}H_{23}N_5O_2$ MW 389
DECHLOR-GRISEOFULVIN		<i>Botryosphaeria rhodina</i> $C_{17}H_{18}O_6$ MW 318

<p>GRISEOFULVIN</p>		<p><i>Botryosphaeria rhodina</i> C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>6</sub> MW 352</p>
<p>SCLEROTIGENIN</p>		<p><i>Botryosphaeria rhodina</i> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> MW 277</p>
<p>CYCLOASPEPTID A</p>		<p><i>Botryosphaeria rhodina</i> C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O MW 641</p>
<p>KOJISÄURE</p>		<p><i>Neurospora discreta</i> C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> MW 142</p>
<p>FUSAPYRON</p>		<p><i>Fusarium incarnatum</i> C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>O<sub>9</sub> MW 606</p>

DESOXYFUSAPYRON		<i>Fusarium incarnatum</i> $C_{34}H_{54}O_8$ MW 590
EQUISETIN		<i>Fusarium incarnatum</i> $C_{22}H_{31}NO_4$ MW 373
DIAPORTINSÄURE		<i>Neurospora terricola</i> $C_{13}H_{12}O_7$ MW 280
DIAPORTINOL		<i>Neurospora terricola</i> $C_{13}H_{14}O_6$ MW 266
p-HYDROXY-BENZALDEHYDE		<i>Neurospora terricola</i> $C_7H_6O_2$ MW 120
INDOL-3-CARBOXALDEHYDE		<i>Neurospora terricola</i> $C_9H_7NO$ MW 145

<p><b>8-HYDROXY-3-(2,4-DIHYDROXPENTYL)-6-METHOXYISCHROMEN-1-ON</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>neuer Naturstoff</b></p>	<p><i>Neurospora terricola</i> C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> MW 294</p>
<p>DICHLORDIAPORTIN</p>		<p><i>Neurospora terricola</i> C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>5</sub> MW 319</p>
<p>(E)-METHYL-3-(4-METHOXY-PHENOXY)PROPENOAT</p>		<p><i>Xylaria</i> sp. C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> MW 208</p>
<p>CYTOCHALASIN E</p>		<p><i>Xylaria</i> sp. C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub> MW 495</p>
<p><b>1,3-DIHYDRO-4-HYDROXY-1-(1-HYDROXYETHYL)-3-OXISOBENZOFURAN-5-CARBOXYLSÄURE</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>neuer Naturstoff</b></p>	<p><i>Xylaria</i> sp. C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> MW 238</p>
<p>5-CARBOXYMELLEIN</p>		<p><i>Xylaria</i> sp. C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> MW 222</p>

ORSELLINSÄURE		<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_8H_8NO_4$ MW 168
3-ETHYL-7-METHOXY-1,3-DIHYDRO-2-BENZOFURAN-1-ON	 <p style="text-align: center;"><b>neuer Naturstoff</b></p>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{11}H_{12}O_3$ MW 192
RF-3192-C		<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{20}H_{12}O_8$ MW 380
MITORUBRINOL		<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{21}H_{18}O_8$ MW 398
MITORUBRINSÄURE		<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{21}H_{16}O_9$ MW 412
SCYTALON		<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{10}H_{10}O_4$ MW 194

4-HYDROXYSCYTALON	 <p>The structure shows a bicyclic system consisting of a benzene ring fused to a six-membered ring. The benzene ring has hydroxyl groups at positions 5 and 6. The six-membered ring has a carbonyl group at position 1, a hydroxyl group at position 3, and a hydroxyl group at position 4. The numbering is as follows: 1 (C=O), 2, 3 (OH), 4 (OH), 4a, 5, 6 (OH), 7, 8 (OH), 8a.</p>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{10}H_{10}O_5$ MW 210
CYTOCHALASIN H	 <p>The structure is a complex polycyclic molecule. It features a central bicyclic core with a lactone ring and a side chain containing a double bond and a hydroxyl group. The numbering is extensive, covering 23 positions across the various rings and substituents.</p>	<i>Hypoxylon fragiforme</i> $C_{30}H_{39}NO_5$ MW 493
COCHLIODINOL	 <p>The structure consists of a central bicyclic core with a lactone ring and a side chain containing a double bond and a hydroxyl group. The numbering is as follows: 1 (NH), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7a, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23.</p>	<i>Eurotium rubrum</i> $C_{32}H_{30}N_2O_4$ MW 506
CHAETOMIN	 <p>The structure is a complex polycyclic molecule with multiple rings, including a benzene ring, a lactone ring, and a side chain containing a double bond and a hydroxyl group. The numbering is as follows: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 (CH<sub>2</sub>OH), 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32.</p>	<i>Eurotium rubrum</i> $C_{31}H_{30}N_6O_6S_4$ MW 710

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und für die vielen netten Stunden in der Kaffeepause sowie in den zahlreichen Feierlichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. Rainer Ebel für die Unterstützung meiner Arbeit über die Zeit und am Ende auch die räumlichen Distanz, seine kompetente Hilfe unter anderem bei Fragen der Strukturaufklärung sowie die sorgfältige Korrekturlesen der Dissertation. Dr. RuAngelie Edrada-Ebel für die Einführung in die NMR-Grundlange und in die Bioaktivitätstests sowie für ihre stets freundliche, kompetente Hilfsbereitschaft. Den Beiden darüber hinaus für die Einführung in die Weihnachtsbäckerei.

