

# Isolierung und Strukturaufklärung von neuen Naturstoffen aus schwamm-assoziierten Pilzen

- **Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres sowie des Indopazifiks** -

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

vorgelegt von  
Gernot Brauers  
aus Viersen

Düsseldorf, 2003

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

Referent: Prof. Dr. P. Proksch

Koreferent: Prof. Dr. A. W. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.04

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn

**Prof. Dr. P. Proksch**

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

Bei Herrn Prof. Dr. P. Proksch möchte ich mich sehr herzlich für das sehr interessante und vielseitige Thema bedanken. Ganz großen Dank auch für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn **Prof. Dr. A. W. Alfermann** möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

---

## 1. Einleitung

---

1.1. Bedeutung von marinen Sekundärstoffen und Bedeutungszuwachs von Sekundärstoffen aus marinen Lebensräumen	1
1.2. Aktive marine Naturstoffe, Naturstoffe als Molecular Tools	3
1.3. Problematik mariner Naturstoffe	7
1.4. Marine Mikroorganismen als Quelle neuer Sekundärstoffe	9
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	11

## 2. Material und Methoden

---

2.1. Material	14
2.1.1. Isolierung von Pilzen aus Schwämmen	14
2.1.2. Gewinnung von Reinkulturen und Anlage von Standkulturen	15
2.1.3. Extraktion der Standkulturen	15
2.1.4. Extraktion der Standkulturen	16
2.1.4.1. Zusammensetzung der verwendeten Medien	16
2.1.4.2. Verwendete Nährmedien für die Standkulturen	17
2.1.5. Taxonomie der untersuchten Pilze sowie ihrer Schwämme	18
2.1.5.1. Taxonomie der untersuchten marinen Pilze	18
2.1.5.2. Taxonomie der Schwämme, aus denen Pilze isoliert wurden	21
2.1.6. Vorstellung der untersuchten Pilzarten	21
2.1.6.1. <i>Microsphaeropsis</i> sp.	21
2.1.6.2. <i>Hortaea werneckii</i>	23
2.1.6.3. <i>Cladosporium herbarum</i>	23
2.1.6.4. <i>Phomopsis</i> sp.	25
2.1.6.5. <i>Penicillium citreonigrum</i>	26
2.2. Verwendete Chemikalien	28
2.3. Chromatographie	29
2.3.1. Verwendete Fertigplatten und Säulen	29
2.3.2. HPLC-Fliessmittel	29
2.3.3. LC-MS Fliessmittel	29
2.4. Geräte	30
2.5. HPLC-Anlagen	31
2.5.1. LC-MS	31
2.6. Chromatographische Methoden	32
2.6.1. Dünnschichtchromatographie	32
2.6.2. Säulenchromatographie	32
2.6.3. Semipräperative HPLC	33
2.6.4. HPLC	34

2.7. Identifizierung der Sekundärstoffe	35
2.7.1. UV/Vis -Spektroskopie	35
2.7.2. Massenspektrometrie	35
2.7.3. NMR	36
2.8. Biologische Aktivität	37
2.8.1. Untersuchungen an <i>Spodoptera littoralis</i>	37
2.8.1.1. Kulturbedingungen und Nahrung	37
2.8.1.2. Herstellung der künstlichen Nahrung	38
2.8.1.3. Fraßversuche	39
2.8.2. Antibiotische und fungizide Aktivität	39
2.8.2.1. Kulturmedien	40
2.8.3. Untersuchungen mit <i>Artemia salina</i>	41
2.8.4. Zytotoxizitätstest	42

### **3. Ergebnisse** 43

---

3.1. Bearbeitete Pilzstämmen	43
3.1.1. Screenintests isolierter schwamm-assoziiierter Pilze	44
3.1.1.1. Screeningtest auf insektizide Aktivität	44
3.1.1.2. Screeningtest auf antibiotische Aktivität	46
3.1.1.3. Ergebnisse des „brine shrimp assays“	47
3.1.2. Auswahl von Pilzstämmen zur Isolierung von Sekundärstoffen	49
3.2. Isolierung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen	49
3.2.1. Isolierung und identifizierung der Inhaltsstoffe aus <i>Microsphaeropsis</i> sp.	50
3.2.1.1. Betaenone und Anthrachinone aus <i>Microsphaeropsis</i> sp.	50
3.2.2. Strukturaufklärung der Substanzen aus <i>Hortaea werneckii</i>	58
3.2.3. Isolierung und Identifizierung von Sekundärstoffen aus <i>Cladosporium herbarum</i>	64
3.2.3.1. Pyrone aus <i>Cladosporium herbarum</i>	64
3.2.3.2. Biologische Aktivität der aus <i>Cladosporium herbarum</i> isolierten Naturstoffe	79
3.2.4. Isolierung und Identifizierung der Sekundärstoffe aus <i>Phomopsis</i> sp.	81
3.2.4.1. Biologische Aktivität des aus <i>Phoma</i> sp. isolierten Ascochlorins	86
3.2.5. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanzen aus <i>Penicillium citreonigrum</i>	87
3.2.5.1. Strukturaufklärung von Vermistatin	87
3.2.5.2. Bioaktivität von Vermistatin	91
3.2.5.3. Strukturaufklärung von Alternariol	92
3.2.5.4. Aktivität von Alternariol	95
3.2.5.5. Strukturaufklärung von Desoxyfunicon	96
3.2.5.6. Biologische Aktivität von Desoxyfunicon	98
3.2.5.7. Strukturaufklärung von (-)-Mitorubrin	99
3.2.5.8. Biologische Aktivität von Mitorubrin	103
3.2.5.9. Strukturaufklärung von PAI 1-5	104
3.2.5.10. Biologische Aktivität von PAI 1-5	107
3.2.5.11. Strukturaufklärung von PAI 1-6	107

3.2.5.12. Biologische Aktivität von PAI 1-6	116
3.2.5.13. Strukturaufklärung von PAI 1-8	117
3.2.5.14. Biologische Aktivität von PAI 1-8	123
3.3. Vergleich schwamm-assoziiertes Pilze von verschiedenen Standorten	124
3.3.1. Vergleich des Inhaltsstoffmusters von <i>Cladosporium herbarum</i> verschiedener Standorte	124
3.3.2. Vergleich der Inhaltsstoffmuster von <i>Penicillium citreonigrum</i> verschiedener Standorte	127

## **4. Diskussion**

---

4.1. Sind Schwämme eine günstige Quelle für marine Pilze?	129
4.2. Sind Pilze die Produzenten oder Mitproduzenten von Naturstoffen aus Schwämmen?	131
4.3. Strategie bei der Suche nach neuen Naturstoffen	132
4.4. Sind marine Pilze eine lohnende Quelle neuer Naturstoffe? Welche Art von Naturstoffen sind in marinen Pilzen zu erwarten?	133
4.4.1. Anthrachinone und Betaenonderivate aus <i>Microsphaeropsis</i> sp.	134
4.4.2. Hortein aus <i>Hortaea werneckii</i>	136
4.4.3. Inhaltsstoffe aus <i>Cladosporium herbarum</i>	138
4.4.4. Ascochlorin aus <i>Phomopsis</i> sp.	141
4.4.5. Inhaltsstoffe aus <i>Penicillium citreonigrum</i>	143
4.5. Inhaltsstoffmuster mariner Pilze: Probleme und Chancen bei einer großen Variabilität	151

## **5. Zusammenfassung**

---

## **6. Literaturverzeichnis**

---

## **7. Anhang**

---

## **8. Abkürzungen**

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung von marinen Sekundärstoffen und Bedeutungszuwachs von Sekundärstoffen aus marinen Lebensräumen

Naturstoffe haben schon seit der frühesten Menschheitsgeschichte eine große Bedeutung bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten gehabt. Eine Zeitlang drohten Naturstoffe durch die modernen synthetischen Möglichkeiten und die kombinatorische Chemie stark an Bedeutung zu verlieren. Aber trotz vieler synthetischer Verbindungen sind Naturstoffe nach wie vor aus der Wirkstoffforschung nicht wegzudenken. Gerade unter dem Aspekt, dass viele Krankheiten immer noch nicht effektiv bekämpft werden können, erwartet man, mit Naturstoffen Fortschritte erzielen zu können; stellen sie doch oft wichtige Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Hinzu kommt die steigende Beliebtheit von Naturstoffen beim Verbraucher in den letzten Jahren, auch wenn hier viele Verbraucher häufig von der falschen Annahme ausgehen, dass Naturstoffe im Gegensatz zu synthetischen Mitteln gesünder seien und keine Nebenwirkungen hervorrufen würden.

So fand man 1998 unter den 20 meistverkauften Arzneimitteln 10, deren Ursprung in Naturstoffen lag [Lawrence, 1999]. Dabei wird bei Arzneimitteln aus Naturstoffen zwischen solchen Mitteln unterschieden, die sich direkt aus Naturstoffen ableiten lassen, solchen, die aus Naturstoffen partialsynthetisch hergestellt werden und solchen, die synthetisch hergestellt werden, aber deren Ursprung in einem Naturstoff zu suchen ist [Cragg *et al.*, 1997]. Im Jahr 2000 lag der Umsatz von Arzneimitteln, die sich von Naturstoffen ableiten lassen oder bei denen es sich um Naturstoffe handelt, bei 80 Milliarden US Dollar weltweit [Müller *et al.*, 2000].

Bei der Untersuchung von Naturstoffen konzentrierten sich die Forschungen lange Zeit auf Pflanzeninhaltsstoffe. Aus dem Pflanzenreich waren in der Volksheilkunde schon viele Arten bekannt, die bei bestimmten Erkrankungen erfolgreich eingesetzt wurden. Später, als mehr über die Mikroflora und Fauna bekannt wurde und durch die Entwicklung neuer Geräte mit Kleinstorganismen gearbeitet werden konnte,

beschäftigte sich die Forschung auch verstärkt mit Inhaltsstoffen aus Bakterien und Pilzen aus verschiedenen terrestrischen Habitaten.

Naturstoffe aus marinen Lebewesen spielten lange Zeit kaum eine Rolle, unter anderem weil kulturhistorisch kaum Anwendungen von marinen Organismen in der Heilkunde bekannt waren und weil das Sammeln mariner Organismen im Vergleich zu Pflanzen mit hohem Aufwand verbunden war. Erst mit der Entdeckung von Spongouridin (Abb. 1) und Spongothymidin (Abb. 1) aus dem Schwamm *Cryptotethia crypta* durch Bergmann und Feeney (1951) wurde verstärktes Interesse an Naturstoffen aus dem marinen Lebensraum geweckt.

Mit der Isolierung von Prostaglandinderivaten durch Weinheimer und Spraggins (1969) aus der karibischen Hornkoralle *Plexaura homomalla* erkannte man das Potential von marinen Organismen als Quelle bis dahin nicht bekannter Naturstoffe. Seitdem wurden viele Organismen aus marinen Habitaten auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht, mit dem Ziel, neue aktive Wirkstoffe mit einem Nutzen für den Menschen zu finden. Mittlerweile hat das National Cancer Institute (NCI) der USA in einem breit angelegten Screening Programm mehrere tausend Arten mariner Organismen, insbesondere mariner Invertebraten, auf Inhaltsstoffe mit einer Antitumor- oder Anti-HIV-Wirkung hin untersucht. Bei der Untersuchung von marinen Organismen zeigte sich, dass aktive Verbindungen besonders in sessilen Organismen oder solchen, die sich nur langsam fortbewegen, zu finden sind. Zu dieser Gruppe von Organismen gehören besonders Invertebraten. Diese Häufung von interessanten sekundären Verbindungen in dieser Organismengruppe erklärt man sich unter anderem mit der meist geringen oder nicht vorhandenen Mobilität der Organismen. Eine Flucht vor Fraßfeinden ist ihnen nicht möglich. Im Verlauf der Evolution entwickelten diese Organismen so, da eine Tarnung oft auch nicht ausreichte, um sich ihren Feinden zu entziehen, häufig eine chemische Verteidigung durch Anreicherung verschiedenster Sekundärstoffe.

Diese sind in einigen Fällen aber auch für die Menschen aufgrund ihres Wirkpotentials sehr interessant. Bis 2002 wurden mehr als 17000 Substanzen aus den unterschiedlichsten marinen Organismen beschrieben [Marinlit, Dezember 2003].

Interessant wurden marine Organismen als Quelle neuer Naturstoffe auch durch die Qualität der vorhandenen Verbindungen. Wegen der völlig anderen Lebensbedingungen und Verfügbarkeit von Ressourcen werden im marinen Habitat

Sekundärstoffe mit Strukturen gebildet, die in terrestrischen Organismen nicht zu finden sind oder dort seltener vorkommen. So finden sich im marinen Habitat wesentlich häufiger Verbindungen, die Brom oder Chlor enthalten. Auch ist die Komplexität der marinen Naturstoffe im Vergleich zu synthetischen Stoffen oft höher. Häufig enthalten die Naturstoffe oft mehr Ringe und sind in ihrer Stereochemie komplexer strukturiert [Lawrence, 1999]. Aufgrund der vielfältigen Strukturen von Sekundärstoffen sind marine Naturstoffe aus der heutigen Wirkstoffforschung, u.a. bei der Suche nach neuen Leitstrukturen, nicht mehr wegzudenken.

Um diese Bedeutung von marinen Naturstoffen für die Entwicklung neuer Arzneimittel, neuer Leitstrukturen oder als molecular tool noch deutlicher zu zeigen, werden im Folgenden einige Wirkstoffe exemplarisch dargestellt.

## 1.2. Bioaktive marine Naturstoffe, Naturstoffe als Molecular Tools

Viele cytotoxische Naturstoffe aus marinen Invertebraten sind bekannt. Bei Screeningtests am NCI zeigte sich, dass die Ausbeute an aktiven Extrakten aus marinen Lebewesen höher ist, als die aus Lebewesen aus einem terrestrischen Habitat.

Bei über 6000 untersuchten marinen Invertebraten zeigte sich bei 2% der untersuchten Proben eine deutliche zytotoxische Aktivität. Bei untersuchten Pflanzen lag die Chance eine zytotoxische Aktivität zu finden hingegen unter 1% [Garson, 1994].

Untersucht man die marinen Lebewesen mit cytotoxisch aktiven Sekundärstoffen genauer, zeigt sich, dass besonders Schwämme und Bryozoen als Produzenten zytotoxisch aktiver Verbindungen eine große Rolle spielen. Der Anteil von Extrakten aus Schwämmen und Bryozoen, die im in-vitro-Test des NCI in verschiedenen Krebszelllinien einen  $IC_{50}$ -Wert von  $< 4 \mu\text{g ml}^{-1}$  zeigten, lag bei über 10%. Im Vergleich dazu konnte bei Makroalgen bei 3 bis 4% der bisher untersuchten Extrakte eine vergleichbare Aktivität festgestellt werden [Garson 1994].

Ein Beispiel für eine wichtige marine zytotoxische und antitumorale Verbindung ist das Halichondrin B (Abb. 1), das aus dem Schwamm *Halichondria okadai* isoliert werden konnte. Gegen B-16 Melanomzellen zeigte sich eine beeindruckende

zytotoxische Wirkung ( $IC_{50}$ -Wert  $0.093 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Beim Test der Antitumorwirkung kamen beeindruckende T/C-Werte heraus. Seit 1994 befindet sich Halichondrin B als Kandidat in der klinischen Prüfung [Schmitz, 1994].

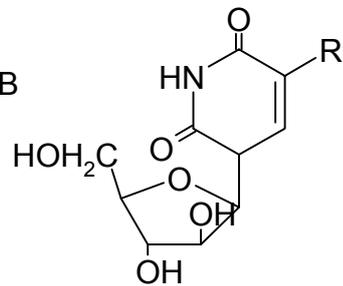
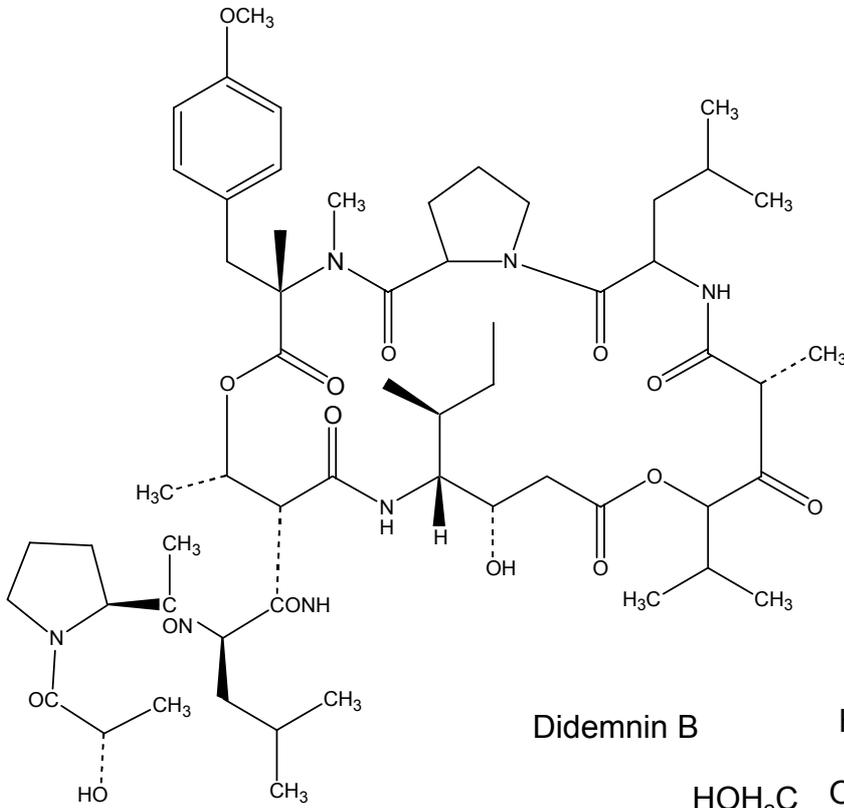
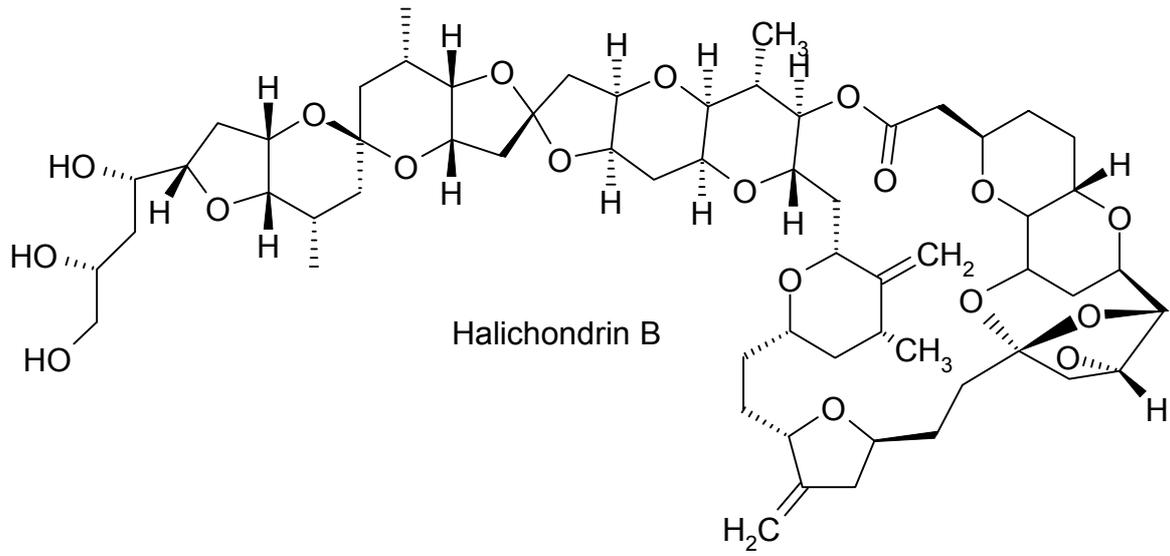
Ein weiteres Beispiel eines interessanten Naturstoffes auf dem Sektor antitumoraler Wirkstoffe ist das Didemnin B (Abb. 1). Das Didemnin B wurde aus der Seescheide *Trididemnum solidum* isoliert [Rinehart *et al.*, 1981]. Didemnin B ist der erste Naturstoff, der zur klinischen Prüfung zugelassen wurde [Schmitz, 1994]. Inzwischen hat das Didemnin B Phase II der klinischen Prüfung durchlaufen.

Das Bryostatin 1 (Abb. 1), das aus dem Moostierchen *Buglua neritina* isoliert wurde [Pettit *et al.*, 1982], weist eine stimulierende Wirkung auf die Erythropoese in humanen Knochenmarkszellen auf. Inzwischen hat das Bryostatin 1 Phase II der klinischen Prüfung erreicht.

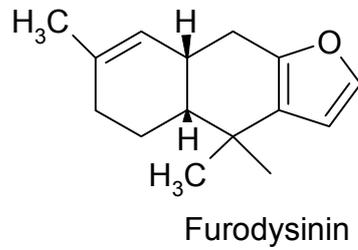
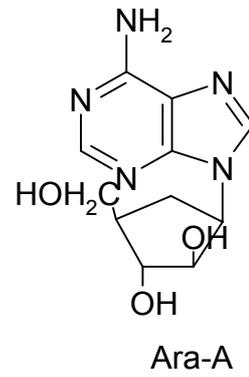
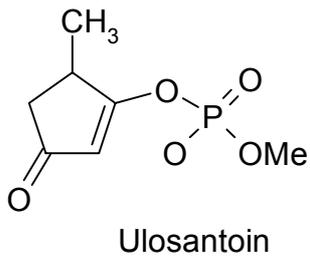
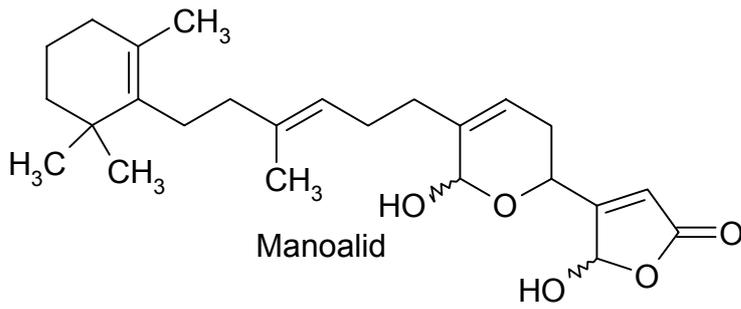
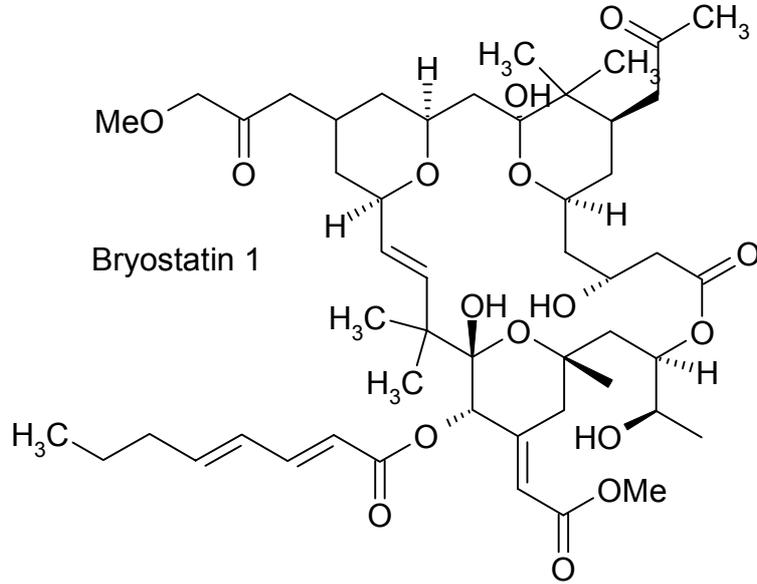
Auch gegen Viren können marine Naturstoffe Vorbild für wirksame Verbindungen sein. So dienten die bereits schon erwähnten Naturstoffe Sponguridin (Abb. 1) und Spongothymidin (Abb. 1) als Vorbild für die Entwicklung des Virostatikums Ara-A (Abb. 1), das bereits in den 70er Jahren auf den Markt kam.

Neben anticancerogenen Effekten und Viren hemmenden Eigenschaften von marinen Naturstoffen, gibt es weitere marine Sekundärstoffe, die anti-inflammatorische Wirkungen zeigen, oder sogar starke insektizide Wirkung aufweisen. Als Beispiele seien hier das entzündungshemmende Manoalid (Abb. 1) und die insektiziden Verbindungen Furodysin (Abb. 1) und Ulosantoin (Abb. 1) vorgestellt. Das Manoalid (Abb. 1) wurde 1980 aus dem Schwamm *Luffariella variabilis* isoliert [De Silva und Scheuer, 1980]. Manoalid befindet sich im Augenblick in Phase I der klinischen Prüfung. Es ist ein nichtsteroidaler irreversibler Inhibitor der Phospholipase  $A_2$  und greift auf diese Weise in das Entzündungsgeschehen ein. Daneben werden Calciumkanäle vom Manoalid inhibiert [Wheeler *et al.*, 1988]. Beide Eigenschaften machen Manoalid auch zu einem Molecular Tool, mit dem die Mechanismen bei Entzündungsvorgängen untersucht werden. Das insektizid wirksame Furodysin (Abb. 1) wurde aus dem Schwamm *Dysidea etheria* isoliert [Cardellina and Grode, 1984], das Ulosantoin (Abb. 1) aus dem Schwamm *Ulosa ruetzleri* [van Wageningen *et al.*, 1993].

Einleitung



Einleitung



### 1.3. Problematik mariner Naturstoffe

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die zunehmende Bedeutung von marinen Naturstoffen für die Arzneistoffforschung verdeutlicht. Es wurde gezeigt, dass schon viele marine Naturstoffe mit unterschiedlichsten Wirkungen isoliert wurden, die auch für den pharmazeutischen Markt interessante Wirkstoffe darstellen. Trotzdem ist bis jetzt kein mariner Naturstoff als Arzneimittel auf dem Markt zu finden.

Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Oft ist ein Naturstoff nur in geringen Mengen gewonnen worden. Große Mengen, wie sie für den Arzneimittelmarkt nötig wären, stehen oft nicht zur Verfügung. Dies liegt an den häufig geringen Bestandsdichten des Naturstoffproduzenten, oder an den geringen Konzentrationen des Wirkstoffes in den produzierenden Lebewesen. Dadurch lohnt sich eine Sammlung im großen Maßstab aus Kostengründen nicht. Ökologisch sinnvoll wäre eine solche Maßnahme ebenfalls nicht, da hierdurch eine Art schnell gefährdet werden würde. Eine Kultur der Organismen anzulegen, wie dies bei pharmazeutisch bedeutenden Pflanzen üblich ist, ist oft schwierig oder unmöglich, auch fehlen hier Erfahrungen, die man mit Pflanzen schon lange gesammelt hat. Inzwischen werden aber auch auf diesem Sektor vermehrt Bemühungen unternommen. Vielleicht sind schon bald Aquakulturen einiger Organismen möglich, um pharmazeutisch relevante Naturstoffe in ausreichender Menge zu gewinnen.

Eine weitere Möglichkeit, neu entdeckte marine Naturstoffe in ausreichender Menge zu gewinnen, stellt die Partial- oder Vollsynthese dar. Doch auch das gestaltet sich in vielen Fällen schwierig, da viele Naturstoffe sehr komplex sind und bislang nicht synthetisiert werden können. Bei einigen marinen Naturstoffen ist eine Partialsynthese oder Synthese gelungen, doch die Synthesen sind sehr aufwendig, kostenintensiv und die Ausbeuten in der Regel gering.

Auch durch die Zucht von Mikroorganismen könnten marine Naturstoffe produziert werden, indem transgene marine Organismen hergestellt werden [Eder und Proksch, 1997] oder die entscheidenden Gene für die Produktion der entsprechenden Naturstoffe in Mikroorganismen aus terrestrischen Habitaten, wie *E. coli*, expremiert werden. Dies könnte zu einer kostengünstigen Produktion von marinen Naturstoffen unter kontrollierten Bedingungen führen. Hier bleibt die Entwicklung der nächsten Jahre abzuwarten.

Neben der oft geringen Verfügbarkeit von marinen Naturstoffen kommt noch ein zweites Problem hinzu. Bei der Isolierung von Naturstoffen wurden einige Verbindungen, z.B. Saxitoxin, Tetrodotoxin und Okadainsäure, die zwar keine Rolle als Arzneimittel spielen, aber wichtige Molekular Tools sind, in verschiedenen Organismengruppen detektiert, die nicht verwandt sind. Tetrodotoxin wurde z.B. im Kugelfisch *Speroides rubiebes*, im kalifornischen Wassermolch *Taricha torosa* und in der Muschel *Babylonia japonica* gefunden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Tetrodotoxin nicht von den marinen Organismen in denen es nachgewiesen werden konnte, synthetisiert, sondern von Mikroorganismen angereichert wurde. Das Tetrodotoxin wurde dann über die Nahrungskette in den entsprechenden Organismen angereichert. Warum diese das Toxin akkumulierten und nicht abbauten oder metabolisierten, ist noch nicht hinreichend geklärt. Unter anderem wird eine Verteidigung durch Tetrodotoxin (TTX) diskutiert. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Fragen im Detail zu klären.

Bei der Okadainsäure, die ein potenter Hemmstoff der Proteinphosphatasen 1 und 2a ist und spezifisch in die Vorgänge der Signaltransduktion eingreift [Cohen *et al.*, 1990], liegt der Fall ähnlich. Ursprünglich wurde die Okadainsäure aus den Schwämmen *Halichondria okadai* und *Halichondria melandocia* isoliert [Tachibana *et al.*, 1981]. Inzwischen weiß man, dass die Okadainsäure kein Biosyntheseprodukt des Invertebraten ist, aus dem sie isoliert wurde, sondern von assoziierten Dinoflagellaten produziert wird. Im Fall der Okadainsäure konnte *Prorocentrum lima* als Produzent gefunden werden [Tachibana *et al.*, 1981].

Nach den Erkenntnissen, die aus dem Vorkommen von TTX, SXT und Okadainsäure gewonnen wurden, mussten die Quellen von interessanten Sekundärstoffen in marinen Organismen neu bewertet werden, was die Produzenten der Naturstoffe betrifft. Mikroorganismen, die in marinen Organismen als Kommensalen, Parasiten oder Symbionten leben, werden nun als eigentliche Quelle mariner Naturstoffe diskutiert. Wenn es gelingen würde, diese marinen Mikroorganismen in Kultur zu nehmen, sollte es auch einfacher werden, aktive Verbindungen in ausreichenden Mengen zu isolieren, um sie für den Arzneimittelmarkt nutzbar zu machen.

#### **1.4. Marine Mikroorganismen als Quelle neuer Sekundärstoffe**

Das Vorkommen von Mikroorganismen, insbesondere von Pilzen im marinen Habitat, ist eine recht junge Entdeckung. Erst seit 1850 sind Pilze aus dem marinen Lebensraum bekannt. Bis dahin glaubte man, Pilze könnten in diesem Lebensraum nicht existieren. Die bis dato bekanntesten marinen Pilze gehören zur Gattung von *Cephalosporium*. Aus einigen Pilzen dieser Gattung wurde bereits 1955 das Cephalosporin isoliert, das als Leitstruktur für einige Antibiotika eine große Rolle spielt.

Mikroorganismen als Pool zur Isolierung von neuen Naturstoffen haben immer mehr an Bedeutung gewonnen, insbesondere seit man immer mehr über die molekularbiologischen Vorgänge in den Organismen lernt und so mittlerweile in der Lage ist, Gene gezielt zu verändern, um z.B. die Synthese eines Sekundärstoffes zu beeinflussen.

Untersuchungen an freilebenden Mikroorganismen aus dem marinen Lebensraum und solchen, die aus Bodenproben oder von Oberflächen von Algen, Schwämmen, Tang und Treibgut gewonnen wurden, entpuppten sich in der Regel als wenig interessant was ihre Sekundärstoffe betrifft. Oft wurden Arten gefunden, die man schon aus terrestrischen Lebensräumen kannte und, die ebenfalls meist wenig interessante Verbindungen produzierten.

Diese Untersuchungen zeigten sehr deutlich, dass im marinen Lebensraum immer wieder Bakterien und Pilze angetroffen werden, die man eigentlich dem terrestrischen Lebensraum zuordnet. Zu entscheiden, ob man nun einen obligat marinen Pilz vor sich hat, ist nicht einfach. Die Diskussion über die Definition eines marinen Pilzes hält seit den ersten Pilzfunden im Meer bis heute an. Ging man ursprünglich davon aus, dass jeder Pilz aus einem marinen Habitat ein mariner Pilz sein muss, weiß man heute, dass Pilze aus terrestrischen Lebensräumen durch Wind, Wasser und einige andere Einflüsse in den marinen Lebensraum eingebracht werden. Da Pilze eine sehr anpassungsfähige Gruppe von Organismen sind, gibt es eine ganze Reihe von Stämmen, die in der Lage sind, auch im neuen Lebensraum zu überleben, oder sich dort sogar unter günstigen Bedingungen lokal weiter auszubreiten. Dies erklärt, warum man gerade bei Bodenuntersuchungen oder bei der Untersuchung von Oberflächen immer wieder Pilze findet, die man schon lange aus terrestrischen Lebensräumen kennt. Aufgrund dieser Umstände kann ein Pilz

aus einem marinen Habitat auch nicht automatisch als mariner Pilz bezeichnet werden. Um dieses Problem zu lösen, definierten Meyers 1957 und Kohlmeyer & Kohlmeyer 1979 marine Pilze als obligat marine Pilze, die in ihrem Lebensraum in der Lage waren, zu sporulieren. Eingeschleppte Pilze wurden als fakultativ marine Pilze bezeichnet, die im marinen Lebensraum nicht sporulieren, aber dort überleben können. Durch diese Definition wurden leider auch viele Pilze fälschlicherweise in die Gruppe fakultativ mariner Pilze eingeordnet, die jedoch echte marine Pilze sind. Die Rede ist von vielen Fungi imperfecti, die nach bisherigem Kenntnissstand nicht sporulieren, jedoch nur aus marinen Lebensräumen bekannt sind. Bis heute gibt es keine klare Definition, um zwischen echten marinen Pilzen und solchen, die zufällig ins Meer gerieten, zu unterscheiden. Meist spricht man heute bei Pilzisolaten aus marinen Lebensräumen von potenziell marinen Pilzen. Eine eindeutige Antwort kann nur durch einen intensiven Vergleich mit schon bekannten Pilzen erfolgen, durch physiologische Untersuchungen und durch Vergleich des Genoms.

Da sich Mikroorganismen aus Bodenproben oder von Oberflächen eher als weniger interessant entpuppten, was die Produktion von bislang unbekanntem Naturstoffen betrifft, suchte man nach anderen Quellen mariner Mikroorganismen.

Diese Quellen fand man schon bald in den bereits beschriebenen Invertebraten, aus denen man schon eine Reihe von interessanten Naturstoffen isoliert hatte. Schon im 19. Jahrhundert bei der systematischen Erforschung mariner Schwämme zeigte sich, dass diese oft eine Fülle an Algen und Bakterien enthielten [Schulze, 1879].

Die systematische Erforschung dieser assoziierten Organismen begann erst in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Vorher fehlten die entsprechenden Verfahren, die nun u.a. mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Verfügung stehen [Bertrand und Vacelet, 1971; Sara, 1971; Vacelet, 1971]. Es zeigte sich schnell, dass assoziierte Mikroorganismen in Invertebraten, insbesondere in Schwämmen, eher die Regel als eine Ausnahme waren. So fand man bislang in allen Schwämmen große Mengen an Bakterien, aber auch Cyanobakterien und einzellige Algen [Wilkinson, 1992]. Weiterhin zeigte sich, dass man im Gegensatz zu terrestrischen Organismen nicht einen oder wenige assoziierte Mikroorganismen fand, sondern eine ganze Anzahl unterschiedlicher Arten, wiederum insbesondere in Schwämmen. In einigen Fällen konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass der Wirtsorganismus von der Photosynthese und Chemosynthese seiner assoziierten

Mikroorganismen profitiert [Wilkinson, 1992]. In vielen Fällen ist aber bis heute die Rolle und Funktion vieler assoziierter Organismen von Schwämmen noch nicht bekannt. Der Anteil von Mikroorganismen an der Biomasse kann bei marinen Organismen sehr hoch sein. Bei Schwämmen ist ein Anteil von Mikroorganismen von bis zu 40 % beschrieben. Im Falle der Bakterien konnten einige Arten sogar im Zellinneren und in den Zellkernen von Schwammzellen nachgewiesen werden. Einen Eindruck über die Fülle und die Diversität von Mikroorganismen in Schwämmen soll die Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Schwammquerschnitts aus *Aplysina aerophoba* vermitteln.

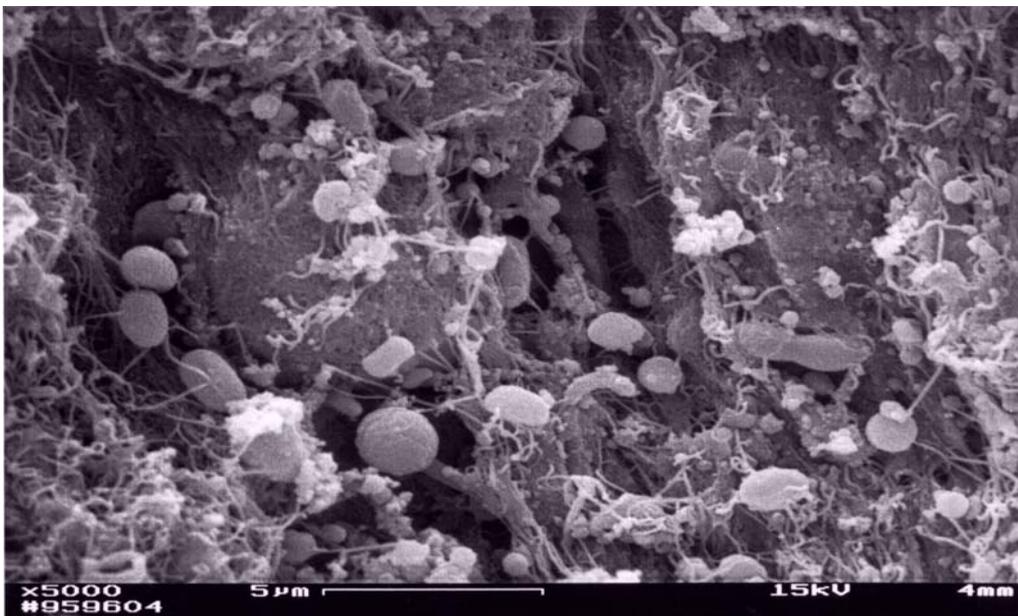


Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schwammgewebes. Deutlich sind viele Mikroorganismen zu erkennen

Da Bakterien, Algen und Pilze in marinen Invertebraten häufig vertreten sind, lag der Gedanke nahe, diese auf die Synthese neuer Naturstoffe hin zu untersuchen und zu klären welchen Anteil die Mikroorganismen an biologisch aktiven Naturstoffen haben, die man aus den entsprechenden Organismen bereits kannte.

Dazu mußten natürlich Wege gefunden werden, die assoziierten Mikroorganismen zu isolieren und zu kultivieren, was insbesondere im Falle von symbiontisch lebenden Organismen sehr schwierig und in den meisten Fällen bis heute noch nicht gelungen ist. Hier muss noch weiter an der Methodik gearbeitet werden, um eine größere Anzahl an Arten kultivieren zu können. Bei den Mikroorganismen, bei denen es

bislang gelungen ist, handelt es sich sicher nur um einen kleinen Anteil der wirklich vorkommenden Arten.

## **1.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

Unsere Arbeitsgruppe hatte schon längere Zeit an der Isolierung von Naturstoffen aus Schwämmen gearbeitet und begann nun, aus den Schwämmen Pilze zu isolieren. Die isolierten Pilze wurden in Kultur genommen und vereinzelt, bis eine Reinkultur eines Stammes vorlag. Die einzelnen Stämme wurden dann per HPLC und später auch per LC-MS untersucht. Stämme, die interessante Sekundärstoffe enthielten, wurden in größerem Maßstab kultiviert, um die Sekundärstoffe isolieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba*, der vorwiegend im Mittelmeer in Tiefen von 1 bis 40 m vorkommt, assoziierte Pilze isoliert. Die Schwämme, die zur Isolierung von Pilzen herangezogen wurden, stammten aus der Region von Banyuls-sur-Mer in Südfrankreich (1995, 1996) oder wurden in Italien gesammelt (1998). Neben den aus *Aplysina aerophoba* isolierten Pilzen wurden eine ganze Reihe von Pilzstämmen aus Schwämmen kultiviert, die im indonesischen Bali Barat Nationalpark in der Nähe der Meyangan Insel 1997 gesammelt wurden. Die isolierten Pilze wurden in Kultur genommen, wobei durch mikrobiologische Arbeitstechniken schließlich Reinkulturen herangezogen wurden. Von den erhaltenen Reinkulturen aus schwamm-assoziierten Pilzen wurden einige Kulturen mit interessanten Inhaltsstoffmustern in einer Flüssigkultur angezogen, um Sekundämetabolite anzureichern.

Schwerpunkt der Arbeit war es, diese sekundären Naturstoffe aus den ausgewählten Pilzkulturen zu isolieren und die Struktur dieser Verbindungen aufzuklären, sowie diese auf ihre Bioaktivität hin zu untersuchen. Dabei gingen wir von der Annahme aus, dass aus assoziierten Pilzen eher neue Naturstoffe zu erwarten waren, als aus frei vorkommenden Pilzen. Zur Isolierung der Naturstoffe sollten die Extrakte mit verschiedenen chromatographischen Methoden aufgetrennt werden und die isolierten Verbindungen anschließend mit Hilfe spektroskopischer Methoden analysiert, identifiziert und die Struktur aufgeklärt werden.

Aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* wurden die isolierten Pilze *Microsphaeropsis* sp., *Cladosporium herbarum*, *Hortaea werneckii* und *Phomopsis* sp. in Hinblick auf ihre Sekundärstoffe untersucht. Die isolierten Sekundärstoffe wurden mit schon bekannten Inhaltsstoffen aus *Aplysina aerophoba* verglichen.

Aus dem in Indonesien gesammelten Schwamm *Pseudoceratina purpurea* wurden sechs verschiedene Pilzstämme isoliert.

Der Stamm PAI-1/1 wurde als *Penicillium citreonigrum* identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine Flüssigkultur von *Penicillium citreonigrum* angelegt und die akkumulierten Naturstoffe wurden untersucht.

Neben der Isolierung von Naturstoffen sollten die isolierten Stoffe auch auf ihre Aktivität hin untersucht werden. Dazu wurden Tests an den herbivoren Raupen des Falters *Spodoptera littoralis* durchgeführt, um die Toxizität der isolierten Verbindungen zu testen. Dabei stellen die Raupen des Falters *Spodoptera littoralis* ein besonders robustes Testsystem zur Evaluierung von insektiziden und antiherbivoren Eigenschaften von Sekundärstoffen dar [Proksch, 1991]. Bei diesem Test wurde die zu testende Substanz dem Raupenfutter zugegeben und die Entwicklung der Tiere mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die antibiotische Wirksamkeit der isolierten Verbindungen wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde der sogenannte Agarplattendiffusionstest verwendet. Um eine Zytotoxizität der isolierten Verbindungen zu untersuchen, wurden Versuche an *Artemia salina* durchgeführt und die Überlebensrate nach 24 h bestimmt.

Einige interessante Verbindungen wurden auch auf ihre Aktivität gegenüber Kinasen oder auf ihre entzündungshemmenden Eigenschaften (Hortein) getestet. Diese Tests wurden jedoch nicht standardmäßig durchgeführt, hier kamen nur einige ausgewählte Substanzen zum Einsatz.

Weitere Pilzstämme aus *Aplysina aerophoba* von verschiedenen Standorten und von Schwämmen die aus dem indonesischen oder philippinischen Raum stammten, wurden isoliert. Von den isolierten Stämmen, wurden kleine Standkulturen angesetzt. Diese wurden mittels HPLC und in einem Screening untersucht, um Stämme mit aktiven Naturstoffen für weitere Isolierungsarbeiten zu finden.

Des Weiteren konnte so nach häufiger auftauchenden Inhaltsstoffen aus assoziierten Pilzen gesucht werden, oder aber nach Pilzstämmen, die auch in unterschiedlichen Schwammspezies anzutreffen sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Die bearbeiteten Pilze *Microsphaeropsis* sp., *Cladosporium herbarum*, *Phomopsis* sp. und *Hortaea werneckii* wurden aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* isoliert. Der Schwamm *Aplysina aerophoba* wurde 1995 bei Banyuls-sur-Mer an der südfranzösischen Mittelmeerküste aus Tiefen von 1-20 m ertaucht. Der Pilz *Penicillium citreonigrum* wurde aus dem indonesischen Schwamm *Pseudoceratina purpurea*, der 1996 im Bali Barat Nationalpark in Indonesien gesammelt wurde, isoliert.

Die Taxonomie der genannten Schwämme wurde von Dr. Rob W. M. van Soest im Zoologischen Museum von Amsterdam bestimmt.

#### 2.1.1. Isolierung von Pilzen aus Schwämmen

Zur Isolierung von Pilzen aus den Schwämmen *Aplysina aerophoba* und *Pseudocertina purpurea* wurden frische Exemplare des Schwammes nach dem Ertuchen in ein Seewasseraquarium überführt, in dem mit Hilfe von Pumpen ein kontinuierlicher Wasseraustausch gewährleistet war. Aus den Schwämmen wurden mit sterilisierten Klingen würfelförmige Gewebeproben entnommen. Diese wurden in ein weiteres Aquarium mit sterilem Seewasser überführt. Dort wurden wiederholt mit Hilfe steriler Skalpelle die äußeren Schichten der Schwammprobe entfernt. Das verbleibende würfelförmige Gewebestück mit einer Kantenlänge von 0.3 – 0.5 cm wurde mehrmals mit sterilem Seewasser gewaschen. Durch das wiederholte Waschen wurde soweit wie möglich sichergestellt, keine Pilze aus dem Seewasser oder von den Oberflächen der Sammelgefäße zu isolieren, diese sollten nämlich ausgewaschen worden sein. Natürlich kann jedoch auch nach dem oben beschriebenen Verfahren nicht völlig ausgeschlossen werden, Pilze aus der Umgebung des Schwammes zu isolieren.

Die nach dem obigen Verfahren gewonnenen Gewebeproben wurden schließlich auf einer Nährplatte plaziert, oder man tupfte sie einige Male auf eine Nährplatte, damit

dort Pilzsporen oder Hyphen hängenbleiben sollten. In einem weiteren Versuch wurde eine zuvor sterilisierte Impföse über die vorbereitete Nährplatte gezogen, nachdem sie zuvor in das Schwammgewebe gestoßen worden war.

### **2.1.2. Gewinnung von Reinkulturen und Anlage von Standkulturen**

Die auf diese Weise gewonnenen Nährplatten wurden bei Raumtemperatur inkubiert und beobachtet. Die sich entwickelnden Pilzkulturen wurden vereinzelt und auf neue Platten übertragen. Mitunter wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt, bis eine Reinkultur eines Pilzstammes vorlag. Die Reinkulturen wurden von Dr. Karsten Schaumann am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven untersucht; dabei wurden einige Stämme, die vielversprechend aussahen, für eine Großkultur ausgewählt, um Sekundärstoffe zu isolieren. Mit den ausgewählten Reinkulturen wurde eine Reihe von Erlenmeyerkolben (1000 ml) angeimpft, die je 250 ml Medium enthielten. Auf diese Weise wurden für jeden untersuchten Pilz insgesamt 30 l Medium inkubiert. Nach 3 bis 8 Wochen, je nach Wachstum der entsprechenden Pilzkultur, wurde die Kultur extrahiert und die Sekundärstoffe isoliert.

Um die Art der bearbeiteten Pilze zu bestimmen, wurden die entsprechenden Kulturen an das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven oder an das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Baarn in den Niederlanden geschickt.

### **2.1.3. Extraktion der Standkulturen**

Nach ausreichendem Wachstum der Standkulturen und Anreicherung von Sekundärstoffen wurden die Standkulturen extrahiert. Hierzu wurde zunächst die Kultur über ein Sieb filtriert, um das Myzel der Kultur vom Medium abzutrennen. Das Medium der Standkultur wurde mit Ethylacetat versetzt und mehrmals ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde verworfen.

Das Myzel der Standkultur wurde mechanisch zerkleinert und anschließend mit Methanol unter ständigem Rühren extrahiert. Die Extrakte wurden im Anschluss zunächst mit Hilfe der HPLC weiter untersucht. Es zeigte sich, dass im Myzel

dieselben Verbindungen wie auch im Medium nachzuweisen waren. So wurden die Extrakte des Myzels und des Mediums wieder zu einem Rohextrakt vereinigt.

#### **2.1.4. Verwendete Medien**

Die isolierten Pilze wurden, wie schon beschrieben, zunächst auf Agarplatten kultiviert. Dazu wurden insgesamt 3 verschiedene Medien verwendet. Als Standardmedium wurde ein Malzextraktmedium verwendet. Wuchs der entsprechende Pilz auf diesem Medium nur schlecht, wurde das von Schaumann entwickelte GPYNS Medium verwendet.

##### **2.1.4.1. Zusammensetzung der verwendeten Medien**

###### Malzmedium

Malzextrakt	15 g/l
Agar - Agar	15 g/l
Seesalz	24,4 g/l
pH (NaOH/HCl)	7.6 – 7.8

###### GPYNS-Medium

Agar - Agar	16.0 g/l
Pepton (aus Casein)	0.5 g/l
Hefeextrakt	1.0 g/l
Glucose-Monohydrat	1.0 g/l
Ammoniumnitrat	1.0 g/l
Seesalz	24.4 g/l
pH (NaOH/HCl)	7.2-7.4

Traten Probleme durch Kontaminationen mit Bakterien auf, wurden den vorgestellten Medien Chloramphenicol 0.2 g/l vor dem Autoklavieren, oder Streptomycinsulfat 0.1 g/l und Penicillin G 0.1 g/l nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration zugesetzt, um das Bakterienwachstum zu unterdrücken.

#### **2.1.4.2. Verwendete Nährmedien für die Standkulturen**

Für die Flüssigmedien wurden dieselben Medien wie für die Platten verwendet, ohne Agar - Agar zu verwenden, hinzu kam noch das Wickerham Medium. Im Falle vom Malzmedium wurde die Menge an Malzextrakt gegenüber dem Agarplattenrezept etwas erhöht, um ein gutes Wachstum zu gewährleisten.

##### Malzmedium

Malzextrakt	20.0 g/l
Seesalz	24.4 g/l
pH	7.4 - 7.6

##### Wickerham Medium

Hefeextrakt	3.0 g/l
Malzextrakt	3.0 g/l
Pepton	5.0 g/l
Glucose	20.0 g/l
Seesalz	24.4 g/l
pH (NaOH/HCl)	7.2 –7.4

## 2.1.5. Taxonomie der untersuchten Pilze sowie ihrer Schwämme

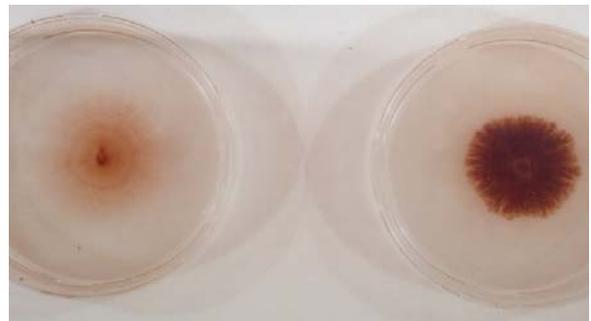
### 2.1.5.1. Taxonomie der untersuchten marinen Pilze

Die Bestimmung der isolierten Pilze gestaltete sich schwierig, da es sich bei vielen der isolierten Pilze um *fungi imperfecti* handelt, eine sehr heterogene Abteilung des Pilzreiches. Die Bestimmung der Pilze erfolgte hauptsächlich anhand der Konidien. Wie bereits schon erwähnt, erfolgte die Identifizierung der Pilzstämmen am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven durch Herrn Dr. Karsten Schaumann, sowie am Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Baarn (NL) durch Herrn Dr. R. A. Samson. Am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung wurden Pilzproben für Dauerkulturen hinterlegt.

Aufgrund der morphologischen Untersuchungen lassen sich folgende systematische Einordnungen der bearbeiteten Pilze treffen:

für *Microsphaeropsis* sp.

Reich: Fungi  
 Abteilung: Deuteromycota  
 Klasse: Coelomycetes  
 Gattung: *Microsphaeropsis*  
 Art: *Microsphaeropsis* sp.



für *Cladosporium herbarum*

Reich: Fungi  
 Abteilung: Ascomycota  
 Unterabteilung: Pezizomycotina  
 Klasse: Dothideomycetes  
 Familie: Mycosphaerellaceae  
 Gattung: *Cladosporium* (Link ex Fries 1821)  
 Art: *Cladosporium herbarum* ([Persoon] Link ex Gray 1821)



für *Hortaea werneckii*

Reich: Fungi  
Abteilung: Ascomycota  
Unterabteilung: Mitosporic Ascomycota  
Gattung: *Hortaea*  
Art: *Hortaea werneckii* (Nishimura & Miyaji)



für *Phomopsis* sp.

Regnum: Fungi  
Abteilung: Deuteromycota  
Klasse: Coelomycetes  
Gattung: *Phomopsis*  
Art: *Phomopsis* sp.



Für *Penicillium citreonigrum*

Reich: Fungi  
Abteilung: Ascomycota  
Unterabteilung: Pezizomycotina  
Klasse: Eurotiomycetes  
Ordnung: Eurotiales  
Familie: Trichocomaceae  
Gattung: *Penicillium*  
Art: *Penicillium citreonigrum* (Dierckx)



Das taxonomische System der Pilze ist sehr komplex. Immer wieder werden Pilze neu eingeordnet oder parallel verschiedenen Taxa zugeordnet. Dies kommt durch neue Erkenntnisse über eine Art, aber auch durch die Entdeckung neuer Arten zustande, durch die oft neue Gruppen eingeführt werden und die zu einer Neubewertung von schon bekannten Arten führen, was ihre Stellung im System anbelangt. Oft ist die genaue Einordnung einer Art nur bedingt möglich. Dies kommt u.a. daher, dass bei ihnen bisher keine sexuellen Stadien gefunden wurden, die für eine Einordnung in das System wichtige Hinweise liefern. Mehr Erkenntnisse werden sicher durch einen Vergleich der Genome geliefert werden. Leider sind die Datenbanken in Bezug auf die Gene der Pilze im Vergleich zu denen über Bakterien noch sehr lückenhaft.

Bei der Einordnung eines Pilzes in das System ist also Vorsicht geboten, da sich schnell eine Zuordnung ändern kann, besonders bei den *fungi imperfecti*, bei denen keine sexuellen Stadien bekannt sind. Eine Folge davon ist auch, dass Pilze oft mehrfach beschrieben werden und so viele Synonyme für ein und dieselbe Art zu finden sind, wie an dem untersuchten Pilz *Cladosporium herbarum* deutlich gemacht werden soll.

Weitere Bezeichnungen für *Cladosporium herbarum*:

*Demantium herbarum* (Pers. ex Schleich. 1821)

*Cladosporium graminum* ([Pers.] Link 1824)

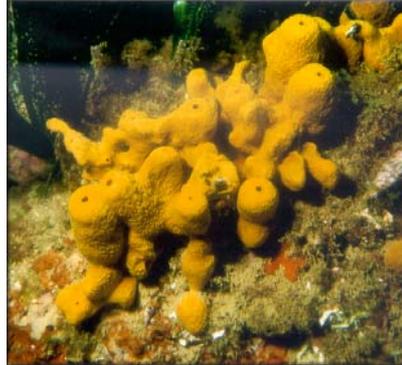
*Demantium epiphyllum* (Pers. ex Hook. 1821)

*Cladosporium epiphyllum* (Pers. ex Hook., Nees 1817 ex Fr. 1832)

## 2.1.5.2. Taxonomie der Schwämme, aus denen Pilze isoliert wurden

für *Aplysina aerophoba*

Stamm : Porifera  
Klasse: Demospongiae  
Ordnung: Verongida  
Familie: Aplysinidae  
Gattung: *Aplysina*  
Art: *Aplysina aerophoba*



für *Pseudoceratina purpurea*

Stamm : Porifera  
Klasse: Demospongiae  
Ordnung: Verongida  
Familie: Aplysinidae  
Gattung: *Pseudoceratina*  
Art: *Pseudoceratina purpurea*

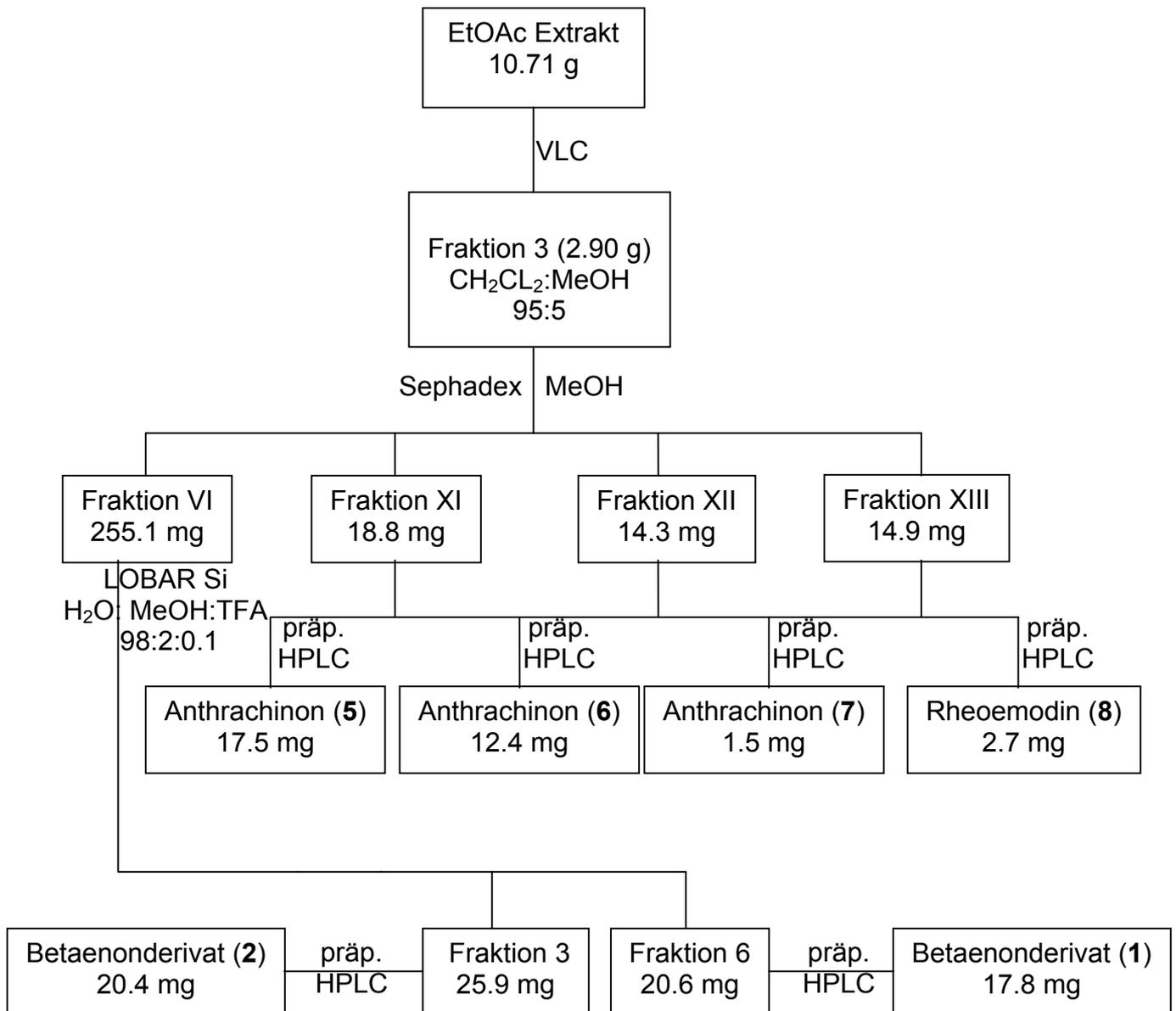


## 2.1.6. Vorstellung der untersuchten Pilzarten

### 2.1.6.1. *Microsphaeropsis* sp.

1995 wurden an der südfranzösischen Mittelmeerküste bei Banyuls-sur-Mer Proben des Schwammes *Aplysina aerophoba* aus Tiefen bis zu 20 m gesammelt. Aus diesem Schwamm wurde der Pilz *Microsphaeropsis* sp. isoliert. Die Identifizierung erfolgte am Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung in Bremerhaven. Eine Kultivierung zur Anreicherung von Sekundärstoffen mit Hilfe von Erlenmeyerkolben im 30 l Maßstab erfolgte am Hans-Knöll-Institut in Jena. Als Medium wurde dabei ein Malzmedium aus Malzextrakt mit 20 g/l und Seesalz mit

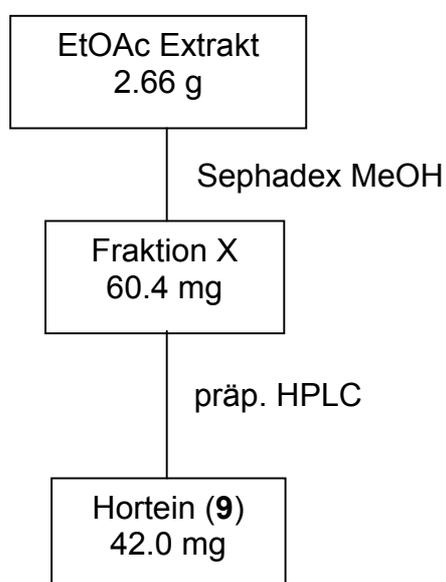
24.4 g/l verwendet. Nach 41 Tagen Wachstum wurden die Kolben geerntet. Das Medium wurde vom Myzel getrennt und sowohl Myzel als auch das Medium mit Ethylacetat extrahiert. Beide Extrakte wurden mittels HPLC verglichen. Da die Inhaltsstoffe identisch waren, wurden sie vereinigt. Durch dieses Verfahren wurden 12.17 g Rohextrakt gewonnen, aus dem Sekundärstoffe isoliert werden konnten. Das genaue Extraktionsverfahren ist der folgenden Abbildung zu entnehmen.



**Abb. M1:** Isolierschema der Substanzen aus *Microsphaeropsis sp.*

### 2.1.6.2. *Hortaea werneckii*

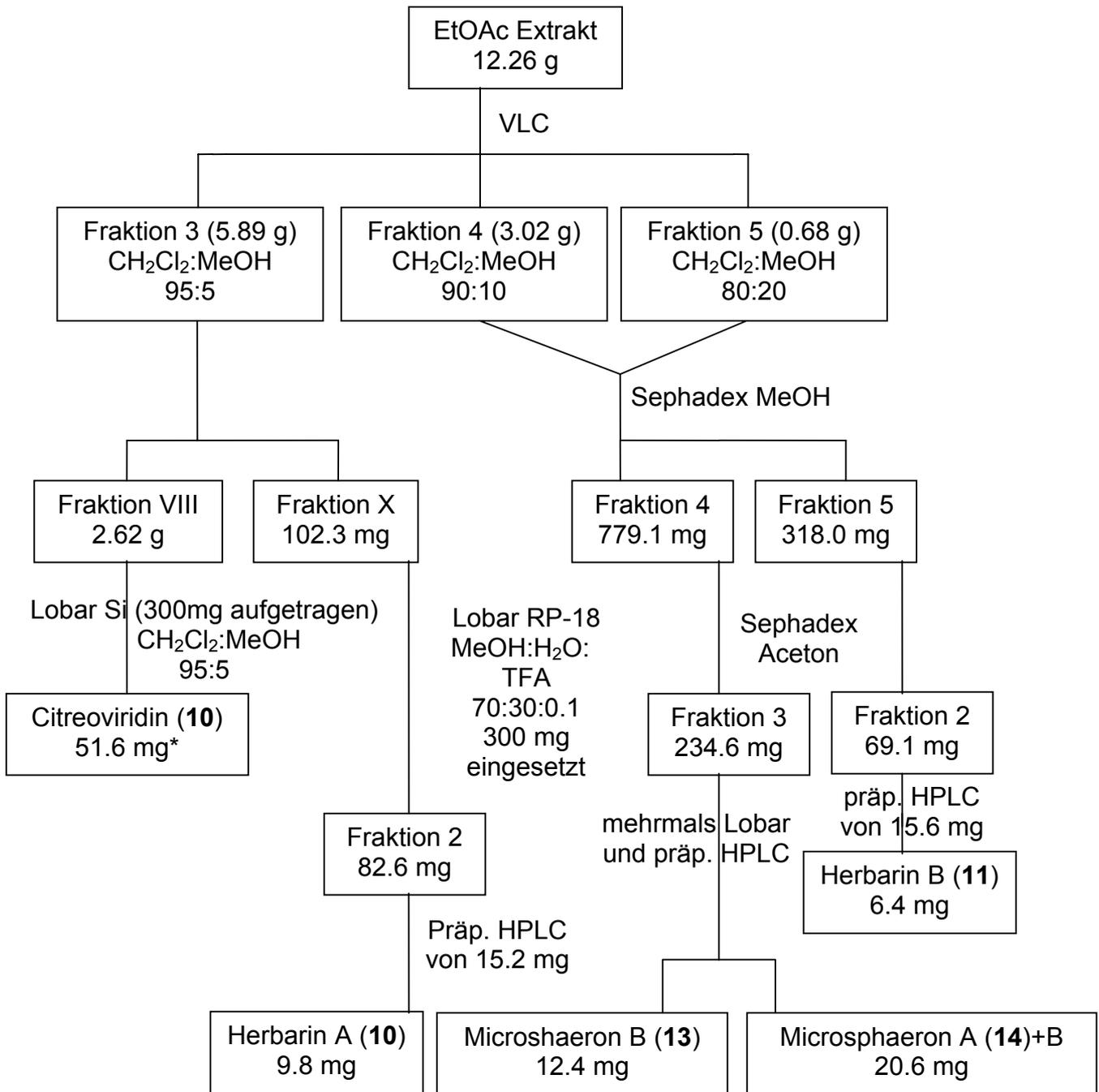
Der Pilz *Hortaea werneckii* stammt aus derselben Schwammprobe von *Aplysina aerophoba*, wie die bereits zuvor beschriebenen Pilze. Die Identifizierung erfolgte in diesem Fall aber beim Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn. Die Großkultur wurde wie bei den vorangegangenen Pilzen am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt. Nach 62 Tagen wurde die Kultur geerntet, wobei nach Extraktion 2.66 g Rohextrakt verblieben. Das Isolierschema ist der folgenden Grafik zu entnehmen.



**Abb. M2:** Isolierschema von Hortein aus *Hortaea werneckii*

### 2.1.6.3. *Cladosporium herbarum*

Der Pilz *Cladosporium herbarum* stammt wie auch *Microsphaeropsis sp.*, aus dem Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba*, der bei Banyuls-sur-Mer gesammelt wurde. Auch *Cladosporium herbarum* wurde am Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung identifiziert. Die Großkultur erfolgte unter denselben Bedingungen wie bei *Microsphaeropsis sp.* Nach 35 Tagen wurden die Flüssigkulturen geerntet und wie bereits beschrieben mit EtOAc extrahiert. Insgesamt wurden aus *Cladosporium herbarum* 12.27 g Rohextrakt gewonnen. Das Isolierschema ist der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen.

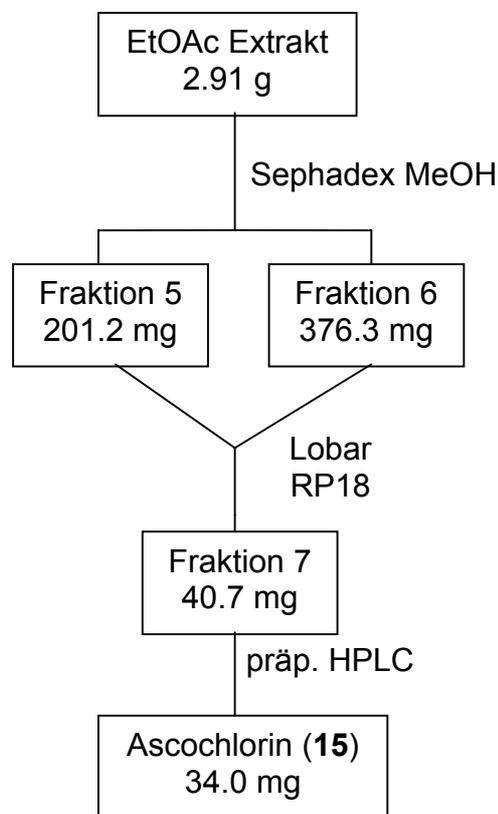


**Abb. M3:** Isolierschema der Naturstoffe aus *Cladosporium herbarum*

\*: Citreoviridin wurde nicht quantitativ aus allen Fraktionen in denen es vorkam isoliert, der Gehalt an Citreoviridin ist somit noch höher.

#### 2.1.6.4. *Phomopsis* sp.

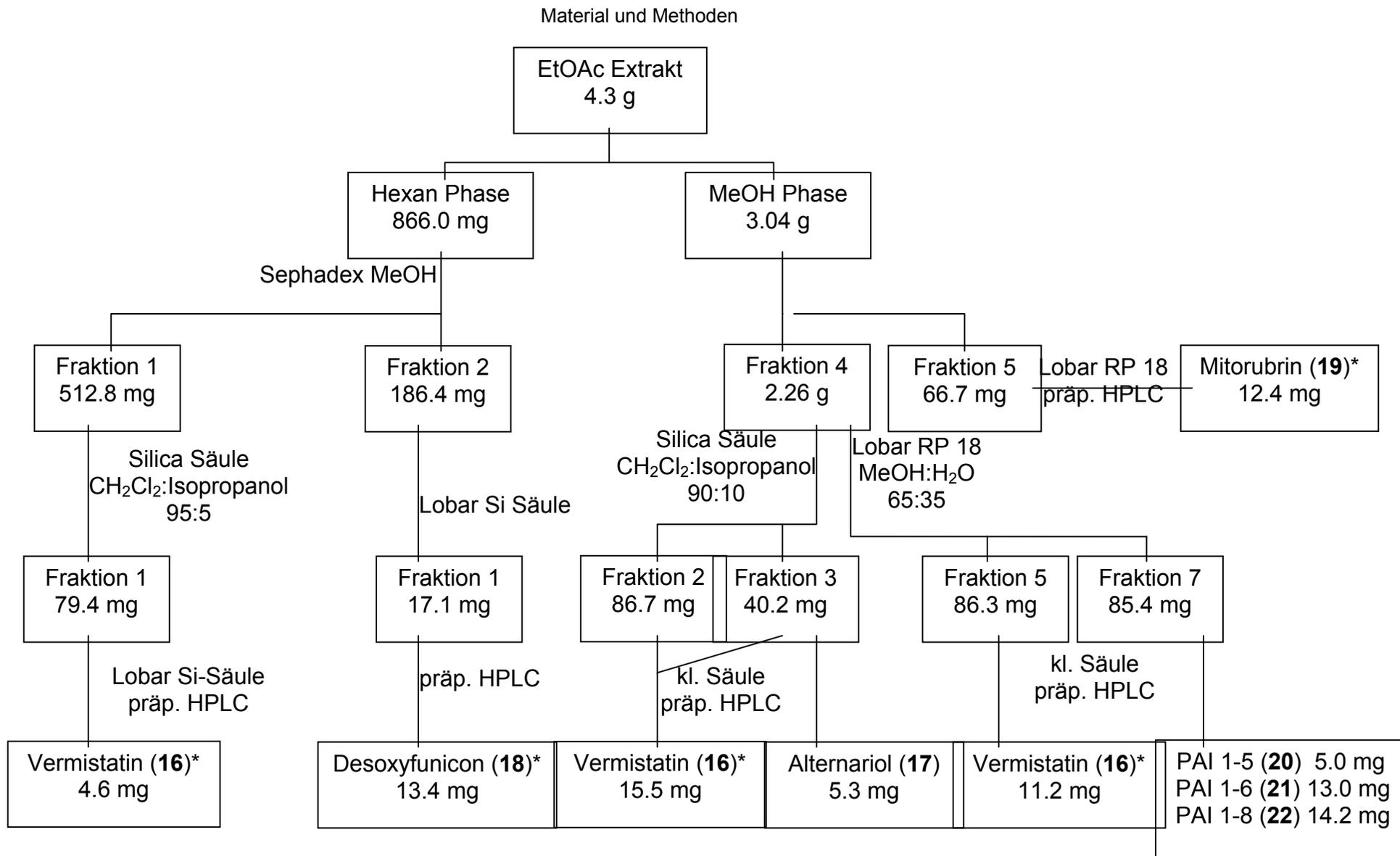
Wie die bereits vorgestellten Pilze stammt auch der Pilz *Phomopsis* sp. aus der Schwammprobe von *Aplysina aerophoba* aus dem Mittelmeer bei Banyuls-sur-Mer. Die Identifizierung dieses Pilzes erfolgte am Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung in Bremerhaven. Eine 30 l Großkultur verteilt zu je 250 ml auf 120 1000 ml Erlenmeyerkolben wurde in Jena am Hans-Knöll-Institut durchgeführt. Nach 31 Tagen wurde die Kultur geerntet und wie bereits beschrieben extrahiert. Nach dem Trocknen wurden 2.91 g Rohextrakt für die weitere Bearbeitung erhalten. Die Aufarbeitung des Extraktes ist in der nächsten Abbildung dargestellt.



**Abb. M4:** Isolierschema des Ascochlorins aus *Phomopsis* sp.

### **2.1.6.5. *Penicillium citreonigrum***

Der Pilz *Penicillium citreonigrum* wurde aus dem Schwamm *Pseudocertina purpurea* isoliert. Dieser wurde 1996 in Indonesien im Bali Barat Nationalpark gesammelt. Die Identifizierung des Schwammes erfolgte im Zoologischen Museum in Amsterdam, die des Pilzes erfolgte beim Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn. Eine Großkultur in Malzmedium wurde wie auch bei den anderen Pilzen im 30 l Maßstab in Jena durchgeführt. Nach 40 Tagen wurde die Kultur geerntet und unter denselben Bedingungen wie die anderen Kulturen extrahiert. Nach dem Trocknen verblieben 4.30 g Rohextrakt. Die weitere Verarbeitung des Rohextraktes zur Isolierung der Naturstoffe ist in der nächsten Abbildung dargestellt.



**Abb. M5:** Isolierschema der Substanzen aus *Penicillium citreonigrum*. \* Substanzen wurden nicht quantitativ isoliert, mehr Substanz kann aus weiteren Fraktionen isoliert werden.

## 2.2. Verwendete Chemikalien

Aceton	Merck, CL*
Acetonitril	Merck
Agar - Agar	Merck
Ammoniumnitrat	Merck
Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd)	Merck
Chloramphenicol	Merck
L-(+)- Ascorbinsäure	Merck
Dichlormethan	Merck, CL*
Dimethylsulfoxid	Merck
Ethanol	Baker
Ethylacetat	CL*
Formaldehydlösung	Merck
Gentamycinsulfat p.a.	Serva
Glucose-Monohydrat	Merck
Hefe Extrakt	Merck
Hexan	CL*
Malzextrakt	Sigma
Methanol	CL*
n-Hexan	Baker
Nipagin A ( <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure)	Sigma
Penicillin G	Merck
Pepton (aus Casein)	Merck
Phosphorsäure	Merck
Seesalz	SERA
Streptomycinsulfat	Merck
Triflouressigsäure	Merck

CL\* = Diese Chemikalien wurden vom Chemikalienlager der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf bezogen. Sie wurden vor Gebrauch destilliert. Für spektroskopische Messungen wurden die entsprechenden „Spectral-grade“ Lösungsmittel verwendet

## 2.3. Chromatographie

### 2.3.1. verwendete Fertigplatten und Säulen

DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Mit Fluoreszenzindikator, 0.2 mm Schichtdicke	Merck
DC-Fertigplatten, RP 18, F254 S, 0.25 mm Schichtdicke	Merck
DC-Fertigplatten, Diol	Merck
Kieselgel 60, Korngröße 0.04 – 0.063 mm	Merck
Kieselgel RP 18 Korngröße 0.04 – 0.063 mm	Merck
Sephadex LH-20 Korngröße 0.025 – 0.10 mm	Sigma
Lobarsäule: LiChroprep Kieselgel 60 40 – 63 µm Korngröße Größe B (25 mm i.d x 310 mm)	Merck
Lobarsäule: LiChroprep Kieselgel 60 40 – 63 µm Korngröße Größe A (10 mm i.d x 310 mm)	Merck
Lobarsäule: LiChroprep RP-18, 40 – 63 µm Korngröße Größe B (25 mm i.d x 310 mm)	Merck
Lobarsäule: LiChroprep RP-18, 40 – 63 µm Korngröße Größe A (10 mm i.d x 310 mm)	Merck
Lobarsäule: LiChroprep Diol, 40 – 63 µm Korngröße Größe B (25 mm i.d x 310 mm)	Merck

### 2.3.2 HPLC-Fließmittel

Methanol LiChroSolv HPLC	Merck
Wasser aus NANOpur-Anlage, pH = 2.0 Eingestellt mit: Ortho-Phosphorsäure 85 % p.a.	