Meinen Freundinnen Dr. Franka Teuscher und Dr. Nadine Caroline Küppers, die mich selbst aus der Ferne mit liebevollen Wörtern und viel „SMSen“ stets aufgemuntert haben, weiter zu machen. Franka für die intensive Einarbeitung in meiner Anfangsphase am Institut und dass sie mir das „Rosinenpicken“ beigebracht hast. Nadine für die wohltuenden Kaffeepausen und die lustigen Spanischstunden.

Meinen Laborkollegen: Dr. Mohammed Ashour für die hilfreiche Tipps und Tricks, welche die Laborarbeit häufig erleichtert haben. Dr. Frank Riebe für die ruhige und freundliche Zeit im Labor während der letzten Phase meiner Arbeit.

Den Mitgliedern der „Pilzgruppe“ Dr. Abdessamad Debbab, Dr. Amal Hassan, Dr. Arnulf Diesel, Dr. Franka Teuscher, Dr. Ine Dewi Indriani, Dr. Julia Kjer und Dr. Yudi Rusman für die gute Zusammenarbeit und anregende Diskussionen. Dr. Ine Dewi Indriani und Dr. Arnulf Diesel für die molekularbiologische Identifizierung der Pilzstämme.

Meinen Mitstreitern im Institut: Dr. Annika Putz, Dr. Anke Schnittker, Dr. Ashraf Hamed, Dr. Bärbel Hiort, Dr. Bimbo Sowemimo, Dr. Carsten Thoms, Dr. Gernot Brauers, Dr. Gero Eck, Dr. Hefni Effendi, Dr. Mostafa Abdelgawwad, Dr. Nadine Küppers, Dr. Sabrin Ibrahim, Dr. Sherif Ebada, Dr. Sofia Ortlepp, Dr. Suwigarn Pedpradab, Dr. Triana Hertiani, Dr. Tu Ngoc Duong, Dr. Wafaa Hassan, Dr. Yao Wang, Dr. Yasman, Dr. Yosi Bayu Murti, Dr. Yudi Rusman, Dr. Ziyad Baker, Edi Wahyu Sri Mulyono für die gute Zusammenarbeit und die bereichernde multikulturelle Atmosphäre.

Mareike Thiel sowie ihrer Nachfolgerin Claudia Eckelskemper für die schnelle und professionelle Lösung aller Art von administrativen und organisatorischen Problemen.

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

Prof. Dr. Jörg Richard für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und kompetenten Korrekturleistungen bei aller Fragen der deutschen Grammatik und Rechtschreibung.

Herrn Dr. W. Peters und den Mitarbeitern des NMR-Service des Institutes für Anorganische und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf für die Durchführung zahlreicher Messungen. Herrn Dr. Victor Wray vom GBF in Braunschweig für NMR- und HRMS-Messungen und Hilfestellungen bei der Strukturaufklärung.

Herrn Dr. H. Keck und Herrn Dr. P. Thommes aus dem MS-Service des Institutes für Anorganische und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf für die Aufnahme vieler Massenspektren.

Prof. W.E.G. Müller und seiner Mitarbeiterin Frau Renate Steffen vom Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz für die Durchführung der Zytotoxizitätstests. Herrn Dr. Michael Kubbutat, Firma ProQinase GmbH in Freiburg, für die Durchführung der Proteinkinase Assays.

Der Hans-Böckler-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines dreijährigen Promotionstipendiums.

Von ganzem Herzen danke ich meiner deutscher Familie, insbesondere meinen Schwiegereltern Sigrid und Willi, sowie Birgit, Heinz-Hermann und Onkel Horst, die mich von Anfang an mit offenen Armen aufgenommen haben und mir ein Zuhause in der Fremde verschafft haben.

Meiner Mutter für alle Opfer, die sie im Leben erbringen musste, um mir den Weg bis hierhin ermöglichen zu können. Ich danke Dir für Deine Kraft.

Meinem kleinen Schatz, Jasmin, der insbesondere bei dem Endspurt verständnisvoll den Ausfall vom Spiel und Spaß mit der Mama akzeptiert hat.

Meinem Mann Jörg für seinen Rückhalt, seine Geduld, sein Verständnis und vor allem seine Liebe. Vielen lieben Dank, dass Du für mich da bist!

**10. Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

## **11. Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Bioaktive Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen – Isolierung, Strukturaufklärung und Charakterisierung der biologischen Aktivität –“ 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 14.06.2011

Clécia Maria Freitas Richard