### 2.3.3 LC-MS Fließmittel

Acetonitril LiChroSolv HPLC	Merck, Bruker
Wasser aus NANOpur-Anlage (0.1% Ameisensäure)	Barnstead

## 2.4. Geräte

• Autoklav	Varioclav	H&P
• Cleanbench	HERAsafe	Heraeus
• Digital-ph- Meter	420Aplus	Orion
• Fraktionssammler	Retriever II	ISCO
	LKB Redi Frac	Pharmacia
• Gefriertrockner	Lyovac GT2	Steris
• Heizplatte		Camag
• Injektionsspritze(n)	Hamilton	
• 86 °C Kühltruhe	86 °C Freezer	Forma Scientific
• Magnetrührer	Combi Mag	IKA
• Polarimeter	341 LC	Perkin-Elmer
• Rührer	RZR 2041	Heidolph
• pH Elektrode		
• Rotationsverdampfer	Rotavapor R200	Büchi
• SpeedVac	speed vac SPD 111V	Savant
• Trockenschränke	Kelvitron	Heraeus
• Ultraschallbad	Sonorex RK 510 H	Bandelin
• Ultra Turrax	T18 basic	IKA
• UV-Lampen	UV-Betrachter	CAMAG
• Waagen	Sartorius 2354	Sartorius
	MC1 Analytik AC 210 S	Sartorius
• Zentrifugen	Biofuge primo	Heraeus
	Biofuge pico	Heraeus

## 2.5. HPLC-Anlagen

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen mit folgenden HPLC Systemen durchgeführt:

### Anlage I

Pumpen : M40, Gynkotheke  
Steuerung : Gynkosoft (V 5.4)  
Detektor : UVD 340 Gynkotheke  
(Injektion) : Gina 50, Gynkotheke  
Säulenofen : STH 580, Gynkotheke  
Drucker : NEC P60

### Anlage II

Pumpen : P580, Dionex  
Steuerung : Chromeleon (V 6.3)  
Detektor : UVD 340 S, Dionex  
(Injektion) : Asi-100 Automated Sampler, Dionex  
Säulenofen : STH 585 Dionex  
Drucker : HP 4050

### Anlage III

Pumpen : LaChrom L-7100, Merck-Hitachi  
Detektor : LaChrom L-7400, Merck-Hitachi  
Schreiber : D-2000 Chromato-Integrator, Merck-Hitachi

## 2.5.1. LC-MS

### LC-MS System

Pumpen	: G1311 A QuatPump 1100	Agilent
Steuerung	: Excalibur	
Detektor	: G1315 B DAD 1100	Agilent
Injektor	: G1313 A ALS 1100	Agilent
Degasser	: G1322 A Degasser 1100	Agilent
MS	: LC-Q Deca, Finnigan	

## 2.6. Chromatographische Methoden

### 2.6.1. Dünnschichtchromatographie

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde für folgende Zwecke eingesetzt:

Optimierung des Fließmittels bei der Säulenchromatographie

Qualitative Untersuchung von Extrakten und Fraktionen

Überprüfung der Reinheit erhaltener Fraktionen bei der

Säulenchromatographie

Überprüfung der Reinheit von isolierten Substanzen

Die dünnschichtchromatographischen Tests wurden auf Platten mit Kieselgel 60 F 254 (Schichtdicke 0.2 mm), RP-18 Platten (Schichtdicke 0.25 mm) und Diol Fertigplatten (Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Bei den Kieselgelplatten wurde  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und MeOH als Fließmittel verwendet. Je nach Polarität der Substanzen kamen Mischungsverhältnisse von 98:2, 95:5 oder 90:10 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH) zur Anwendung.

Die Diolplatten kamen bei semipolaren Substanzen zur Anwendung. Hier wurde ein Gemisch aus EtOAc und n-Hexan im Verhältnis 75:25 eingesetzt.

Bei polaren Verbindungen wurden RP-18 Platten verwendet. Als Fließmittel wurde hier Wasser und Methanol eingesetzt. Die Mischungsverhältnisse variierten je nach zu untersuchender Substanz. Die Detektion der entwickelten Dünnschichtchromatographieplatten erfolgte bei 254 nm, 366 nm und/oder nach Besprühen mit Anisaldehydsprühreagenz (DAB10) und anschließendem Erhitzen auf 110°C.

### 2.6.2. Säulenchromatographie

Zur Isolierung von Sekundärstoffen aus den isolierten Pilzstämmen wurde die Säulenchromatographie mit verschiedenen Säulenmaterialien und Fließmitteln eingesetzt. Die verwendeten Säulenmaterialien und die jeweiligen Fließmittelgemische wurden zuvor mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getestet.

Folgende Systeme wurden eingesetzt:

- 1) Stationäre Phase: Sephadex LH-20  
Fließmittel: Methanol oder Aceton
- 2) Stationäre Phase: Silica Gel  
Fließmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH
- 3) Stationäre Phase: RP 18  
Fließmittel: MeOH : H<sub>2</sub>O
- 4) Stationäre Phase : Diol  
Fließmittel: EtOAc : n-Hexan

### **2.6.3. Semipräperative HPLC**

Die semipräperative HPLC wurde eingesetzt, um aus einfach zusammengesetzten Fraktionen Reinsubstanzen zu isolieren oder schon relativ reine Substanzen weiter zu reinigen. Pro Injektion wurde bei der verwendeten Anlage 1.0 ml injiziert, was zwischen 1.5 und 2.5 mg Substanz entsprach. Die verwendeten Säulen waren mit RP-18 Material gefüllt. Als Fließmittelsystem wurde ein Gemisch von MeOH:Wasser (0.1%TFA) oder ein Gemisch von Acetonitril mit Wasser eingesetzt.

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

Der Fluß über die Säule (Eurospher RP 18 von Knauer) betrug in der Regel 5 ml/min. Die Gradienten wurden den jeweiligen Substanzgemischen angepasst.

## 2.6.4. HPLC

Die HPLC, eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der Druck angewandt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit für folgende Zwecke verwendet:

- Überprüfung einzelner Fraktionen nach erfolgten Trenn- und Reinigungsschritten
- Überprüfung der Reinheit von isolierten Verbindungen
- Quantitative und qualitative Analyse von Extrakten und Fraktionen
- Vergleich der detektierten Substanzen mit einer interner Datenbank

Die HPLC Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Elutionsmittel 1: Nanopur Wasser, pH = 2.0, eingestellt mit ortho-Phosphorsäure
- Elutionsmittel 2: 100 % Methanol
- HPLC-Säule: Eurospher RP18, Knauer, 125 mm
- Dimension: 4 mm
- Korngrösse: 5 µm
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Detektionswellenlänge: 200-595 nm
- Flussrate: 1 ml/min

Bei den Messungen wurde in den meisten Fällen folgender Standardgradient verwendet:

Zeit [min]	Elutionsmittel 1 [%]	Elutionsmittel 2 [%]
0	90	10
5	90	10
35	0	100
45	0	100
46	90	10
60	90	10

Weitere Gradienten wurden jeweils den zu untersuchenden Substanzen angepasst, mit dem Ziel die detektierten Verbindungen möglichst gut voneinander zu trennen. Hierzu konnte als Fließmittel auch ein Gemisch von Acetonitril und Wasser (Nanopur) eingesetzt werden.

## **2.7. Identifizierung der Sekundärstoffe**

Zur Strukturaufklärung und Charakterisierung der aus den Pilzen isolierten kamen verschiedene spektroskopische Methoden zum Einsatz.

### **2.7.1. UV/Vis –Spektroskopie**

Mit Hilfe eines DAAD-Detektors der analytischen HPLC-Anlage wurde ein UV Spektrum der isolierten Verbindungen aufgenommen. Die aufgezeichneten Spektren wurden mit Literaturwerten und internen Datenbanken verglichen soweit dies möglich war. Der Meßbereich des DAAD Detektors reichte von 210 nm bis 595 nm.

### **2.7.2. Massenspektrometrie**

ESI-, EI-, CI- und FAB-Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT8430 aufgenommen. Für ESI- Massenspektren kam auch noch ein Finnigan MAT TSQ 7000 zum Einsatz. Die Messungen wurden von Dr. Ludger Witte am Institut für Organische Chemie an der Universität Braunschweig, von Dr. Albrecht Berg am Hans-Knöll- Institut für Naturstoffforschung in Jena, oder am eigenen Gerät im Institut für Pharmazeutische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität (HHU) in Düsseldorf durchgeführt. Hochauflösende MS-Spektren, um ein möglichst genaues Molekulargewicht einer Verbindung zu erhalten und Rückschlüsse auf die Summenformel ziehen zu können, wurden von Dr. Albrecht Berg am Hans-Knöll-Institut in Jena gemessen. Die LCMS wurde verwendet, um Extrakte mit mehreren Substanzen zu untersuchen, ohne dass eine Reinsubstanz benötigt wird. Vor allem bei der Auswahl neuer Pilze für die Isolierung von Sekundärstoffen wurden die Daten der LC-MS zusammen mit

Daten der HPLC verwendet um zu vermeiden, bereits bekannte Verbindungen erneut mühsam zu isolieren. Durchgeführt wurde die LC-MS am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Verwendet wurde ein Finnigan LCQ- Deca Massenspektrometer, mit dem ESI- (pos., neg.) und APCI- (pos., neg.) Spektren aufgenommen werden konnten. Die eingesetzte HPLC-Anlage stammt von Hewlett Packard. Als Säule wurde eine Nucleosil RP-18 Säule verwendet.

### 2.7.3. NMR

$^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren wurden bei 300°K an einem Bruker DPX, ARX 400 oder AVANCE DMX 600 NMR Spektrometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei Dr. Victor Wray in Braunschweig bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), bei Dr. Albrecht Berg am Hans-Knöll-Institut in Jena oder bei Dr. Peters am Institut für Anorganische Chemie und Makromolekulare Chemie an der HHU in Düsseldorf. Die aufgenommenen 1 D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) und 2 D (H - H-Cosy, HMQC und HMBC) Daten wurden mit dem Softwareprogramm Win-NMR von Bruker ausgewertet. Die Messungen wurden in deuteriertem Wasser, Chloroform, Methanol, DMSO, oder Benzol durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) wurden in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz.

## 2.8. Biologische Aktivität

### 2.8.1. Untersuchungen an *Spodoptera littoralis*

*Spodoptera littoralis* Boisd. (Gawaad und El-Gayar, 1974)

Stamm	: Arthropoda
Klasse	: Insecta
Ordnung	: Lepidoptera
Familie	: Noctuidae (Eulen)
Gattung	: Spodoptera

Der Nachtfalter *Spodoptera littoralis* zählt zu den polyphagen Insekten und nutzt ein breites Spektrum von Wirtspflanzen als Futterquelle (ca.112 Pflanzenarten aus 44 Familien [Moussa, 1960]). Auch auf Kunstfutter läßt sich der Falter gut halten. Wirtschaftliche Schäden durch Fraß von *Spodoptera littoralis* treten besonders an Baumwolle, Tomaten, Kartoffeln, Mais und Weinreben auf [Salama *et al.*, 1971].

Das Verbreitungsgebiet des Falters umfasst große Teile Afrikas sowie den gesamten Mittelmeerraum bis zum Persischen Golf [Commonwealth of Entomology, 1967; Brown und Dewhorst, 1975].

Als Nahrungsgeneralist ist *Spodoptera littoralis* ein guter Testorganismus, um die Aktivität isolierter Verbindungen auf Insekten zu untersuchen. Bei der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Reinsubstanzen und Extrakte im Hinblick auf ihre Aktivität gegenüber Insekten an *Spodoptera littoralis* getestet. Dazu wurden die frisch geschlüpften Larven verwendet.

#### 2.8.1.1. Kulturbedingungen und Nahrung

Die Raupen von *Spodoptera littoralis* wurden auf einem Kunstfutter in Schalen (20 x 20 x 10 cm) unter kontrollierten Bedingungen in einem Kulturschrank gezüchtet. Für optimale Wachstumsbedingungen wurde im Kulturschrank eine konstante Temperatur von 28 °C eingehalten. Außerdem wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 18:6 h eingestellt und eine relative Luftfeuchtigkeit von 70 % gewählt.

Die sich entwickelnden Vorpuppen der Falter wurden aus den Futterboxen entfernt, da sie durch Kannibalismus ihrer Artgenossen gefährdet wären. Bis zur vollständigen Verpuppung wurden sie auf Vermiculit, einem Silikatmaterial [Rösler, 1987] gehalten. Die Puppen wurden schließlich separiert und in einem unbeleuchteten Kulturschrank bei 28°C bis zum Schlüpfen gehalten. Die Falter wurden anschließend in einen 10 l Eimer überführt und mit Zuckerwasser gefüttert. Zur Eiablage wurde den Faltern Filterpapier in dem Eimer angeboten. Die Gelege wurden bei 28°C in einem unbeleuchteten Kulturschrank bebrütet. Die schlüpfenden Raupen (Neonates) wurden für Bioassays verwendet oder zum Erhalt der Kultur groß gezogen.

### **2.8.1.2. Herstellung der künstlichen Nahrung**

(nach Shorey and Hale (1965), Bowling (1967) und Dimetry (1970))

150 g weiße Bohnen wurden 24 Stunden in 460 ml kaltem Wasser quellen gelassen. Anschließend wurden die Bohnen mit Hilfe eines Mixers zerkleinert und folgende Substanzen hinzugegeben:

- 3.0 g l-(+)-Ascorbinsäure
- 3.0 g Nipagin
- 30 g Bäckerhefe
- 180 mg Gentamycinsulfat
- 1.0 ml Formaldehydlösung

Die Mischung wurde homogenisiert. 10 g Agar-Agar wurden in 315 ml Wasser zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agarlösung zur Bohnenmischung hinzugegeben, das ganze gut durchmischt und anschließend erkalten gelassen.

Das so gewonnene Kunstfutter wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### 2.8.1.3. Fraßversuche

Für Fraßversuche wurden die frisch geschlüpften Neonates verwendet, sowie eine leicht abgewandelte Variante des oben beschriebenen Futters. Für den Fraßversuch wurde das Futter ohne Zugabe von Gentamycinsulfat und Agar - Agar-Lösung hergestellt. Das Futter wurde gefriergetrocknet und für jeden Versuchsansatz wurde 0.735 g des gefriergetrockneten Futters in ein 30 ml Becherglas eingewogen. Die gewünschte Konzentration an zu testendem Extrakt oder einer Reinsubstanz wurde in Methanol gelöst (max. 2.0 ml) hinzugefügt. Nach gründlicher Mischung mit dem Kunstfutter wurde das Methanol über Nacht im Abzug abgedampft. Nach dem Abdampfen des Methanols wurde 0.75 mg Gentamycinsulfat in 1.41 ml Wasser hinzugegeben und anschließend 2.2 ml heiße Agar - Agar Lösung (78 mg Agar - Agar in 2.2 ml Wasser) untergerührt. Zur Kontrolle wurden Futterstücke analog hergestellt, doch ohne Zugabe von zu testenden Substanzen. Nach dem Abkühlen der Agar – Agar-Lösung wurden die Futterstücke in kleine Plastikgefäße überführt und jeweils 20 Neonates hinzugefügt. Die Gefäße wurden bei 28°C in unbeleuchteten Kulturschränken gelagert. Nach sechs Tagen wurden die überlebenden Tiere gezählt und gewogen und mit den Tieren aus den Kontrollgefäßen verglichen.

Aus diesen Daten wurde die Wachstumsrate und die Überlebensrate bestimmt, was mit Hilfe folgender Formeln geschah.

$$\text{Wachstumsrate in \%} = \frac{\text{Durchschnittliches Larvengewicht der Probe} \times 100}{\text{Durchschnittliches Larvengewicht der Kontrolle}}$$

$$\text{Überlebensrate in \%} = \frac{\text{Anzahl der überlebenden Larven der Probe} \times 100}{\text{Anzahl der überlebenden Larven der Kontrolle}}$$

### 2.8.2. Antibiotische und fungizide Aktivität

Zur Untersuchung einer antibiotischen Aktivität wurden Extrakte und Reinsubstanzen dem sogenannten Agarplattendiffusionstest unterzogen. In diesem Test wurden folgende Stämme von Mikroorganismen verwendet.

Gram positive Bakterien:

*Bacillus subtilis* 168

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Gram-negative Bakterien:

*Escherichia coli* ATC 25922

*Escherichia coli* HB 101

Pilze

*Candida albicans*

### **2.8.2.1. Kulturmedien**

Der Agarplattendiffusionstest wurde nach den Angaben von Bauer und Kirby (1966) durchgeführt.

Zunächst wurden die zu testenden Bakterienstämme in Müller-Hinton-Bouillon als Nährmedium inkubiert, die Kultur wurde anschließend vier Stunden im Schüttler bei 36°C bebrütet. Die jeweiligen Stammkulturen wurden mit einer NaCl-Lösung (0.9%) auf den BaCl<sub>2</sub> - Trübungsstandard 80.5 ml 1 % BaCl<sub>2</sub> und 99.5 ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verdünnt. Schließlich wurden Müller-Hinton-Agarplatten mit den eingestellten Bakterienkulturen beimpft.

100 µg der zu testenden Substanzen wurden in Methanol gelöst auf ein Filterpapierblättchen (20µl) pipettiert. Zur Kontrolle wurde auf ein Filterpapierblättchen 20 µl reines MeOH ohne jegliche Substanz gegeben. Nach dem Trocknen wurden die Filterpapierblättchen auf die Agarplatten mit den Bakterienkulturen gegeben. Die Bakterienkulturen wurden bei 37 °C im Kulturschrank 24 Stunden bebrütet. Der entstandene Hemmhof um die Blättchen bei aktiven Substanzen wurde vermessen, die Blättchen selbst hatten einen Durchmesser von 5 mm.

### **2.8.3. Untersuchungen mit *Artemia salina***

Untersuchungen am Salinenkrebs *Artemia salina* wurden nach der Methode von Meyer (1982) durchgeführt. Die Kultivierung von *Artemia salina* erfolgte in künstlich hergestelltem Meerwasser in einem belüfteten Inkubator bei Raumtemperatur. 36-48h nach Einbringen der Eier in das Meerwasser schlüpfen die Larven, die für die Aktivitätstests verwendet wurden.

Zur Durchführung des Tests wurde die gewünschte Konzentration der zu testenden Substanz oder des Extraktes in ein Gläschen überführt. Das Lösungsmittel wurde durch Trocknen unter Stickstoff entfernt, oder durch Trocknen in einem Exsikator. Nach dem Trocknen wurden die zu testenden Substanzen in 25 µl DMSO gelöst. Zur Kontrolle wurden einige Gläschen ohne Substanz mit 25 µl DMSO vorbereitet. Die Lösung der zu testenden Substanzen und die Kontrollen wurden mit Seewasser zu je 5 ml verdünnt. In jedes Gläschen wurden 20 frischgeschlüpfte Nauplien gesetzt. Nach 24 h wurden die überlebenden Tiere gezählt und bei nennenswerter Aktivität der LC<sub>50</sub>-Wert berechnet.

### **2.8.4. Zytotoxizitätstest**

Zytotoxizitätstests wurden bei Herrn Dr. Klaus Steube an der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig durchgeführt. Für die Tests wurden die humane Leukämiezelllinie U-937 [Sundstrom and Nilsson., 1976], MONO-Mac-6 Zellen [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988], JURKAT-Zellen [Schneider *et al.*, 1977] und die THP-1 -Zelllinie [Tsuchiya *et al.*, 1980] eingesetzt. Die Zelllinien wurden in Plastikflaschen (Nunc, Wiesbaden) angezogen. Alle verwendeten Zelllinien wurden mit standardisierten Medien angezogen, die Anzucht erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37°C in einer Atmosphäre, die 5% CO<sub>2</sub> enthielt.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden zunächst gefriergetrocknet und in Ethylen-glykol-monomethyl-ether (EGMME) gelöst. Falls EGMME kein geeignetes Lösungsmittel war, konnte auch DMSO verwendet werden. Die gelöste Substanz

wurde zum RPM 1-1640 Kulturmedium hinzugegeben. Für die Kontrollen betrug die Konzentration an EGMME oder DMSO im Medium 0.1 %.

Für die Zytotoxizitätstests wurden während der exponentiellen Wachstumsphase Zellen aus dem Medium entnommen, gewaschen und in frisches Medium überführt. Dieses wurde bebrütet, bis eine Zelldichte zwischen  $2$  und  $4 \times 10^5$  Zellen/ml erreicht war.

Die Zelldichte wurde in einer Zählkammer nach Anfärben mit Tryptophan blau festgestellt.

Von der jeweiligen Zellsuspension wurden  $90 \mu\text{l}$  pro Bohrung einer Mikrotiterplatte (96 Bohrungen) gegeben. Hinzugefügt wurden  $10 \mu\text{l}$  Medium, das im Kontrollfall mit 0.1 % DMSO oder EGMME versetzt war, oder die zu testenden Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen in  $10 \mu\text{l}$  Medium gelöst zugegeben.

Nach 48 h Inkubation wurde die Zytotoxizität der Substanz durch den MTT assay [Steube *et al*, 1998] oder den Thy assay bestimmt. Hierzu wurde radioaktives ( $^3\text{H}$ )-Thymidin zu den Proben gegeben und für die letzten 3 Stunden der 48 Stunden dauernden Inkubationszeit den noch lebenden Zellen Zeit gegeben, radioaktives Thymidin in die Zelle einzubauen. Ausgezählt wurden die Zellen mit einem Zählgerät (1209 Rackbeta, LKB), das die Radioaktivität der noch lebenden Zellen registrierte.

Die durchgeführten Experimente wurden jeweils dreifach parallel bei jeder Konzentration angesetzt und dreimal wiederholt. Als Kontrolle diente die schon beschriebene Konzentration von 0.1 % DMSO oder EGMME im Medium.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf der Suche nach neuen, biologisch aktiven Verbindungen aus dem mediterranen Schwamm *Aplysina aerophoba* zunächst neun Pilzstämme, sowie aus dem indonesischen Schwamm *Pseudoceratina purpurea* fünf verschiedene Pilzstämme isoliert. Einige Stämme wurden nach Sichtung durch Dr. Schaumann ausgewählt, um von diesen Stämmen eine Standkultur anzulegen. Aus diesen Standkulturen wurden nach mehrwöchiger Inkubation die von den Pilzen gebildeten Sekundärstoffe gewonnen. Die Strukturen der isolierten Verbindungen wurden aufgeklärt, und eine mögliche biologische Aktivität wurde mit verschiedenen Screeningstests untersucht.

Im Laufe der Arbeit wurden weitere Pilzstämme aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* herangezogen, der an unterschiedlichen Standorten im Mittelmeer (Südfrankreich, Elba) gesammelt wurde. Von den isolierten Pilzen wurden kleine Standkulturen angelegt und diese im Screening untersucht, sowie HPLC Chromatogramme erstellt, um die Inhaltsstoffe von Pilzen derselben Art von unterschiedlichen Standorten vergleichen zu können.

#### 3.1. Bearbeitete Pilzstämme

Von den aus *Aplysina aerophoba* herangezogenen Pilzen wurden *Microsphaeropsis* sp., *Hortaea werneckii*, *Cladosporium herbarum* und *Phomopsis* sp. untersucht. Weitere Stämme aus *Aplysina aerophoba* wurden mittels einiger Bioscreenings im Hinblick auf ihre Aktivität eingestuft. Aus dem indonesischen Schwamm *Pseudoceratina purpurea* wurde der isolierte Pilz *Penicillium citreonigrum* untersucht. Für den Vergleich von Inhaltsstoffen aus Pilzen von unterschiedlichen Standorten wurden drei Stämme von *Cladosporium herbarum* aus Schwammproben unterschiedlicher Standorte isoliert, sowie drei Stämme von *Penicillium citreonigrum*. Die Stämme von *Cladosporium herbarum* und *Penicillium citreonigrum* wurden mittels HPLC und LC-MS verglichen.

### 3.1.1. Screeningtests isolierter Schwamm-assoziiierter Pilze

Neben den bearbeiteten Pilzstämmen, die aufgrund ihres Wuchses, ihres Habitus und aufgrund ihrer Inhaltstoffmuster in der HPLC ausgewählt wurden, wurden weitere isolierte Pilzstämmen aus *Aplysina aerophoba* in einigen Biotests untersucht. Auf diese Weise sollten aktive Extrakte gefunden werden, um zu entscheiden, welche Stämme bei wachsender Stammsammlung für eine Inkubation in größerem Stil geeignet waren. Bei der Bewertung der Ergebnisse wurde der Insektizidtest höher eingestuft als der Agarplattendiffusionstest, der wiederum höher eingestuft wurde als der „brine shrimp assay“. Der „brine shrimp assay“ war bei der Bewertung der Ergebnisse unter den anderen Tests angesiedelt, da es ein unspezifischer Test ist und lediglich eine allgemeine zytotoxische Wirkung angezeigt wird. Der Insektizidtest liefert dagegen spezifischere Ergebnisse, wie Erfahrungen gezeigt haben. Aufgrund des Screenings mit einigen wenigen Bakterienstämmen und einem Pilzstamm wurde der Antibiotikatest dazwischen angesiedelt.

#### 3.1.1.1. Screeningtest auf insektizide Aktivität

Um eine potenzielle insektizide Wirkung von Sekundärstoffen aus marinen Pilzen zu untersuchen, wurden die Rohextrakte einiger Standkulturen im Fraßversuch an *Spodoptera littoralis* getestet. Für diesen Screeningtest wurden jeweils 5 mg und 10 mg des zu untersuchenden Rohextraktes in ein Kunstfutter (3.75 g Frischgewicht) eingearbeitet. Auf dieses Kunstfutter wurden 20 frischgeschlüpfte Raupen (Neonates) des Falters *Spodoptera littoralis* gesetzt. Details sind unter Material und Methoden nachzulesen. Nach sechs Tagen wurde die Überlebensrate der Raupen bestimmt.

Identifiziert wurden die meisten untersuchten Pilzstämmen bislang noch nicht, eine Identifizierung erfolgte in der Regel erst mit der Isolierung von Inhaltstoffen aus dem entsprechenden Stamm.

Tab. E1: Ergebnisse des Insektizidtestes

Pilzstamm	5 mg Überlebenrate in [%]	10 mg Überlebensrate in [%]
SI *	0	0
SI 1*	80	90
SI 2*	85	15
SI 3*	75	70
SI 4*	100	100
SI 5*	75	75
Schw 1*	100	50
Schw-A1*	80	75
Schw- A3*	90	95
VA1 <sup>φ</sup>	100	75
VAV 2a <sup>φ</sup>	80	55
VA 2a/a <sup>φ</sup>	80	40
VA 5c <sup>φ</sup>	80	80
VA 7 <sup>φ</sup>	100	80
<i>Cladosporium herbarum</i>	70	50
7 <sup>+</sup>	90	85
8 <sup>+</sup>	70	75
<i>Phomopsis</i> sp. <sup>+</sup>	80	70
<i>Hotaea werneckii</i>	75	75
17 <sup>+</sup>	100	85

\* Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1998

φ Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1999

+ Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Banyuls-sur-Mer 1996

Im Insektizidtest zeigten die meisten untersuchten Rohextrakte aus den untersuchten Pilzstämmen keine oder nur eine schwache Aktivität. Der Stamm SI zeigte eine sehr starke Aktivität, der Stamm SI 2 eine deutliche Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse stellen diese beiden Stämme laut Insektizidtest Kandidaten für weitere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Inhaltstoffe dar.

### 3.1.1.2. Screeningtest auf antibiotische Aktivität

Um eine mögliche antibiotische Aktivität zu untersuchen, wurden sowohl die Rohextrakte einiger Pilzkulturen, als auch später einige isolierte Reinsubstanzen im Agarplattendiffusionstest untersucht. Dazu wurden jeweils 125 µg des zu untersuchenden Extraktes eingesetzt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zonen einer Wachstumsinhibition (Hemmhof) vermessen. Genaue Bedingungen sind dem Material und Methodenteil dieser Arbeit zu entnehmen.

Tab. E2: Ergebnisse des Antibiotikatests mit *Streptomyces aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Escherichia coli* (EC) und *Candida albicans* (CA). Die Durchmesser der Hemmzonen sind in mm angegeben.

Pilzstamm	SA	BS	EC	CA
SI *	30	30	40	11
SI 1*	7	10	0	0
SI 2*	8	9	0	7
SI 3*	0	0	0	0
SI 4*	8	10	0	0
SI 5*	0	8	0	8
Schw 1*	7	9	0	0
Schw-A1*	9	10	0	7
Schw- A3*	7	6	0	0
VA1 <sup>φ</sup>	8	8	0	7
VAV 2a <sup>φ</sup>	7	12	0	10
VA 2a/a <sup>φ</sup>	7	7	0	7
VA 5c <sup>φ</sup>	11	10	0	12
VA 7 <sup>φ</sup>	0	0	0	0
<i>Cladosporium herbarum</i>	7	7	0	0
7 <sup>+</sup>	8	8	0	0
8 <sup>+</sup>	0	11	0	7
<i>Phomopsis</i> sp. <sup>+</sup>	9	15	0	0
<i>Hortaea werneckii</i>	10	10	0	14
17 <sup>+</sup>	7	7	0	12

\* Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1998

<sup>φ</sup> Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1999

<sup>+</sup> Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Banyuls-sur-Mer 1996

Im antibiotischen Test zeigen die meisten untersuchten Pilzstämme keine oder nur eine sehr schwache antibiotische Aktivität gegenüber den verwendeten Bakterienstämmen sowie gegenüber *Candida albicans*. Lediglich der Stamm SI zeigte hier gegen die untersuchten Bakterienstämme eine nennenswerte Aktivität. Da dieser Stamm auch schon im Insektizidtest eine Aktivität aufwies wird, er für eine Isolierung von Inhaltsstoffen noch interessanter. Der Stamm SI 2 zeigte in diesem Test dagegen keine Aktivität.

### **3.1.1.3. Ergebnisse des „brine shrimp assays“**

Zur Untersuchung einer allgemeinen zytotoxischen Wirkung wurden die Rohextrakte der Standkulturen im sogenannten „brine shrimp assay“ getestet.

Zur Durchführung des Screenings wurden je 500 µg oder 1.0 g Rohextrakt in 5 ml künstlichem Meerwasser gelöst. Anschließend wurden jeweils 20 frischgeschlüpfte Nauplien des Salinenkrebses *Artemia salina* hinzugegeben. Nach 24 Stunden Wartezeit wurden die überlebenden Larven bestimmt. Im Falle einer nennenswerten Aktivität wurde die entsprechende Probe in einem neuen Ansatz wiederholt getestet und die EC<sub>50</sub>-Werte berechnet.

Tab. E3: Ergebnisse des „*brine shrimp assays*“. Eingesetzt wurden ausschließlich isolierte Pilzstämme aus *Aplysina aerophoba*

Pilzstamm	Überlebensrate in [%] bei 500 µg	Überlebensrate in [%] bei 1 mg
SI *	100	100
SI 1*	100	100
SI 2*	100	100
SI 3*	100	100
SI 4*	100	100
SI 5*	100	100
Schw 1*	100	100
Schw-A1*	100	100
Schw- A3*	100	100
VA1 <sup>φ</sup>	100	100
VAV 2a <sup>φ</sup>	100	100
VA 2a/a <sup>φ</sup>	100	100
VA 5c <sup>φ</sup>	100	100
VA 7 <sup>φ</sup>	100	100
<i>Cladosporium herbarum</i>	80	70
7 <sup>+</sup>	100	100
8 <sup>+</sup>	100	100
<i>Phomopsis</i> sp. <sup>+</sup>	100	100
<i>Hortaea werneckii</i>	55	25
17 <sup>+</sup>	100	100

\* Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1998

φ Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Elba 1999

+ Stämme isoliert aus *Aplysina aerophoba*, gesammelt bei Banyuls-sur-Mer 1996

Im „*brine shrimp assay*“ konnte bei den meisten untersuchten Stämmen keine Aktivität festgestellt werden. Nur bei *Cladosporium herbarum* und *Hortaea werneckii* zeigte sich eine Aktivität. Bei *Cladosporium herbarum* fiel die Aktivität schwach aus, bei *Hortaea werneckii* fiel sie stärker aus.

### **3.1.2. Auswahl von Pilzstämmen zur Isolierung von Sekundärstoffen**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pilzstämmen wurden nicht nur nach Aktivitätskriterien ausgewählt. Zum einen konnten bei Beginn dieser Arbeit noch nicht alle beschriebenen Assays eingesetzt werden, zudem standen zunächst weniger als 10 Pilzstämmen zur Verfügung. So wurden zunächst mit Hilfe von Mykobiologen vom Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung Stämme ausgewählt, die gut zu kultivieren waren und Sekundärmetabolite anreicherten. Die auf diese Weise ausgewählten Stämme wurden auf ihre Sekundärstoffe hin untersucht, um zunächst zu klären ob marine schwamm-assoziierte Pilze eine lohnende Quelle von Sekundärstoffen darstellten. Als es sich abzeichnete, dass viele neue Naturstoffe zu erwarten waren, wurden weitere Stämme isoliert und die Screeningverfahren eingeführt, um nach Stämmen zu forschen, die reichlich Sekundärmetaboliten produzierten und eine Aktivität zeigten. Die untersuchten Stämme *Microsphaeropsis* sp., *Cladosporium herbarum*, *Hortaea werneckii* und *Penicillium citreonigrum* gehörten jedoch noch zur "ersten Generation" von Pilzen, die primär aufgrund ihrer Anreicherung von Sekundärmetaboliten ausgewählt wurden. Sofern möglich, wurden die Stämme später jedoch noch den Screeningtests unterzogen.

### **3.2. Isolierung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen**

Aus den bereits beschriebenen Standkulturen (siehe Material und Methoden) wurden die Rohextrakte gewonnen, indem das Medium mit Ethylacetat mehrfach im Verhältnis von 1:1 ausgeschüttelt wurde. Der Ethylacetatextrakt wurde mit Wasser gewaschen, um die Salze aus dem Meerwassermedium zu entfernen. Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt wurde durch weitere Ausschüttelverfahren, oder durch Flüssigkeitschromatographie weiter aufgereinigt. Welche Aufreinigungsschritte im Detail zur Anwendung kamen, hing von der Zusammensetzung des jeweiligen Extrakts ab, der mittels HPLC untersucht wurde.

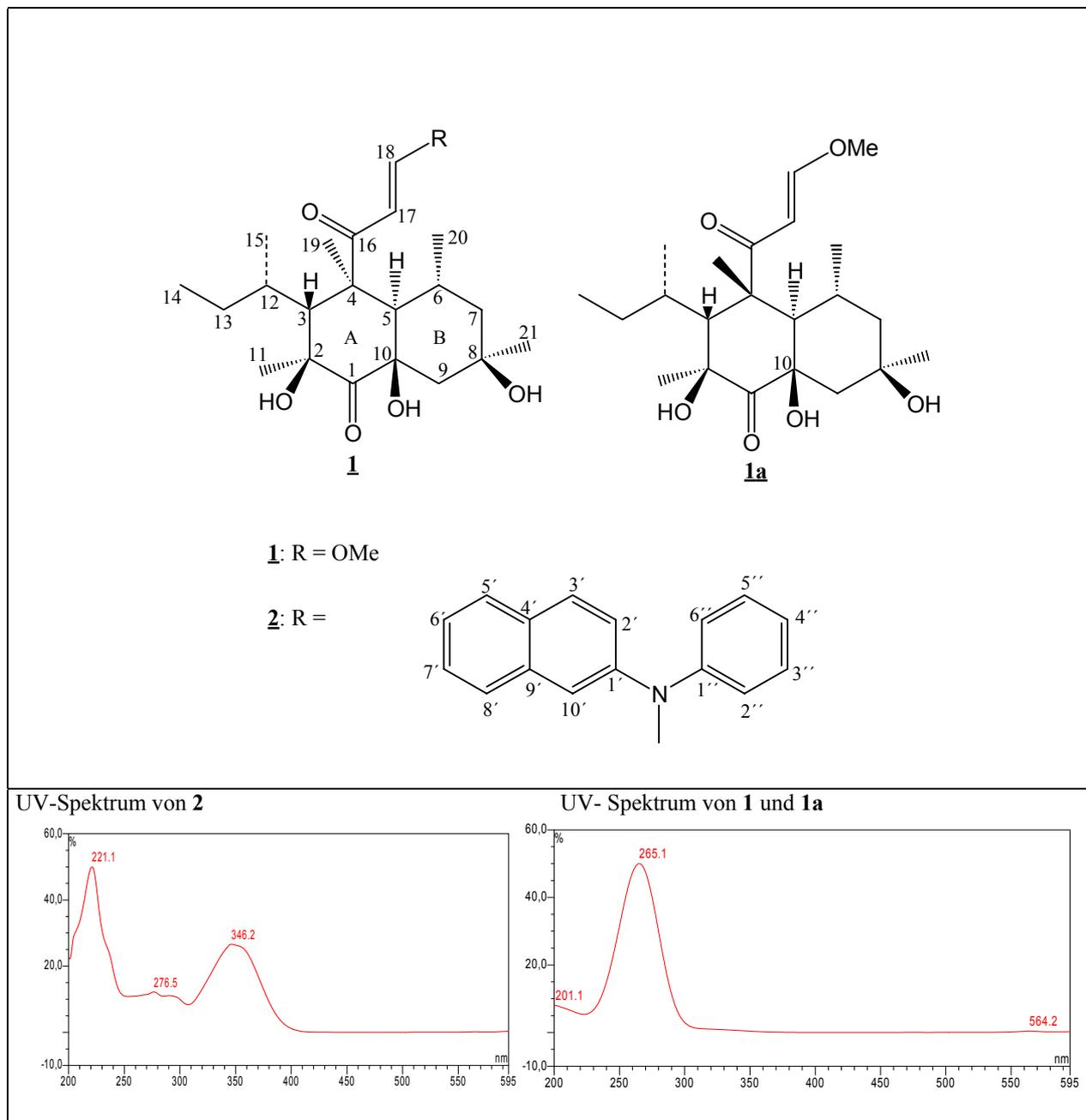
### **3.2.1. Isolierung und Identifizierung der Inhaltsstoffe aus *Microsphaeropsis* sp.**

Die Gattung *Microsphaeropsis* gehört zur Ordnung Sphaeropsidales. Es sind 146 Formgattungen mit mehreren tausend Arten bekannt [Wartenberg, 1979]. Die Gattung *Microsphaeropsis* beinhaltet hauptsächlich saprophytische Pilze.

Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete Kultur zeigte eine kräftige braune Farbe. Die kommt durch eine Einlagerung von braunen Pigmenten in die hyalinen Hyphen zustande, die mit dem Altern der Kultur schnell zunimmt, so dass die Kultur schließlich einen rostbraunen Farbton aufweist. Die Kultur zeigt dabei eine samtige Oberfläche. Ein optimales Wachstum wurde bei Raumtemperatur erzielt. *Microsphaeropsis* sp. wurde nach Rücksprache mit Dr. K. Schaumann vom Alfred Wegener Institut für Polar und Meeresforschung ausgewählt. Dabei war besonders wichtig, dass es sich bei diesem Pilzstamm sehr wahrscheinlich um einen obligat marinen Pilz handelte, außerdem ließen Voruntersuchungen auf ein interessantes Inhaltstoffmuster schließen. Ein Bioscreening des Rohextraktes erfolgte nicht, da einige der beschriebenen Tests noch nicht zur Verfügung standen und die Frage nach neuen Naturstoffen aus marinen Pilzen im Vordergrund stand, sowie die Frage ob es Gemeinsamkeiten mit den bereits bekannten Substanzen aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* gab. Später konnte das Screening leider nicht mehr nachgeholt werden, da der Stamm mutierte, was zu einem komplett anderen Inhaltstoffmuster führte.

#### **3.2.1.1. Betaenone und Anthrachinone aus *Microsphaeropsis* sp.**

Bereits während der Diplomarbeit wurde damit begonnen, *Microsphaeropsis* sp. auf seine Inhaltsstoffe hin zu untersuchen [Brauers, 1998]. Dabei konnten zwei neue Betaenonderivate (**1**, **2**) sowie einige Anthrachinone (**5**, **6**, **7**, **8**) isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Die Identifizierung der isolierten Substanzen erfolgte mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden und der Massenspektrometrie.

**Abb. E1:** Strukturen und UV/VIS Spektren der Betaenone **1**, **1a** und **2**

Weitere Untersuchungen am Betaenonderivat **1** im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass es sich bei der isolierten Verbindung um ein Gemisch von zwei Stereoisomeren im Verhältnis von 2:1 handelte (**1**, **1a**). Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um mehr über die Konfiguration der isolierten Betaenone herauszufinden. Die relative Konfiguration von **1** wurde mit Hilfe eines ROESY-Experimentes, sowie mit Hilfe der entsprechenden Kopplungskonstanten bestimmt. Dabei ergab sich für den B-Ring eine Sesselkonformation, die an den axialen

Kopplungskonstanten zwischen H-5 und H-6 sowie H-6 und H-7<sub>ax</sub> abgelesen werden konnte. Hinzu kam auch noch eine longe-range W-kopplung zwischen H-7<sub>eq</sub> und H-9<sub>eq</sub>. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Untersuchung der NOE's im ROESY Spektrum von H-5 zu H-7<sub>ax</sub>, H-9<sub>ax</sub>, Me-11, Me-19 und Me-20.

Der NOE zwischen den Resonanzen H-5 und Me-11 zeigt eine "Twisted "-Konformation für den A-Ring an, wie sie auch bereits in früheren Untersuchungen [Pathirana *et al.*, 1992, Cheng *et al.*, 1994, Varoglu *et al.*, 1997] zur Konformation von Betaenonen beschrieben wurde.

Trotz einiger Versuche war es nicht möglich die bereits oben erwähnten Stereoisomere **1** und **1a** aufzutrennen. Trotzdem konnten durch Vergleich der NMR Daten die entscheidenden Unterschiede detektiert werden. Ein Unterschied in der Konfiguration zwischen den beiden Substanzen **1** und **1a** konnte am Stereozentrum an Position C-4 ausgemacht werden. Bei der Hauptkomponente **1** war der langkettige Substituent äquatorial orientiert, was einen entschirmenden Effekt von 0.6 ppm auf die Position C-5 zur Folge hatte. Im Falle einer axialen Orientierung an Position C-16 wie bei **1a** wird sie durch die axiale Hydroxyl-Gruppe an C-10 entschirmt, was zu einer Verschiebung von ca. 11 ppm führt. Dies findet sich in **3** (Vergleichssubstanz aus der Literatur) aber auch in **1a**. Die Konfigurationen an den Stereozentren C-3 und C-4 sind im Falle von **1a** identisch wie in den bereits beschriebenen Betaenonen **3** und **4** (Vergleichssubstanzen). Dies konnte durch den Vergleich der NMR Daten von **1a** mit denen von bereits veröffentlichten Betaenonen festgestellt werden. Die absolute Stereochemie für **1** und **1a** an Position C-12 konnte mit den vorhandenen Daten nicht geklärt werden. Die NMR Daten sind in den Tabellen E4 und E5 zu finden.

Das Betaenonderivat **2** trug mit der *N*-2-Naphthyl-*N*-phenylamino-Gruppe einen ungewöhnlichen Substituenten. Hier stellte sich bald die Frage, ob ein Naturstoff oder ein Artefakt isoliert worden war. Deshalb wurde der Rohextrakt auf *N*-Phenyl-2-naphthylamin, das kommerziell erhältlich ist, hin untersucht. Weder im Rohextrakt noch im Anzuchtmedium des Pilzes konnte *N*-Phenyl-2-naphthylamin oder eine ähnliche Substanz gefunden werden, was nahelegte, dass **2** ein echter Naturstoff ist und keine Artefaktbildung während der Isolation von Sekundärstoffen vorliegt.

Ergebnisse

Abb. E2: Vergleichssubstanzen **3** und **4** sowie die relative Konfiguration von **1**

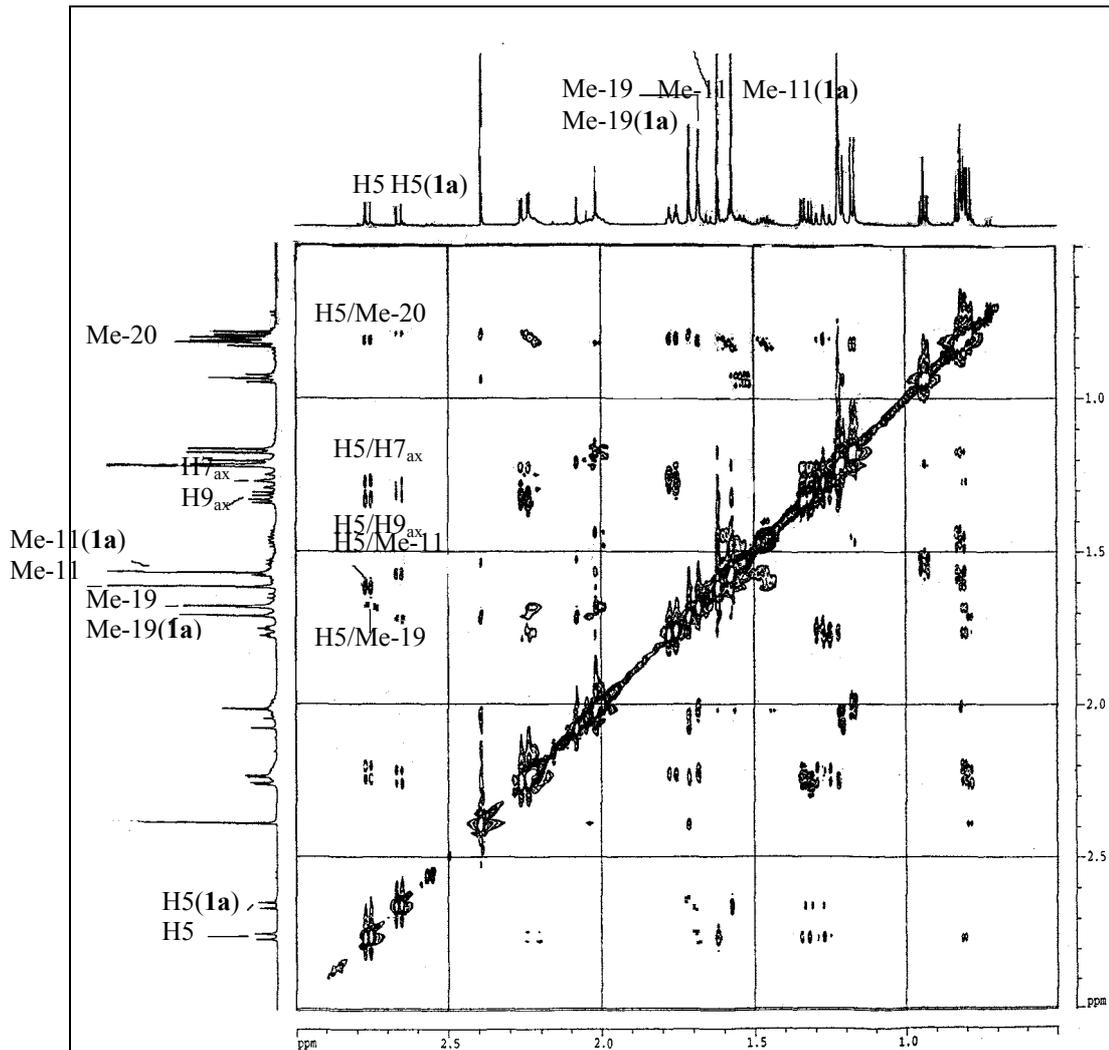
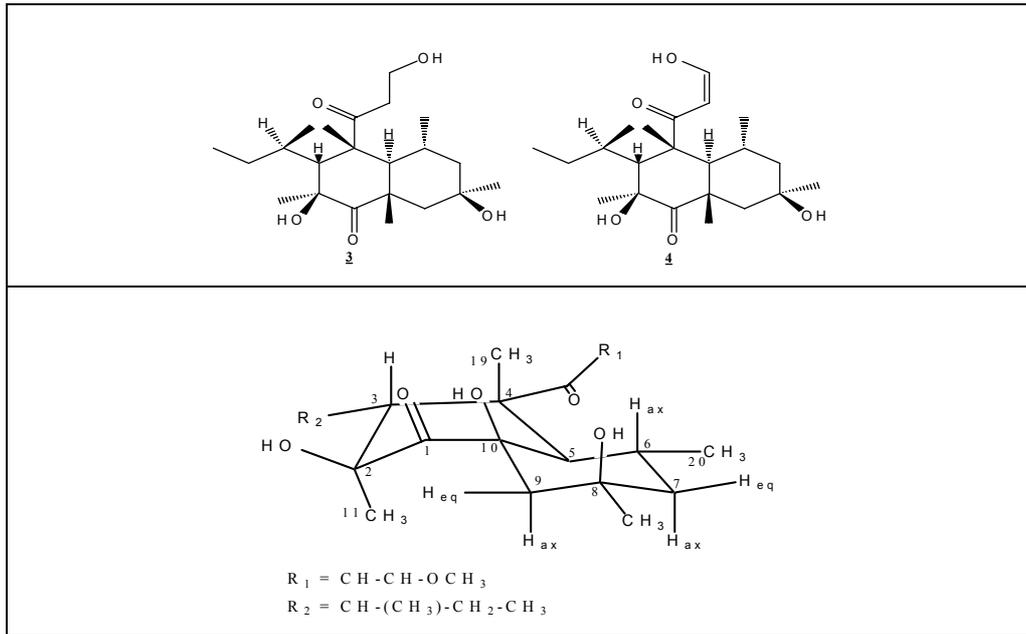


Abb. E3: ROESY der Betaenonderivate **1** und **1a**

Ergebnisse

Tab. E4:  $^{13}\text{C}$  NMR Daten der Betaenone **1**, **1a**, **2** und der Vergleichssubstanz **3**

C-Position	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	214.2 (s)	213.8 (s)	214.3 (s)	217.6 (s)
2	79.1 ((s))	78.9 (s)	79.2 (s)	73.3 (s)
3	56.6 (d)	56.6 (d)	56.6 (d)	57.3 (d)
4	53.1 (s)	54.3 (s)	52.7 (s)	52.9 (s)
5	49.3 (d)	49.9 (d)	49.4 (d)	46.6 (d)
6	27.2 (d)	27.1 (d)	27.3 (d)	29.1 (d)
7	49.8 (t)	49.8 (t)	50.0 (t)	47.7 (t)
8	72.0 (s)	71.9 (s)	72.1 (s)	68.7 (s)
9	45.8 (t)	45.7 (t)	46.0 (t)	43.9 (t)
10	77.7 (s)	77.6 (s)	77.8 (s)	40.3 (d)
11	24.5 (q)	24.4 (q)	24.7 (q)	23.9 (q)
12	36.8 (d)	36.7 (d)	36.8 (d)	35.8 (d)
13	26.2 (t)	26.2 (t)	26.3 (t)	25.1 (t)
14	14.0 (q)	14.1 (q)	14.4 (q)	13.6 (q)
15	23.8 (q)	23.9 (q)	23.7 (q)	23.4 (q)
16	206.5 (s)	217.4 (s)	205.6 (s)	216.9 (s)
17	103.7 (d)	103.2 (d)		
18	165.5 (d)	149.3 (d)		
19	21.4 (q)	21.8 (q)	21.5 (q)	20.4 (t)
20	22.5 (q)	22.1 (q)	22.3 (q)	21.5 (t)
21	30.8 (q)	30.8 (q)	30.8 (q)	31.1 (q)
22	58.8 (q)	58.8 (q)		
1'			135.4 (s)	
2'			142.8 (s)	
3'			123.5 (d)	
4'			131.1 (d)	
5'			133.0 (d)	
6'			128.9 (d)	
7'			127.4 (d)	
8'			128.2 (d)	
9'			128.7 (d)	
10'			135.4 (s)	
1''			145.2 (s)	
2''			128.2 (d)	
3''			131.2 (d)	
4''			128.1 (d)	
5''			131.2 (d)	
6''			128.2 (s)	

**1**, **1a** und **2** wurden in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz aufgenommen. **2** wurde zusätzlich bei 500 MHz aufgenommen.

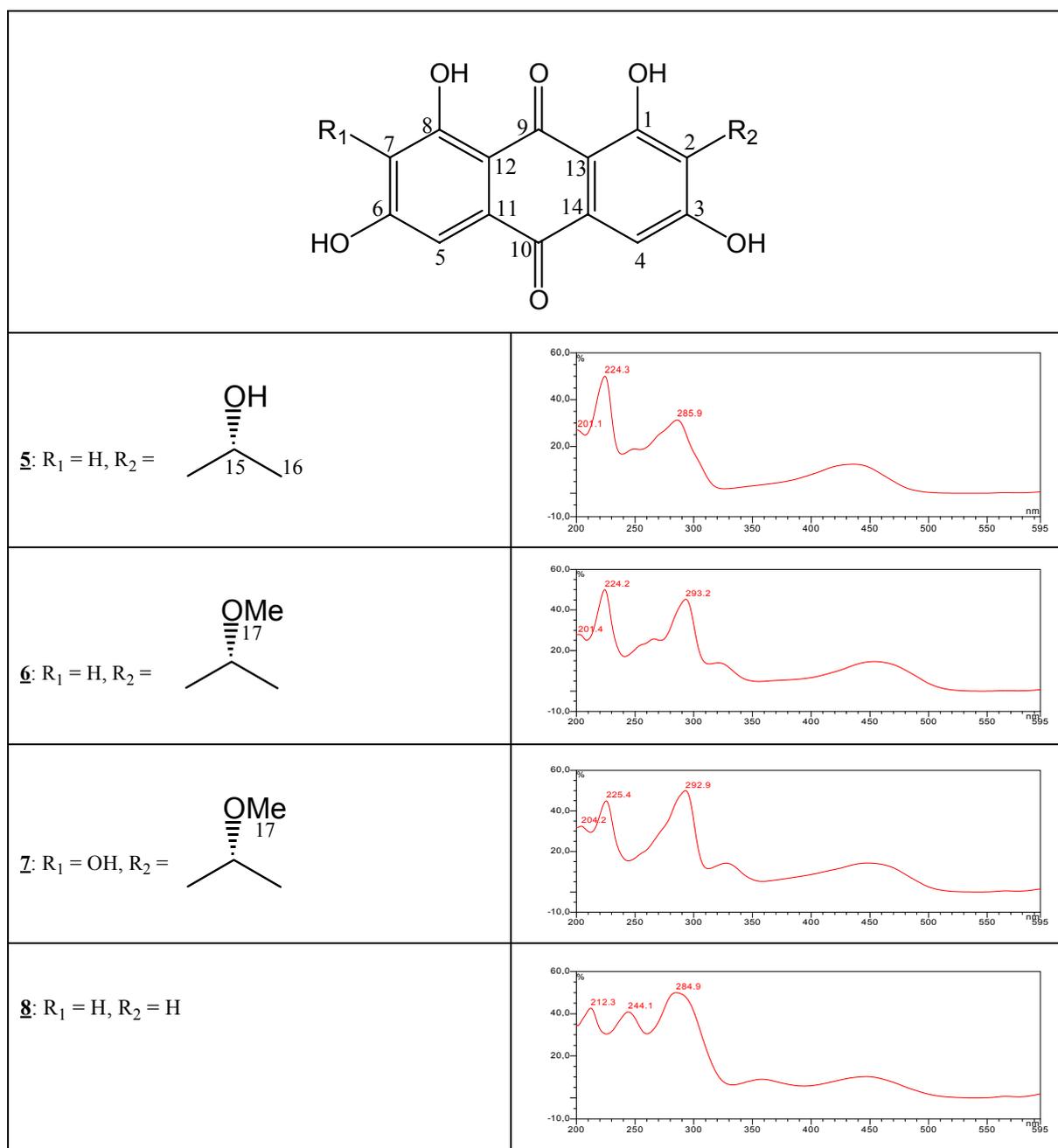
Ergebnisse

Tab. E5:  $^1\text{H}$  NMR Daten der Betaenone **1**, **1a**, **2** und der Vergleichssubstanzen **3** und **4**

H-Position	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
3	2.02 (s)	2.09 (s)	1.86 (s)		
5	2.76 (d 10.9 Hz)	2.66 (d 10.9 Hz)	2.77 (d 10.9 Hz)	2.49 (dd 14.0 Hz, 11.0 Hz)	2.58 (dd 12.7 Hz 9.8 Hz)
6	2.16 (m)	2.16 (m)	2.12 (m)		
7 <sub>eq</sub>	1.76 (dt 13.8 Hz 3.2 Hz)	1.76 (dt 13.8 Hz 3.2 Hz)	1.73 (dt 13.7 Hz, 3.3 Hz)		
7 <sub>ax</sub>	1.31 (dd 14.0 Hz 9.5 Hz)	1.31 (dd 14.0 Hz 9.5 Hz)	1.72 m		
9 <sub>eq</sub>	2.25 (d 14.4 Hz)	2.25 (d 14.4 Hz)	2.18 (dd 14.4 Hz, 2.9 Hz)	2.31 (dt 14.0 Hz 3.0 Hz)	2.33 (ddd 13.7 Hz, 3.4 Hz, 3.7 Hz)
9 <sub>ax</sub>	1.33 (d 14.3 Hz)	1.33 (d 14.3 Hz)	1.30 (d 14.3 Hz)		
10				2.66 (ddd 14.0 Hz, 11 Hz, 3.0 Hz)	
11-Me	1.62 (s)	1.57 (s)	1.64 (s)	1.57 (s)	1.61 (s)
12	1.94 (m)	1.94 (m)	1.79 (m)		
13	1.53 (m)	1.53 (m)	1.50 (m)		
14-Me	0.82 (t 7.3 Hz)	0.94 (t 7.0 Hz)	0.90 (t 7.3 Hz)	0.86 (t 7.0 Hz)	0.74 (d 6.8 Hz)
15-Me	1.17 (d 7.0 Hz)	1.21 (d 7.0 Hz)	1.06 (d 7.0 Hz)	1.15 (d 8.8 Hz)	1.12 (d 6.8 Hz)
17	6.30 (d 12.0 Hz)	6.30 (d 12.0 Hz)	5.83 (d 12.7 Hz)	2.82 (dt 18.0 Hz, 3.0 Hz)	5.89 (d 4.9 Hz)
18	7.63 (d 12.0 Hz)	7.63 (d 12.0 Hz)	8.28 (d 12.7 Hz)	3.11 (dq 18.0 Hz, 3.0 Hz)	7.74 (d 4.9 Hz)
19-Me	1.68 (s)	1,71 (s)	1.30 (s)	1.40 (s)	1.36 (s)
20-me	0.81 (d 6.5 Hz)	0.80 (d 6.5 Hz)	0.84 (d 6.6 Hz)	0.67 (d 6.4 Hz)	0.79 (t 7.3 Hz)
21-Me	1.22 (s)	1.22 (s)	1.17 (s)	1.16 (s)	1.26 (s)
22-OCH <sub>3</sub>	3.83 (s)	3.83 (s)			
2'			7.26 (d 8.8 Hz)		
3'			7.94 (d 8.8 Hz)		
5'			7.89 (d 8.6 Hz)		
6'			7.49 (m)		
7'			7.53 (m)		
8'			7.80 (d 7.3 Hz)		
10'			7.60 (s)		
2''			7.21 (d 8.0 Hz)		
3''			7.51 (m)		
4''			7.35 (m)		
5''			7.51 (m)		
6''			7.21 (d 8.0 Hz)		

**1**, **1a** und **2** wurden in CD<sub>3</sub>OD bei 300 MHz aufgenommen. **2** wurde zusätzlich bei 500 MHz aufgenommen.

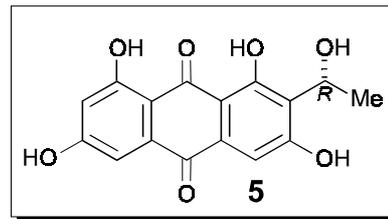
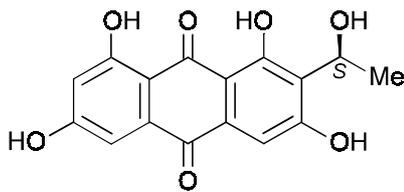
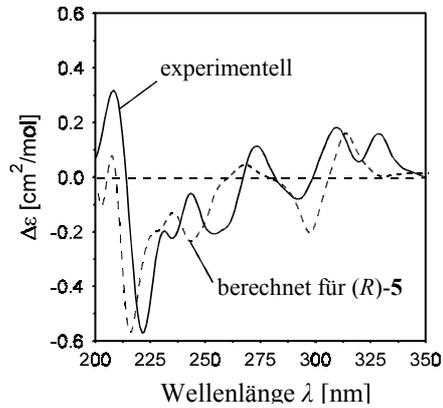
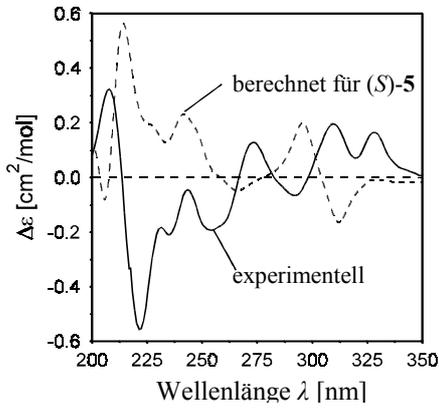
Neben den Betaenonderivaten wurden bereits während der Diplomarbeit einige Anthrachinone aus dem Pilz *Microsphaeropsis* sp. isoliert, von denen es sich bei dreien um neue Verbindungen (**5**, **6**, **7**) handelte sowie um das bereits beschriebene Rheoemodin (**8**). Nach der Strukturaufklärung wurde nun die absolute Konfiguration der 1, 3, 6, 8-Tetrahydroxyanthraquinone **5** und **6** durch Vergleich von experimentellen CD-Spektren mit berechneten CD-Spektren erstellt.



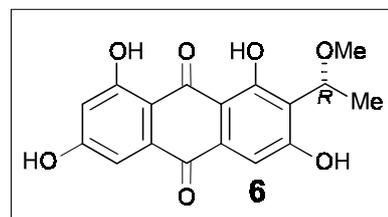
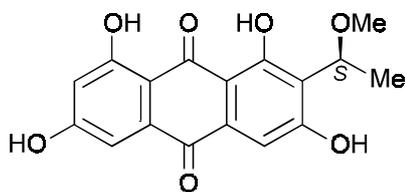
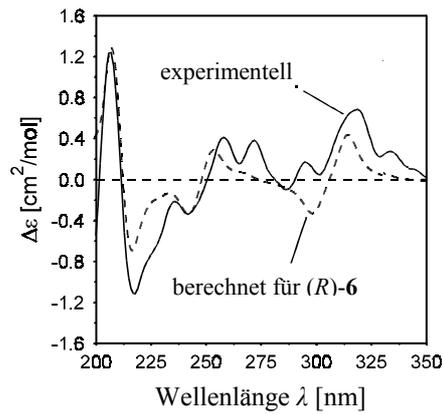
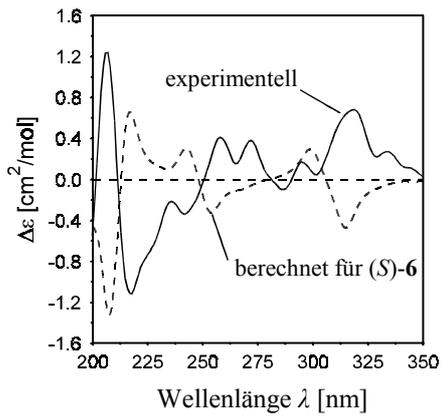
Die quantenchemischen Berechnungen der CD Spektren erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bringmann am Institut für Organische Chemie in Würzburg.

Die experimentellen sowie die berechneten CD Spektren für die beiden möglichen Enantiomere sind in **Abb. E4** dargestellt.

Abb. E4: Vergleich der CD-Spektren von 5 und 6



**Absolute Konfiguration  
des Naturstoffes**



**Absolute Konfiguration  
des Naturstoffes**

Der Vergleich der gemessenen CD Spektren der beiden Anthrachinone **5** und **6** mit den berechneten Spektren für beide möglichen Enantiomere zeigt eindeutig, dass in beiden Fällen eine *R*-Konfiguration an C-17 vorliegt.

### 3.2.2. Strukturaufklärung der Substanzen aus *Hortaea werneckii*

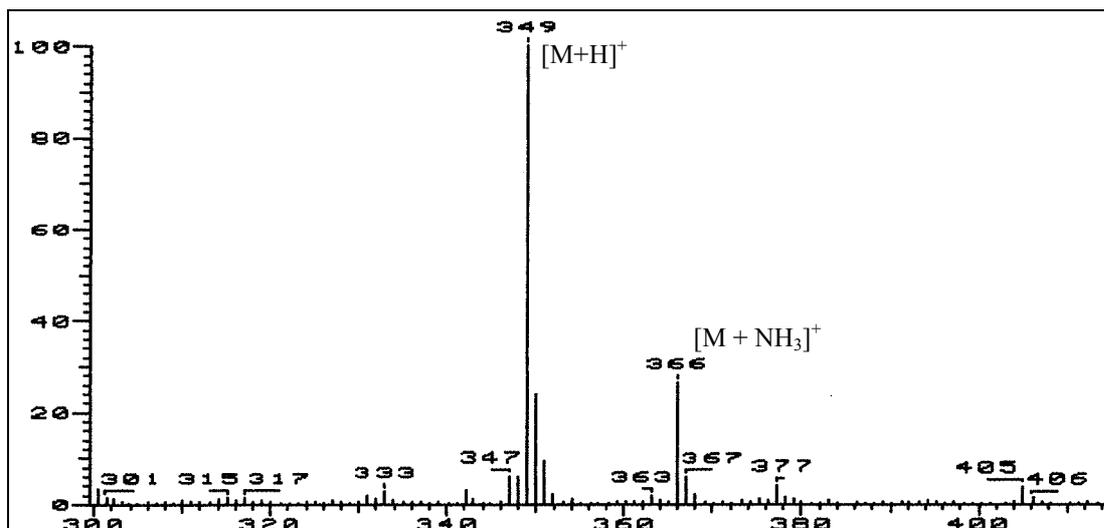
Der Pilz *Hortaea werneckii* ist als möglicher Auslöser von Tinea nigra beim Menschen bekannt [Uijthof *et al.*, 1994]. Neben pathogenen Stämmen sind auch nichtpathogene Stämme beschrieben worden [Uijthof *et al.*, 1994], die in verschiedenen Lebensräumen in der Umwelt gefunden werden können. Auch hohe Salzkonzentrationen scheinen diesem Pilz nichts auszumachen [De Hoog, Gerrits van den Ende, 1992].

Das vorliegende aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* erhaltene Isolat wächst nur sehr langsam auf Agarplatten und in Flüssigkultur. Auf Platten zeigte das Isolat eine typische dunkelbraune bis schwarzbraune Färbung. Aufgrund der Färbung wird *Hortaea werneckii* auch als "black yeast" bezeichnet. Zog man den isolierten Stamm auf Platten an, drangen die Hyphen des Pilzes tief in den Agar ein und ähnelten dann den Wurzeln eines Baumes. Bei Flüssigkulturen bildete der Pilz auf der Oberfläche einen dunkelbraunen bis schwarzbraunen Belag aus.

Aufgrund des langsamen Wachstums konnte bei *Hortaea werneckii* relativ wenig Biomasse extrahiert werden, was nur die Isolierung der Hauptkomponente zuließ, die laut HPLC einen Anteil von 78% im Rohextrakt ausmachte. Ein Chromatogramm des Rohextraktes ist im Anhang zu finden.

Die Strukturaufklärung des gewonnenen Horteins (**9**) wurde mit Hilfe von ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt. Weiterhin wurde die Massenspektrometrie unter Einsatz von verschiedenen Ionisierungsmethoden herangezogen.

Durch die EI-Massenspektrometrie konnte ein Molekulargewicht von 348 festgestellt werden. Eine CI-MS Messung betätigte diese Masse. Hierbei wurde neben  $m/z$  349 ( $[M+H]^+$ ) auch ein das Ion  $m/z$  366 ( $[M+NH_3]^+$ ) detektiert. Im negativen FAB-MS erschien das Ion  $m/z$  347 ( $[M-H]^-$ ) ebenso wie im negativen ESI-MS. Details der MS Daten sind in im Anhang nachzulesen.



**Abb. E5:** CI - MS vom Hortein (9)

Die Summenformel der Verbindung wurde als  $C_{20}H_{12}O_6$  mit Hilfe von HR-ESI-MS bestimmt. Dabei ergab sich eine Präzisionsmasse (experimentell) von  $m/z$  347.07190 für  $[M-H]^-$  errechnet wurde für  $C_{20}H_{13}O_6$  ( $[M+H]^+$ ) eine Masse von 349.0634 g/mol.

Aus der Summenformel ergaben sich für das Hortein 15 Doppelbindungsäquivalente. Die Struktur des Horteins wurde mit Hilfe von 1D  $^1H$  und  $^{13}C$  NMR sowie 2D COSY und HMBC NMR Experimenten aufgeklärt.

Im  $^1H$  NMR Spektrum von Hortein waren vier Dubletts im aromatischen Bereich zu finden. Außerdem zeigten sich zwei Triplets bei 3.08 und 3.18 ppm, sowie das Signal einer OH- Gruppe bei 13.50 ppm. Im aromatischen Bereich konnten mit Hilfe des COSY Spektrums zwei Paare von ortho-ständigen Protonen ausgemacht werden, bei denen es sich um H-10 und H-11 bzw. H-15 und H-16 handelte. Mit Hilfe der HMBC Korrelationen zeigte sich, dass die beschriebenen Paare von ortho-ständigen Wasserstoffatomen zu einem 12,14-Dihydroxynaphtalen gehören, das an den Positionen C-9 und C-17 weitere Substituierungen aufweist (Teilstruktur II).

Die beiden Triplets im  $^1H$  NMR-Spektrum bei 3.08 ppm und 3.18 ppm konnten einem 2,3-Dihydro-1,4-naphtoquinon System (Teilstruktur I) zugeordnet werden, wie HMBC Korrelationen von H-2 zu C-19 und von H-3 zu C-5 deutlich machten. Untermuert wurde dies noch durch HMBC Korrelationen der OH-Gruppe an C-6 zu C-4, C-5, C-6 und C-7. Eine Verknüpfung der beiden beschriebenen Partialstrukturen konnte durch

die  $^3J_{H,C}$  HMBC Korrelationen von H-10 zu C-18 und von H-16 zu C-18 nachgewiesen werden.

### Hortein (9)

**Beschreibung:** braun-grüne Pulverige Substanz

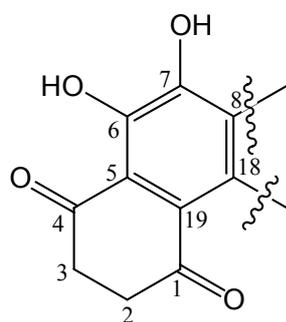
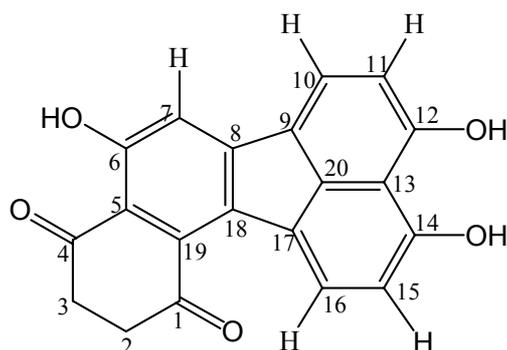
**Probencode:** NAB 132

**Substanzmenge:** 42.0 mg

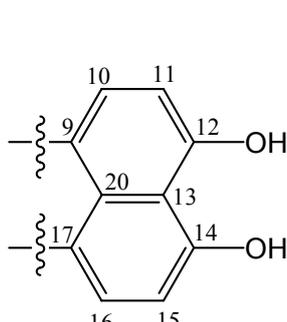
**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

**Molekulargewicht:** 348 g/mol

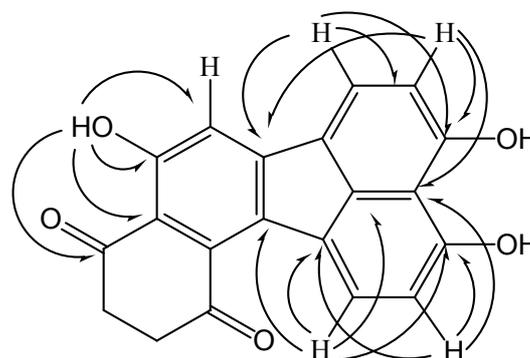
**Quellorganismus:** *Hortaea werneckii*



I



II



HMBC-Kopplungen

Teilstrukturen I und II

Retentionszeit: 30.52

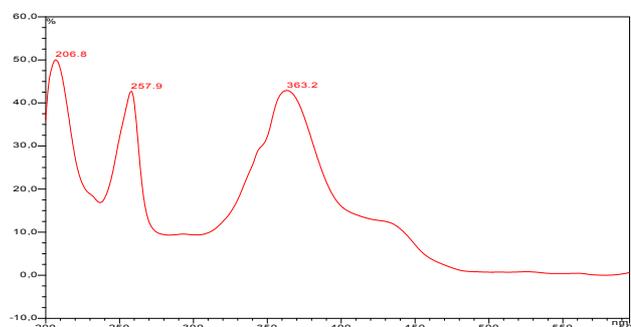
R<sub>f</sub>-wert: 0.3

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz (366 nm): -

+ Anisaldehyd: braun

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



EI-MS (*m/z*, rel. Int.): 348 [M]<sup>+</sup> (100), 319 (14), 292 (10), 235 (8), 208 (10)

CI-MS (*m/z*, rel. Int.): 366 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (32), 349 [M+H]<sup>+</sup> (100)

(-)-FAB-MS (*m/z*, rel. Int.): 347 [M-H]<sup>-</sup> (52), 346 (38), 307 (26), 305 (100)

(-)-ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 347 [M-H]<sup>-</sup> (100), 283 (17), 277 (30), 235 (11)

Die deutlich stärkere Verschiebung ins tiefe Feld von H-16 (9.02 ppm) im Vergleich zu H-10 (8.25 ppm) konnte durch die räumliche Nähe der Carbonylgruppe an C-1 erklärt werden.

Hortein besitzt mit der beschriebenen Struktur ein Acenaphto [1',2':7,8]naphatalen Ringsystem, welches recht ungewöhnlich ist. Strukturell verwandte Verbindungen sind unter den Naturstoffen nur wenige zu finden. Unter den wenigen verwandten Naturstoffen zeigen das Bulgarhodin [Edwards, 1976] und das 1,2,7,8-Tetrahydro-4,7,8,9-tetrahydroxybenzo[j]fluoranthren-3(6bH)-on [Wrigley, 2001] die größten Übereinstimmungen zum Hortein. Unter den synthetischen Verbindungen hat das [1',2':7,8]naphth[1,2-*b*] eine große Ähnlichkeit zum Hortein. Hortein stellt damit einen weiteren neuen Naturstoff dar, der für Naturstoffe bis dato selten vorkommende Strukturelemente enthält. Hortein wurde in Hinblick auf seine antibiotische und insektizide Wirkung hin getestet, zeigte jedoch dort leider keine nennenswerte Aktivität. Damit scheint für die im Rohextrakt im Insektizidtest beobachtete Aktivität eine andere Komponente verantwortlich zu sein. Im „*Brine Shrimp Assay*“ überlebten bei einer Konzentration von 500 µg 17 von 20 Nauplien, die Aktivität vom Hortein fiel damit geringer aus als die des Rohextraktes. In einem Test gegen verschiedene Enzyme, die bei Entzündungen eine Rolle spielen, zeigte Hortein gegen 3 $\alpha$ - Hydroxisteroiddehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD), ein Enzym, an dem nicht steroidale Entzündungshemmer getestet werden, eine Aktivität.

Ergebnisse

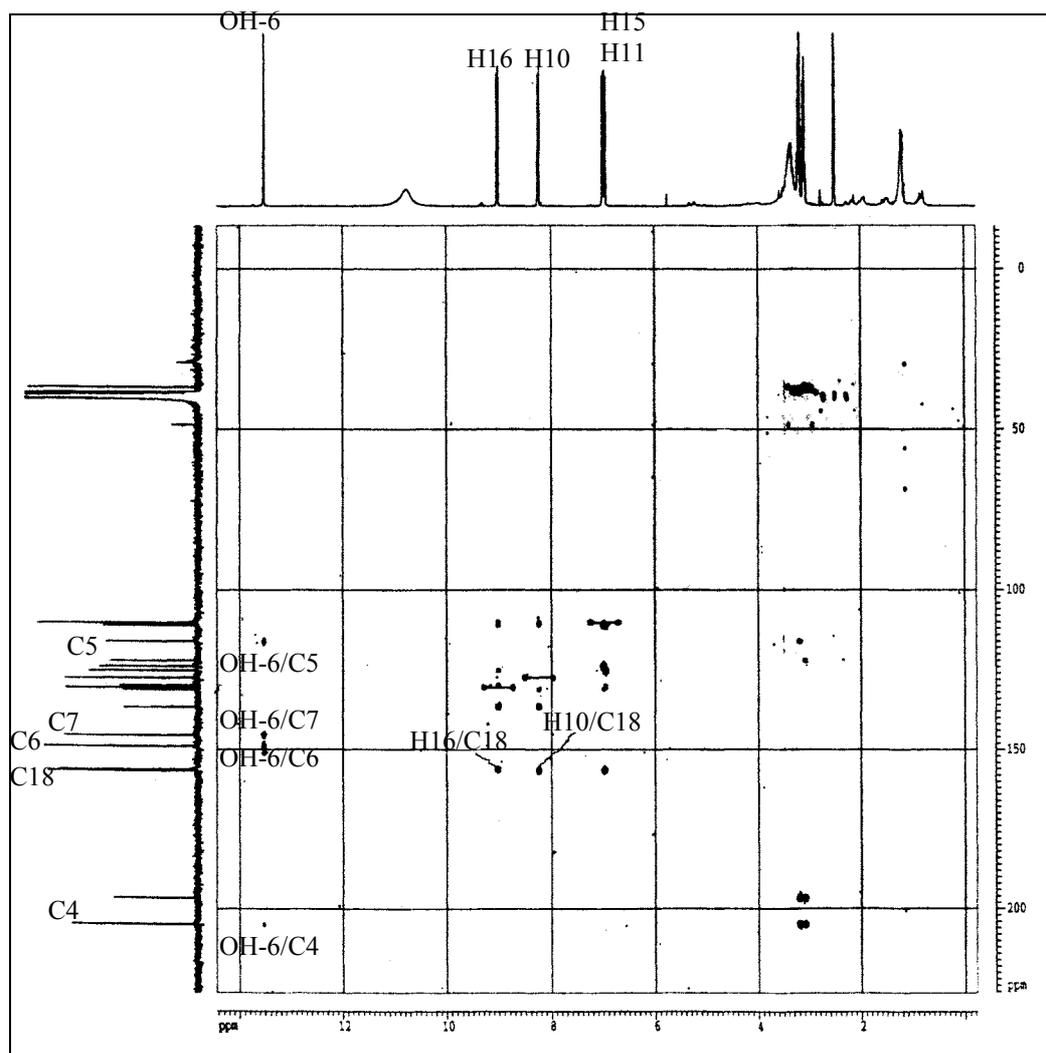


Abb. E6: HMBC mit wichtigen Kopplungen vom Hortein (9)

Ergebnisse

Tab. E6: NMR Daten von Hortein (**9**) aufgenommen auf in DMSO-d<sub>6</sub> bei 300 MHz (<sup>1</sup>H) und 75 MHz (<sup>13</sup>C).

Position	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC (H-C)
1	196.6 (s)		
2	36.8 (t)	3.08 (t 7.0 Hz)	C1, C2*, C3, C4, C19
3	38.3 (t)	3.18 (t 7.0 Hz)	C1, C2*, C3, C4, C5
4	204.9 (s)		
5	116.0 (s)		
6	148.9 (s)		
7	145.4 (s)		
8	131.1 (s)		
9	123.8 (d)		
10	110.1 (d)	8.25 (d 7.8 Hz)	C8, C10*, C11, C12, C20
11	110.1 (s)	6.99 (d 7.8 Hz)	C9, C11*, C12, C13
12	156.6 (s)		
13	111.0 (s)		
14	156.1 (d)		
15	110.2 (d)	6.96 (d 8.2 Hz)	C13, C14, C15, C17
16	130.5 (s)	9.02 (d 8.2 Hz)	C14, 16*, C17, c18, C20
17	125.2 (s)		
18	129.9 (s)		
19	122.1 (s)		
20	136.6 (s)		
OH-6		13.50	C4, C5, C6, C7
OH-18		12.80	

\* C-H direkt Korrelationen

### 3.2.3. Isolierung und Identifizierung von Sekundärstoffen aus *Cladosporium herbarum*

Pilze der Gattung *Cladosporium*, auch die Art *Cladosporium herbarum*, wurden schon oft mit unterschiedlicher Zielsetzung untersucht. In einigen Biotests wurden Pilze der Gattung *Cladosporium* als Testobjekt für Naturstoffe in Bezug auf ihre fungizide Wirkung eingesetzt. Der Pilz *Cladosporium herbarum* ist ubiquitär verbreitet, seine Sporen können weltweit in der Luft nachgewiesen werden [Seeliger, 1981]. Er wird sowohl in terrestrischen Habitaten als auch in marinen Lebensräumen [Namboori, 1980] angetroffen.

Überleben kann er auf unterschiedlichsten Substraten. Gewöhnlich kommt er auf verschiedensten Oberflächen vor, kann aber auch Pflanzen, z.B. Getreide [Domsch *et al.*, 1980] besiedeln, wo er zum Schädling werden kann. Aufgrund seiner Robustheit ist *Cladosporium herbarum* in der Lage, auch in extremen Lebensräumen wie in Wüsten, Tundren, und Salzmarschen zu überleben [Domsch *et al.*, 1980].

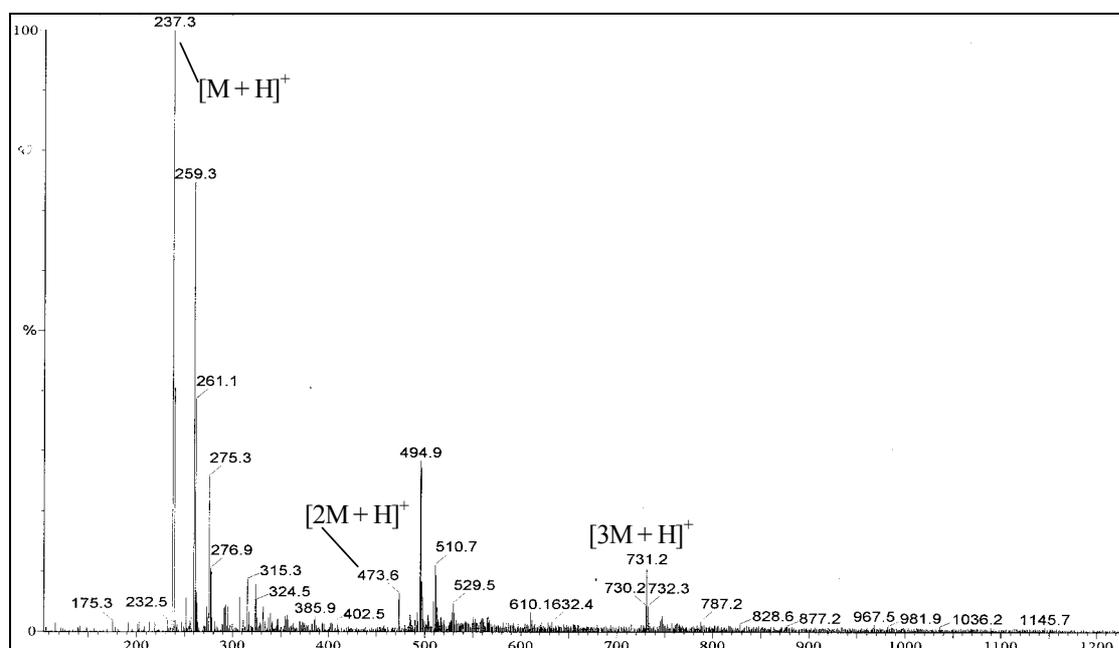
Der in dieser Arbeit beschriebene Stamm von *Cladosporium herbarum* stammt ebenfalls, wie die schon beschriebenen Pilze, aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba*. In der Kultur zeigt *Cladosporium herbarum* auf Agarplatten bei Raumtemperatur ein zügiges Wachstum. Es entwickeln sich dichte samtartige Kolonien, die zu einem Rasen konfluieren. Anfangs ist die Kolonie blassgelbgrün gefärbt. Schon nach wenigen Tagen entwickelt sich eine olivgrüne Farbe, die durch eine zunehmende Pigmentierung der Hyphen zustande kommt.

#### 3.2.3.1. Pyrone aus *Cladosporium herbarum*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus dem Pilz *Cladosporium herbarum* fünf Verbindungen isoliert und die Strukturen aufgeklärt. Weitere Verbindungen lagen vor, konnten jedoch nicht in ausreichender Menge für eine Strukturaufklärung isoliert werden. Bei allen fünf aufgeklärten Verbindungen handelte es sich um Pyranderivate. Herbarin A (**10**) und Herbarin B (**11**) stellten sich als neue Verbindungen heraus, Citreoviridin (**12**) war bereits bekannt, wurde aber zum ersten Mal aus *Cladosporium herbarum* beschrieben [Jadulco *et al.*, 2001]. Microsphaeron B (**13**) und A (**14**) wurden erstmals aus *Cladosporium herbarum* beschrieben, waren

aber bereits aus demselben *Microsphaeropsis* sp. isoliert worden, der auch im Rahmen dieser Arbeit beschrieben worden ist. Der bereits untersuchte Stamm hatte zwischenzeitlich eine Mutation durchlaufen und zeigte bei einer erneuten Untersuchung ein ganz anderes Spektrum an Inhaltsstoffen.

Zur Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurden die NMR-Daten untereinander verglichen sowie mit denen von Citreoviridin, das bereits bekannt war. Für Herbarin A wurde durch MS-Messungen ein Molekulargewicht von 236 festgestellt. Durch HR-ESI-MS konnte eine Summenformel von  $C_{12}H_{12}O_5$  bei 237.0763 g/mol für  $[M+H]^+$  errechnet werden, was 7 Doppelbindungsäquivalenten entspricht.



**Abb. E7:** ESI-MS von Herbarin A (**10**) im positiven Modus

Mit Hilfe des  $^{13}C$  NMR und eines DEPT Spektrums konnten fünf Methingruppen, eine Methoxyl- und eine Methyl-Gruppe detektiert werden. Im aromatischen Bereich des  $^{13}C$  NMR Spektrums konnten fünf weitere C-Atome nachgewiesen werden. Zwei davon mussten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung (172.6 ppm, 169.7 ppm) eine Carbonylfunktion, eine Carbonsäure oder eine Esterfunktion tragen. Die drei verbleibenden Kohlenstoffatome mussten aufgrund ihrer Verschiebung einen Sauerstoffsubstituenten tragen. Bei diesen Signalen wurde aufgrund der berechneten Doppelbindungsäquivalente deutlich, dass ein Ring vorliegen musste.

Bei den vorliegenden Daten konnte es sich nur um einen  $\alpha$ -Pyrnonring handeln, was sich durch Vergleich mit Literaturwerten bestätigte.

## Herbarin A (10)

Beschreibung: farblose feste Substanz

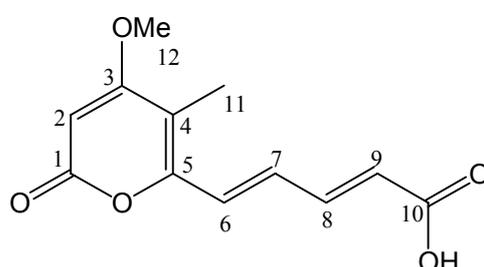
Probencode: NAB 133

Substanzmenge: 9.8mg

Summenformel:  $C_{12}H_{12}O_5$

Molekulargewicht: 236 g/mol

Quellorganismus: *Cladosporium herbarum*



Retentionszeit: 23.0

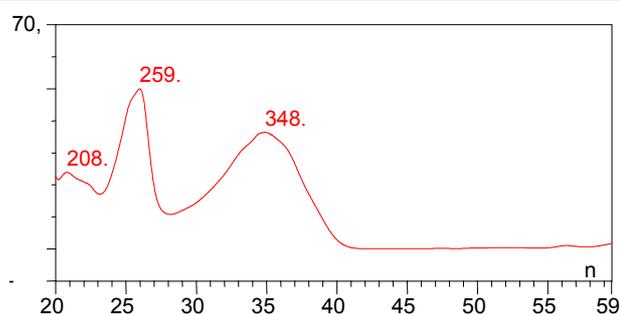
R<sub>f</sub>-wert: 0.4

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: orange-braun

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



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 211 [2M+K]<sup>+</sup> (13), 495 [2M+Na]<sup>+</sup> (24), 275 [M+K]<sup>+</sup> (23), 259 [M+Na]<sup>+</sup> (75), 237 [M+H]<sup>+</sup> (100)

(-) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 235 [M-H]<sup>+</sup>, (100), 191 (18), 113 (38)

Im <sup>1</sup>H NMR war deutlich das System von zwei konjugierten Doppelbindungen zu erkennen. Die Kopplungskonstanten 15.0 Hz bzw. 15.2 Hz machten klar, dass sie *all-trans* vorliegen. Diese kurze Kette (R-CH-CH-CH-CH-R) ist an der einen Seite mit der Position C-5 des  $\alpha$ -Pyrnonringes verknüpft, wie Kopplungen im HMBC von H-6 und H-7 zu C-5 zeigten. Auf der anderen Seite endet die Seitenkette in einer Carbonsäure, was HMBC Kopplungen von H-8 und H-9 zu C-10 zu entnehmen ist.

Die Struktur des  $\alpha$ -Pyronringes wurde durch Vergleich mit Literaturdaten, insbesondere mit den bereits publizierten Daten des Citreoviridins ermittelt. Die genaue Struktur des Pyronringes konnte über die HMBC-Korrelationen der entsprechenden Substituenten untersucht werden. Die Methylgruppe zeigt Korrelationen zu C-3, C-4 und C-5. Da C-5, neben der Seitenkette, aufgrund seiner chemischen Verschiebung einen Sauerstoff tragen musste und C-3 eine Methoxygruppe trug, wie an einer HMBC Kopplung von dieser Methoxygruppe zu C-3 abgelesen werden konnte, musste die Methylgruppe an Position C-4 sein. Die Position von H-2 wurde schließlich durch HMBC Korrelationen zu C-1 und C-4 bestätigt. Damit war laut Strukturformel nur noch ein Doppelbindungsäquivalent übrig, womit unabhängig vom Vergleich mit den Daten des Citreoviridins klar wurde, dass zwischen C-5 und C-1 ein Ringschluss über ein Sauerstoffatom erfolgen musste, womit der  $\alpha$ -Pyronring komplett war.

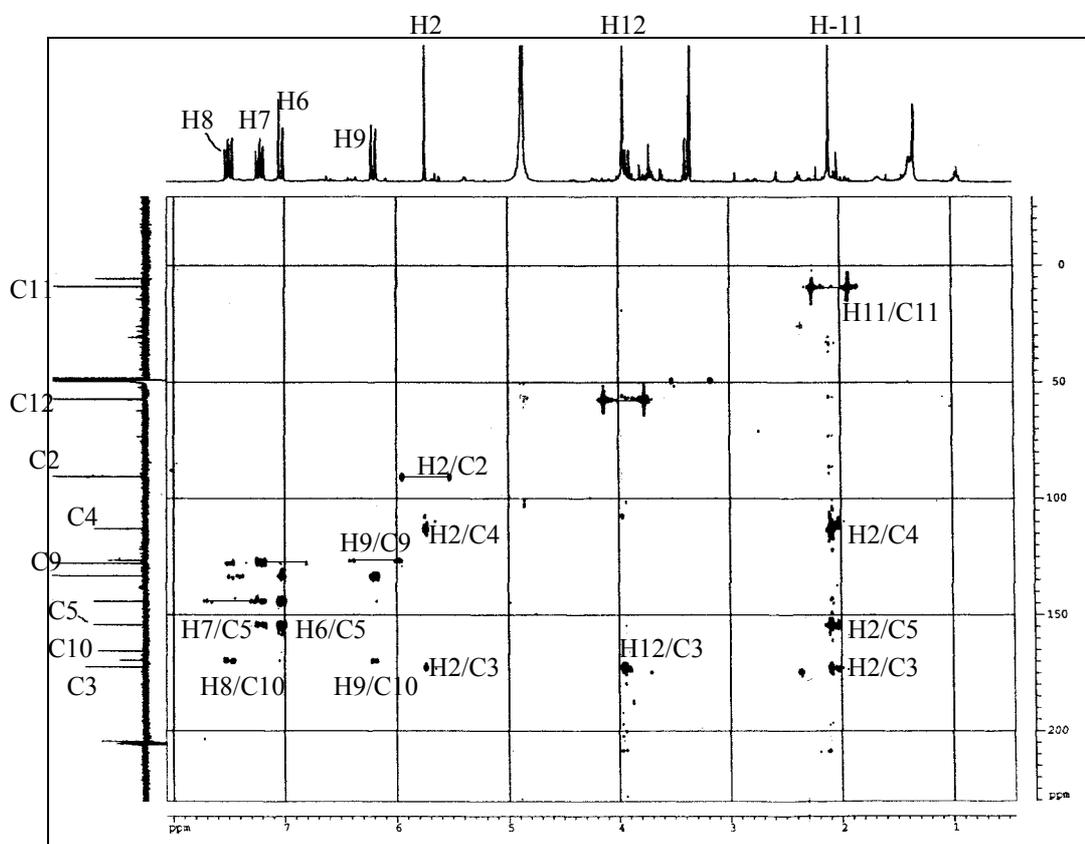


Abb. E8: HMBC Kopplungen von Herbarin A (10)

Ergebnisse

Tab. E7:  $^1\text{H}$  Daten von Herbarin A und Herbarin B, sowie HMBC-Korrelationen von Herbarin B aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 600 MHz (Herbarin-A) und 300 MHz.  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten wurden in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 100 MHz aufgezeichnet

Pos	Herbarin-A			Herbarin-B	
	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMBC	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
1	165.9 (s)			172.1 (s)	
2	90.6 (d)	5.74 (s)	C1, C4	91.9 (d)	5.81 (s)
3	172.6 (s)			165.1 (s)	
4	112.9 (s)			110.5 (s)	
5	154.3 (s)			152.6 (s)	
6	126.7 (d)	7.03 (d 15.0 Hz)	C5, C7, C8	125.3 (d)	7.5 (d 15.4 Hz)
7	133.4 (d)	7.22 (dd 15.0 Hz, 11.4 Hz)	C5, C6, C8	132.3 (d)	6.64 (d 15.4 Hz)
8	144.3 (d)	7.50 (dd 11.3 Hz, 15.2 Hz)	C7, C9, C10	169.0 (s)	
9	127.9 (d)	6.20 (d 15.2 Hz)	C7, C10	9.3 (q)	2.13 (s)
10	169.7 (s)			57.5 (q)	3.97 (s)
11	9.1 (q)	2.09 (s)	C3, C4, C5		
12	57.4 (q)	3.95 (s)	C3		

## Ergebnisse

Herbarin B (**11**) wurde als weißes homogenes Pulver isoliert. Durch ESI-MS konnte ein Molekulargewicht von 210 bei einem  $m/z$  von 211  $[M+H]^+$  festgestellt werden. Durch HR-EI-MS ergab sich eine Summenformel von  $C_{10}H_{10}O_5$ , was 6 Doppelbindungsäquivalenten entspricht, genau eins weniger, als beim Herbarin A.

### Herbarin B

Beschreibung: farblose feste Substanz

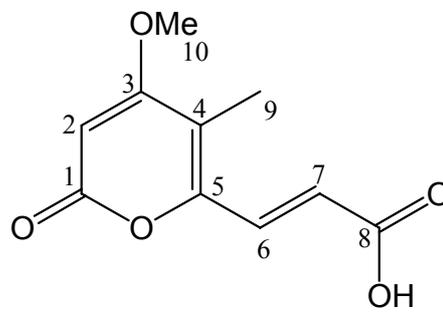
Probencode: NAB 140

Substanzmenge: 6.4 mg

Summenformel:  $C_{10}H_{10}O_5$

Molekulargewicht: 211 g/mol

Quellorganismus: *Cladosporium herbarum*



Retentionszeit: 19.9

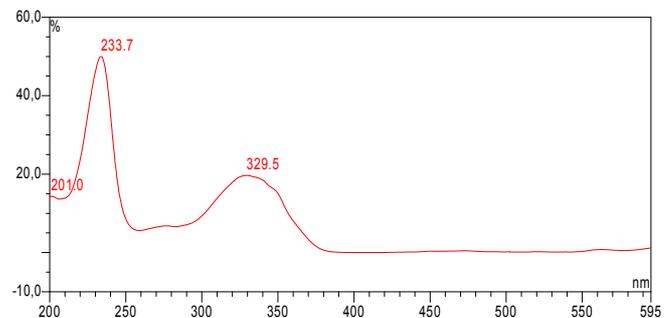
R<sub>f</sub>-wert: 0.35

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

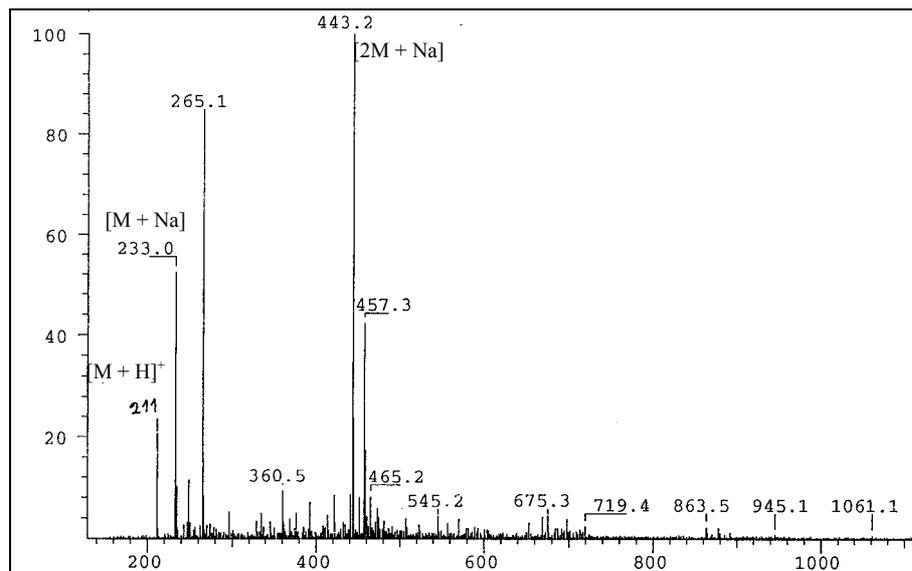
+ Anisaldehyd: orange-braun

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



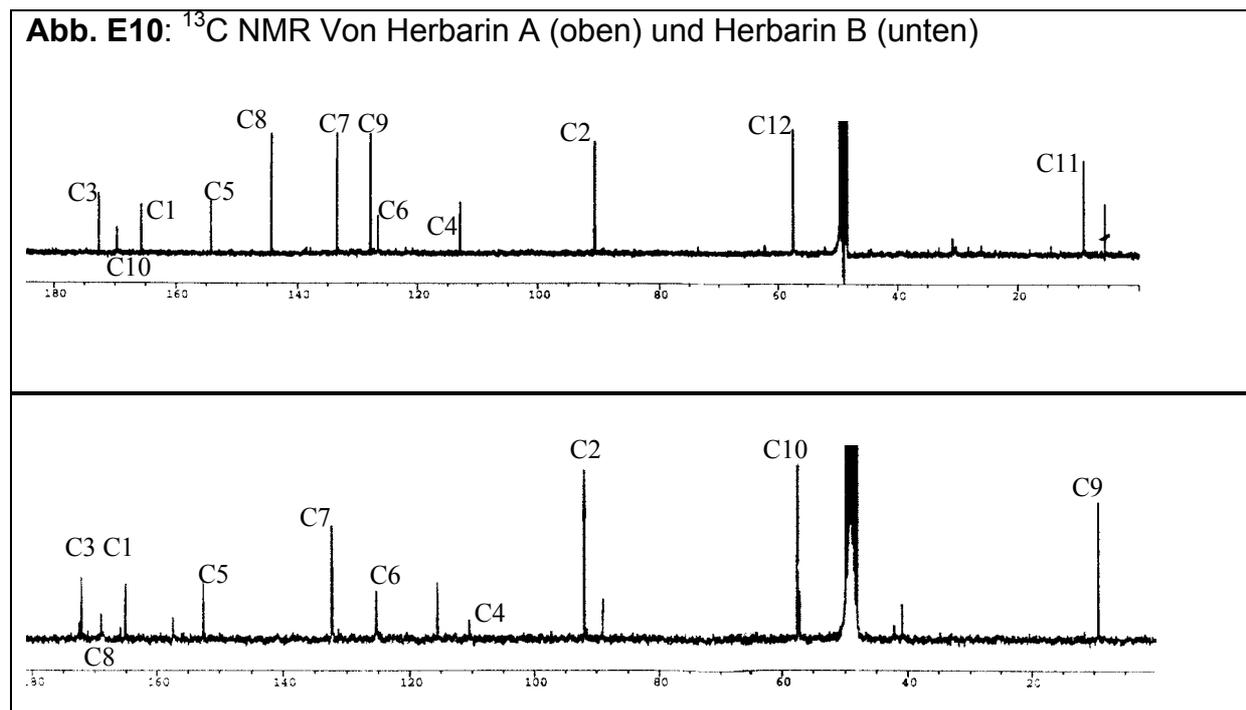
(+) ESI-MS ( $m/z$  rel. Int.): 443  $[2M+Na]^+$ , (100), 265  $[M+Na+MeOH]^+$  (84), 233  $[M+Na]^+$  (56), 211  $[M+H]^+$  (25)

## Ergebnisse



**Abb. E9:** ESI-MS von Herbarin B (**11**) im positiven Modus

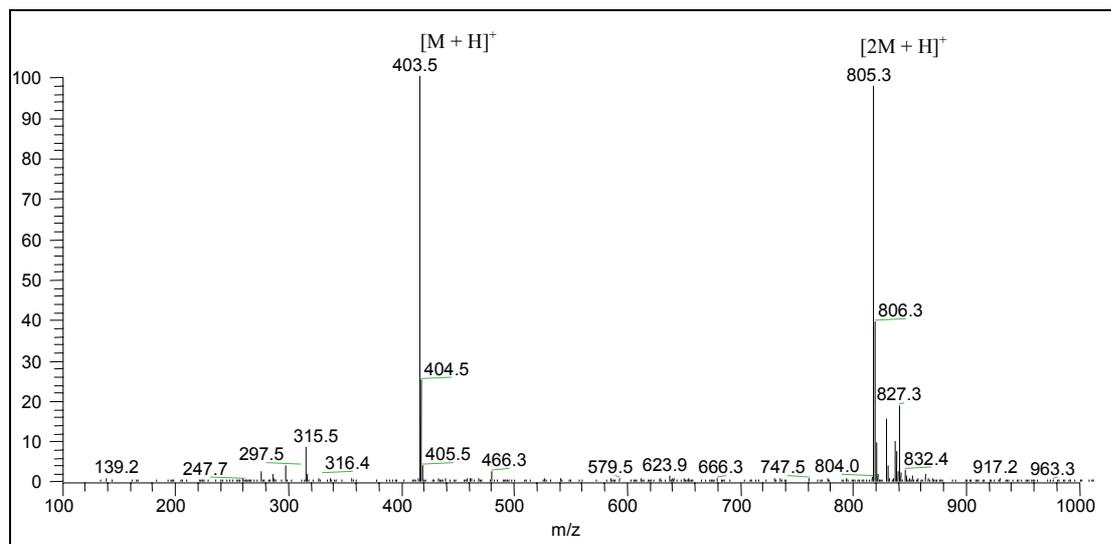
Das UV-Spektrum der Verbindung ähnelte stark dem von Herbarin A (**10**). Auch bei Vergleich der NMR Daten zeigte sich eine große Ähnlichkeit, die Maxima waren lediglich mit 230 nm gegenüber 259 nm und 329 nm gegenüber 348 nm etwas verschoben, was mit der kürzeren Seitenkette bei Herbarin B an C-5 erklärt werden kann. Der Vergleich der Spektren zeigte, dass bei Herbarin B die Seitenkette um zwei C-Atome verkürzt war, während für den  $\alpha$ -Pyroneering kein Unterschied gegenüber Herbarin A festzustellen war. Die Kopplungskonstante von H-7 zu H-8 von 15.4 Hz zeigte, dass auch hier eine *trans*-Konfiguration vorlag.



Beide Herbarine stellen neue  $\alpha$ -Pyrone dar. Sie zeigen strukturelle Ähnlichkeiten mit den Citreopyronen aus *Penicillium citreoviride*, allerdings tragen diese keine Carbonsäure am Ende der Seitenkette, sondern eine Aldehydfunktion [Kosemura *et al.*, 1997].

Die Hauptkomponente der Sekundärstoffe in *Cladosporium herbarum* erwies sich als das bereits bekannte Citreoviridin (**12**) oder Citreoviridin A, wie es manchmal bezeichnet wird. Es wurde als intensiv gelb gefärbte Substanz isoliert. Im UV zeigte es zwei Maxima, die denen von Herbarin A und Herbarin B ähnelten, allerdings wies Citreoviridin ein zusätzliches Maximum bei ca. 390 nm auf.

Durch EIMS wurde ein Molekulargewicht von 402 festgestellt. Auch die erhaltenen NMR Spektren (Tab. E8) zeigten eine große Ähnlichkeit zu den NMR Daten von Herbarin A und B (Tab. E7).



**Abb. E11:** ESI-MS von Citreoviridin (**12**) im positiven Modus

## Citreoviridin

**Beschreibung:** intensiv gelb gefärbte feste Substanz mit glasigem Aussehen

**Probencode:** NAB 127

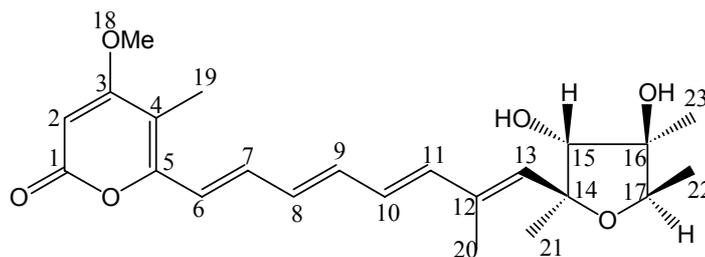
**Substanzmenge:** 51.6 mg

**Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>

**Molekulargewicht:** 402 g/mol

**Quellorganismus:** *Cladosporium herbarum*

**[α]<sub>D</sub>20:** - (c = 0.1 + 1.0 MeOH)



Retentionszeit: 19.89

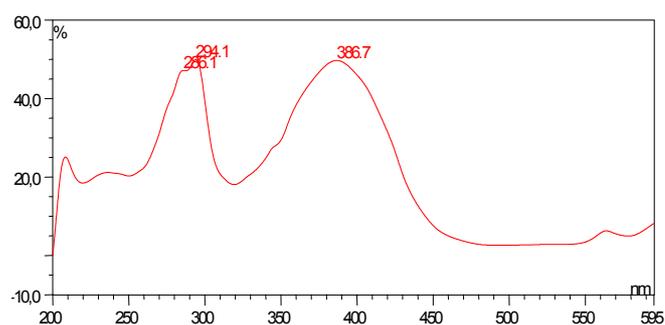
R<sub>f</sub>-wert: 0.34

Fluoreszenzlösung (254nm): -

Eigenfluoreszenz 366 nm: ++

+ Anisaldehyd: gelb-braun

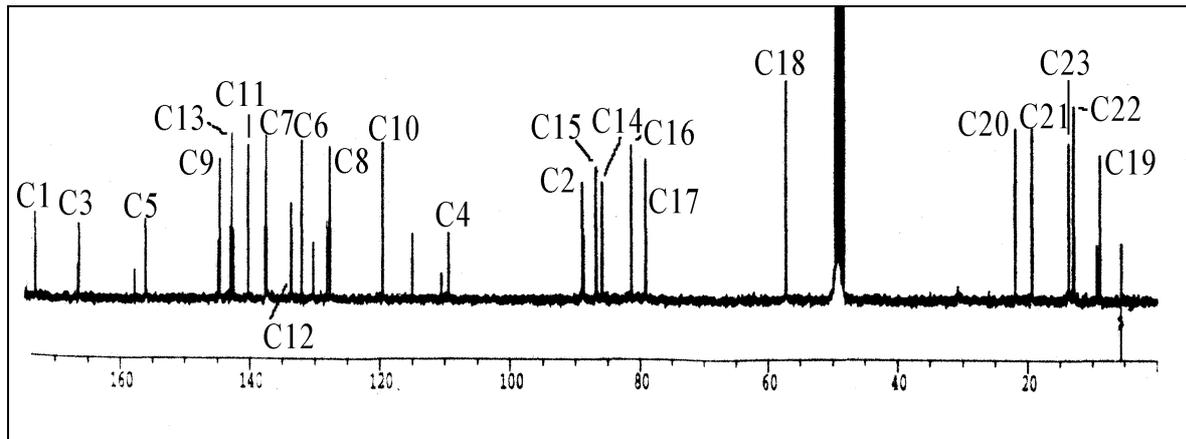
+ Vanillin /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: gelb



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int): 827 [2M+H]<sup>+</sup> (95), 403 (M+H)<sup>+</sup> (100)

(-) ESI-MS (*m/z*, rel. Int): 849 (11), 447 (100), 401 [M-H]<sup>-</sup> (22)

Wie im Falle von Herbarin A und B war auch beim Citreoviridin ein  $\alpha$ -Pyrone-Ring vorhanden. Zusätzliche Signale belegten aber, dass sich die Seitenkette weiter fortsetzte und am Ende einen Tetrahydrofuranring trug. Die Kopplungen der H-Atome in der Kette zeigten, dass auch im Citreoviridin eine all *trans*-Konfiguration vorlag. Citreoviridin wurde bereits 1964 im Schimmelpilz *Penicillium citreoviride* gefunden [Sakabe *et al.*, 1964] und seitdem mehrmals aus verschiedenen *Penicillium*-Pilzstämmen isoliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist dies der erste Nachweis von Citreoviridin für die Gattung *Cladosporium*.



**Abb. E12:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten des Citreoviridins

Im Chromatogramm des Rohextraktes fielen neben dem Hauptpeak des Citreoviridins etwa sechs bis acht weitere kleine Peaks auf, deren UV-Spektrum nahezu identisch mit dem des Citreoviridins (**12**) war, was für mehrere Isomere der Substanz sprach.

Durch wiederholte chromatographische Trennung gelang es zwei, der in der HPLC detektierten Isomere zu isolieren. Durch MS ergab sich ein Molekulargewicht von 402, wie bei Citreoviridin. Leider zersetzten sich die Isomere wiederum leicht in mehrere verschiedene Verbindungen, wodurch keine sauberen NMR-Spektren erhalten werden konnten. Auch das Citreoviridin neigte bei Lagerung zur Aufspaltung in verschiedene Isomere. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Isomeren um Derivate des Citreoviridins, die in der Kette nicht all *trans*-konfiguriert sind, sondern auch *cis*-Konfigurationen aufweisen. Diese Vermutung konnte aber mit den vorhandenen Daten nicht bewiesen werden.

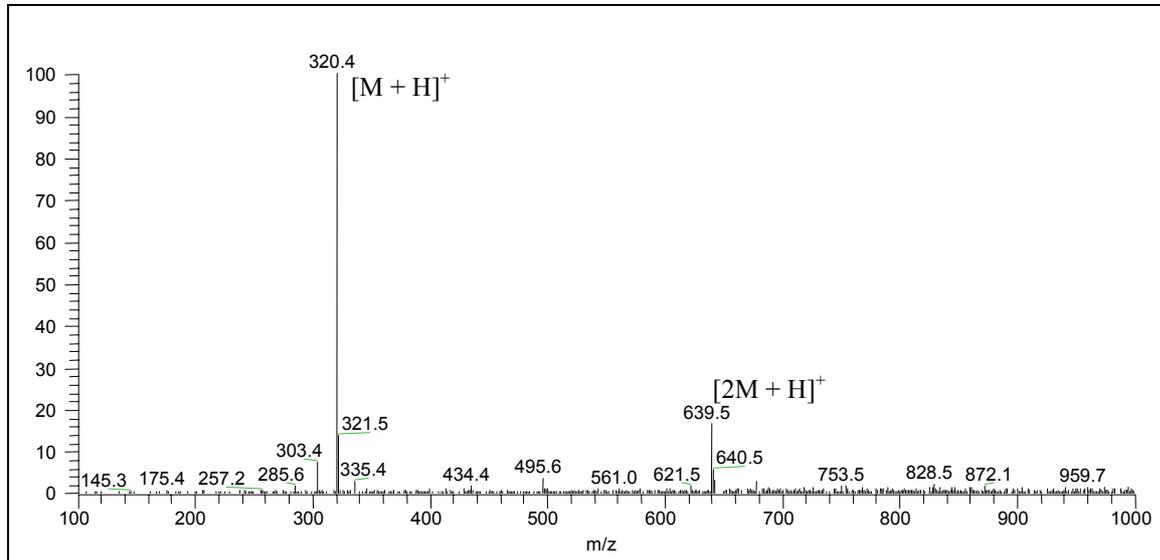
## Ergebnisse

Tabelle E8:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten von Citreoviridin, aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ )

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
1	173.1 (s)	
2	89.0 (d)	5.62 (s)
3	165.4 (s)	
4	110.6 (s)	
5	156.2 (s)	
6	132.0 (d)	Pos. 6-13: 6.2 – 7.3 m
7	137.4 (d)	
8	127.7 (d)	
9	144.7 (d)	
10	119.6 (d)	
11	140.3 (d)	
12	133.6 (s)	
13	142.7 (d)	5.98 (s)
14	86.8 (s)	
15	86.9 (s)	4.86 (s)
16	81.4 (s)	
17	79.2 (d)	3.78 (q 6.0 Hz)
18	57.3 (q)	3.91 (s)
19	8.8 (q)	3.03 (s)
20	21.9 (q)	1.92 (d 1.0 Hz)
21	19.4 (q)	1.36 (s)
22	13.0 (q)	1.19 (d 6.0 Hz)
23	13.7 (q)	1.14 (s)

Neben den drei  $\alpha$ - Pyronen konnte auch noch zwei  $\gamma$ - Pyrone isoliert werden.

Durch NMR Spektroskopie, MS-Messungen und vergleichende HPLC konnten die Strukturen aufgeklärt und die Substanzen als Microsphaeron B (**13**) und Microsphaeron A (**14**) identifiziert werden.



**Abb. E13:** ESI-MS von Microsphaeron B (13)

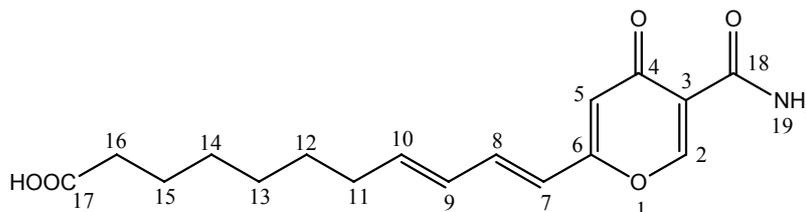
Microsphaeron B wurde erstmals im Jahr 2000 aus dem schwamm-assoziierten Pilz *Microsphaeropsis* sp. isoliert, strukturell aufgeklärt und beschrieben [Wang *et al.*, 2001]. Interessant dabei ist, dass es sich bei diesem Pilzstamm um denselben handelt, aus dem im Rahmen dieser Arbeit zuvor Anthrachinone und Betaenone isoliert worden waren. Inzwischen hatte dieser Stamm eine Mutation durchgemacht, was sich auch im Habitus zeigte und wies völlig andere Sekundärstoffe auf [Wang *et al.*, 2001]. Zuvor isolierte Sekundärstoffe konnten aber überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden. Für den Pilz *Cladosporium herbarum* ist es das erste Mal, dass Microsphaeron B beschrieben wurde.

**Microsphaeron B (13)**Beschreibung: weiß-braune feste SubstanzProbencode: RP 406C

Substanzmenge: 12.4 mg

Summenformel: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>

Molekulargewicht: 319 g/mol

Quellorganismus: *Cladosporium herbarum*

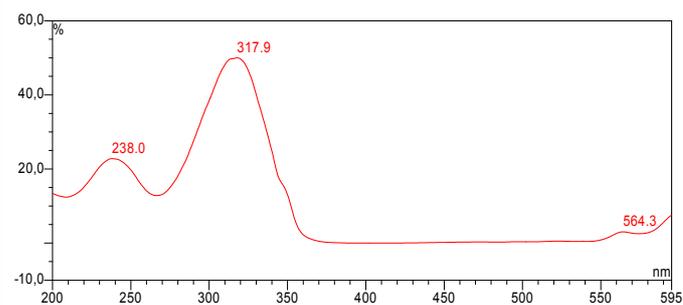
Retentionszeit: 27.9

R<sub>f</sub>-Wert: 0.41

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: -

+ Vanillin /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: -(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int): 342 [M+Na]<sup>+</sup> (45), 320 [M+H]<sup>+</sup> (100)

Die NMR Daten (Tab. E9) machten deutlich, dass auch in diesem Fall eine zweifach ungesättigte Seitenkette vorlag. Die Kopplungskonstanten von jeweils 15.1 Hz zeigten, dass die Doppelbindungen der Seitenkette eine *trans* Konfiguration aufwiesen. Zudem wurden zwei Protonen detektiert, die zu einem  $\gamma$ -Pyroneering gehörten und in Parastellung zueinander angeordnet waren, was ein Vergleich mit den von Wang publizierten Daten [Wang *et al.*, 2001] deutlich machte.

Neben dem Microsphaeron B konnte in den HPLC-Chromatogrammen eine zweite Substanz detektiert werden, die dem Microsphaeron B sehr ähnlich zu sein schien. Leider konnte nicht genügend Substanz für ein sauberes NMR-Spektrum isoliert werden. Erschwerend kam hinzu, dass die Substanz nicht stabil war und sich schnell zersetzte. Durch MS-Daten und eine Koelution mit den von C. Wang isolierten

## Ergebnisse

Microsphaeron A konnte die Identität der zweiten Substanz jedoch eindeutig als Microsphaeron A nachgewiesen werden (**14**).

### Microsphaeron A (**14**)

Beschreibung: weiß-braune feste Substanz

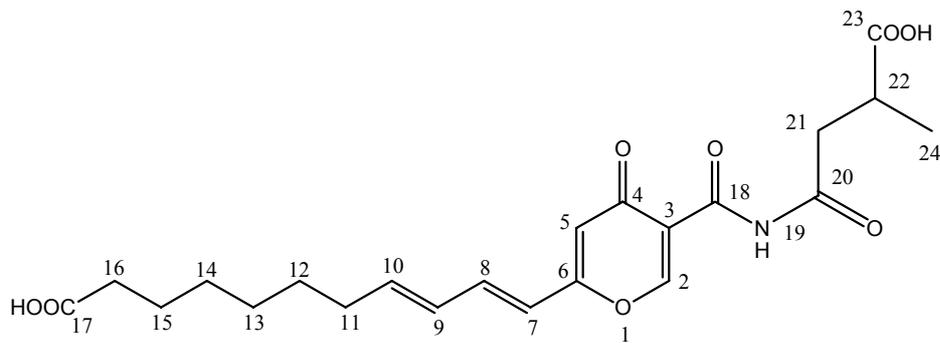
Probencode: RP 406C

Substanzmenge: - nur im Gemisch mit (**13**)

Summenformel:  $C_{22}H_{27}NO_8$

Molekulargewicht: 433 g/mol

Quellorganismus: *Cladosporium herbarum*



Microsphaeron A

Retentionszeit: 28.47

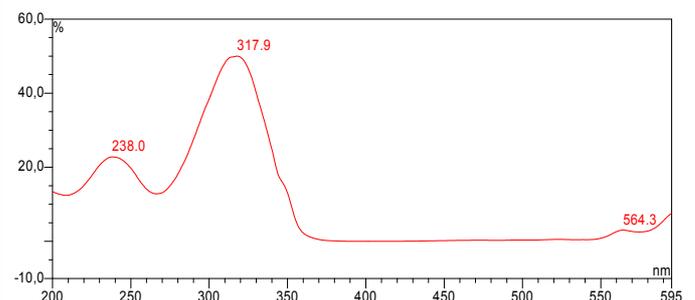
R<sub>f</sub>-Wert: 0.41

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: -

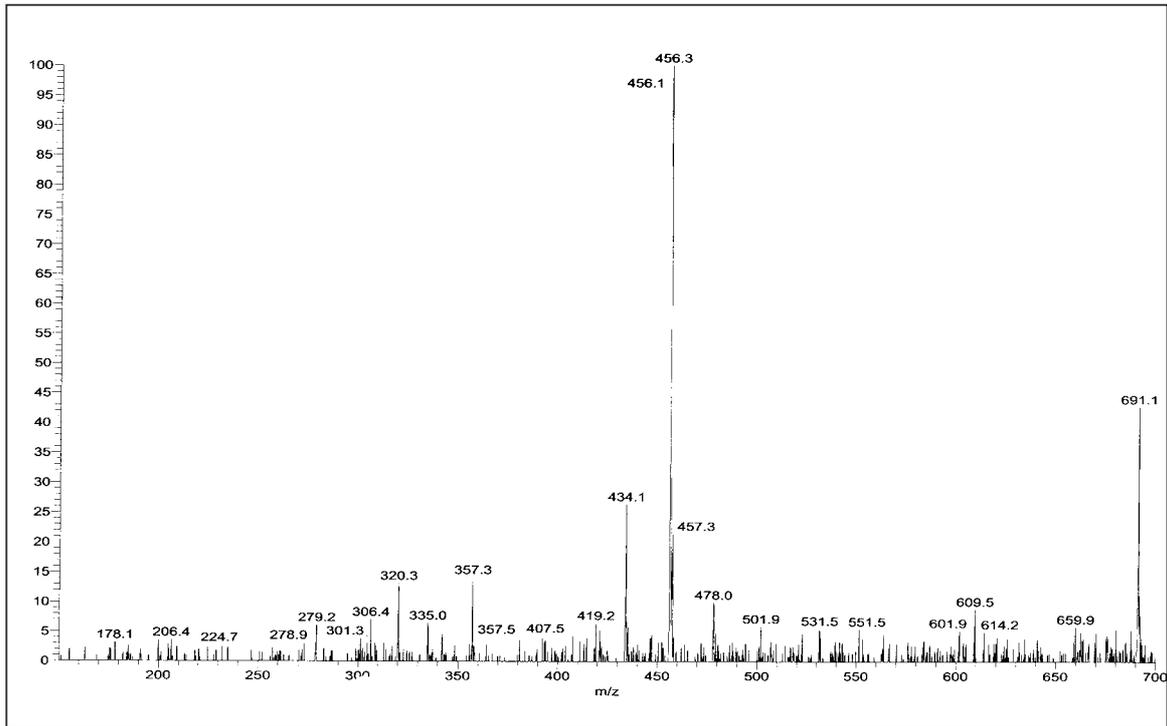
+ Vanillin /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: -



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int): 456 [M+Na]<sup>+</sup> (32), 434 [M+H]<sup>+</sup> (100)

(-) ESI-MS (*m/z*, rel. Int): 432 [M-H]<sup>-</sup> (65), 318 (27)

## Ergebnisse



**Abb. E14:** ESI-MS von Microsphaeron A (14)

Interessant ist, dass mit Herbarin A und B, dem Citreoviridin sowie den Microsphaeronen A und B aus einem Pilzstamm sowohl  $\alpha$ -Pyrone und  $\gamma$ -Pyrone isoliert werden können. Wird doch in der Regel lediglich ein Typ von Pyronen aus untersuchten Organismen beschrieben. Des Weiteren ist interessant, dass der bereits untersuchte Pilz *Microsphaerospis* sp. neue Naturstoffe produzierte, während die bereits isolierten Substanzen nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Tab. E9:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten von *Microsphaeron B* aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ )

Pos	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
2	161.4 (d)	8.74 (s)
3	119.1 (s)	
4	177.7 (s)	
5	113.7 (d)	6.50 (s)
6	162.7 (s)	
7	119.9 (d)	6.36 (d 15.4 Hz)
8	137.8 (d)	7.12 (dd 15.4 Hz 10.4 Hz)
9	129.1 (d)	6.34 (dd 15.1 Hz, 10.4 Hz)
10	143.5 (d)	6.22 (dt 15.1 Hz, 6.9 Hz)
11	32.3 (t)	2.17 (m)
12	28.1 (t)	1.38 (m)
13	28.3 (t)	1.25 (m)
14	28.2 (t)	1.25 (m)
15	24.4 (t)	1.47 (m)
16	33.6 (t)	2.17 (m)
17	175.5 (s)	
18	163.2 (s)	

### 3.2.3.1. Biologische Aktivität der aus *Cladosporium herbarum* isolierten marinen Naturstoffe

Die Aktivität der isolierten Naturstoffe wurde in den zuvor vorgestellten Screenings getestet. Von Citreoviridin war bereits bekannt, dass es Adenosin-Triphosphatasen in Mitochondrien hemmt [Linett *et al.*, 1978].

Im antibiotischen Test zeigte keine der untersuchten Substanzen bei den verwendeten Teststämmen eine nennenswerte Aktivität.

Die Ergebnisse des „*brine shrimp assays*“ sowie des Insektizidtests sind in Tab. E10 und E11 aufgelistet.

## Ergebnisse

Tab. E10: Ergebnisse des „*brine shrimp assays*“ für Herbarin A und B, Citreoviridin, sowie für Microsphaerone A und B.

Brine Shrimp	
Substanz	Überlebensrate
Herbarin A	
100 µg	15 %
50 µg	25%
Herbarin B	
100 µg	20 %
50 µg	35 %
Citreoviridin	
100 µg	80 %
50 µg	95 %
Microsphaeron A	
100 µg	90 %
50 µg	100 %
Microsphaeron B	
100 µg	95 %
50 µg	100 %

Tab. E11: Ergebnisse des Insektizidtests mit *Spodoptera littoralis* für Herbarin A und B, Citreoviridin sowie für die Microsphaerone A und B.

Insektizidtest		
Substanz	Überlebensrate	Gewicht in (%) im Vergleich zur Kontrolle
Herbarin A		
250 ppm	100 %	114 %
100 ppm	100 %	136 %
Herbarin B		
250 ppm	100 %	107 %
100 ppm	100 %	112 %
Citreoviridin		
250 ppm	100 %	7 %
100 ppm	100 %	33 %
Microsphaeron A		
250 ppm	100 %	90 %
100 ppm	100 %	101 %
Microsphaeron B		
250 ppm	100 %	96 %
100 ppm	100 %	98 %

Eine leichte Aktivität im „*brine shrimp* assay“ ist bei Herbarin A und B zu beobachten, wobei schon relativ hohe Konzentrationen eingesetzt wurden, um eine nennenswerte Aktivität zu verzeichnen. Citreoviridin zeigte im „*brine shrimp* assay“ nur eine ganz leichte Aktivität, selbst wenn berücksichtigt wird, dass Citreoviridin ein deutlich höheres Molekulargewicht besitzt und somit die molare Konzentration geringer als beim Herbarin A und B ausfällt. Vergleicht man die Ergebnisse von Herbarin A und Herbarin B, scheint eine längere Seitenkette die Aktivität zu erhöhen, allerdings ist die Abweichung minimal. Um dies genauer zu untersuchen, müssten allerdings die Konzentrationen angepaßt sein, ist doch bei den eingesetzten Substanzmengen die molare Konzentration von Herbarin B aufgrund der niedrigeren Molekulargewichtes höher. Diese Untersuchungen würden sich aber nur bei aktiveren Verbindungen lohnen.

Im Insektizidtest ist das Bild etwas anders. Hier zeigen Herbarin A und Herbarin B keine Aktivität. Citreoviridin dagegen tötet die Raupen zwar nicht ab, doch erzielt eine deutliche Wachstumshemmung der Raupen. Bei einer Konzentration von 250 ppm zeigt sich nur noch ein geringes Wachstum.

Im Antibiotikatest erwiesen sich sowohl Herbarin A, Herbarin B und Citreoviridin als inaktiv.

Die Microsphaerone A und B zeigen in allen Tests durchweg negative Ergebnisse.

#### **3.2.4. Isolierung und Identifizierung der Sekundärstoffe aus *Phomopsis* sp.**

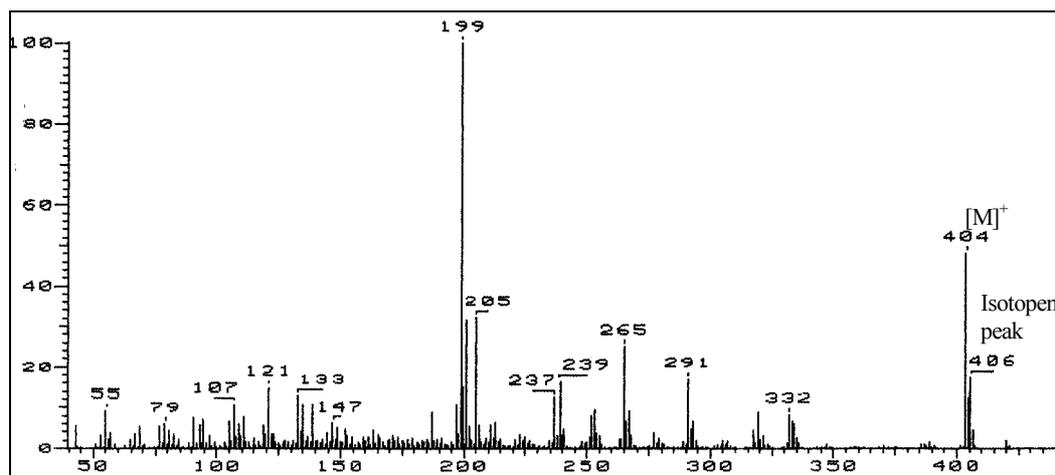
Pilze der Gattung *Phomopsis* sind als Schädlinge von Pflanzen bekannt. So löst z.B. *Phomopsis viticola* die Schwarzfleckenkrankheit bei verschiedenen Gehölzen aus, bei der junge Triebe geschädigt werden. Andere Arten dieser Gattung spielen in der Landwirtschaft als Schädlinge von Wein und Sonnenblumen eine Rolle. Pilze der Gattung *Phomopsis* werden somit zu Schädlingen mit wirtschaftlicher Bedeutung.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pilz der Gattung *Phomopsis* zeichnete sich in der Kultur besonders durch ein charakteristisches Myzel aus, das dazu neigte, an den Plattenrändern in die Höhe zu wachsen. Die Kultur selbst war am Anfang schmutzigweiß gefärbt. Mit zunehmendem Alter nahm sie eine hellbraune Färbung

an. Auf Agarplatten und in Flüssigkultur konnten Flüssigkeitströpfchen von öartiger Konsistenz, die vom Myzel abgesondert wurden, beobachtet werden.

Nach Extraktion der Standkultur (20 l) verblieben 2.91 g Rohextrakt. In der HPLC zeigte sich ein Hauptpeak sowie mehrere Nebenkomponenten. Nach Aufreinigung des Rohextraktes konnte genügend Substanz der Hauptkomponente aus *Phomopsis sp.* für eine Strukturaufklärung isoliert werden. Von den Nebenpeaks konnten zwei weitere Substanzen gewonnen werden, deren Strukturaufklärung mit den vorhandenen Mitteln (NMR, MS) nicht möglich war, da gerade im NMR sehr viele Signale zusammenfielen und auch bei 500 MHz und verschiedenen Lösungsmitteln nicht zu trennen waren, was eine Interpretation unmöglich machte. Für die Strukturaufklärung weiterer Substanzen konnte bei der geringen Rohextraktmenge nicht genug Substanzmenge für eine Strukturaufklärung gewonnen werden.

Die isolierte Hauptkomponente MP10-1 wurde zunächst mittels MS untersucht. Dabei zeigte sich schnell, dass die Verbindung Chlor enthalten musste, was im MS am typischen Isotopenpeak abzulesen war, der um zwei Masseinheiten höher war als der Molekülpeak. Mit Hilfe eines EI-MS ergab sich ein Molekulargewicht von 404 g/mol. Eine EI-Hochauflösung ergab eine Präzisionsmasse von 404.17585, aus der die Summenformel  $C_{23}H_{29}O_4Cl$  errechnet wurde.



**Abb. E15:** EI-MS von Ascochlorin (**15**)

Mit Hilfe von 1D und 2D NMR-Daten konnte schließlich die Struktur aufgeklärt werden. Beim Vergleich mit Literaturwerten zeigte sich, dass die Substanz MP 10–1 bereits bekannt war. Sie wurde 1969 erstmalig aus einem Pilz der Gattung *Fusarium* isoliert [Ellestad *et al.*, 1969] und Ascochlorin (**15**) genannt. Seitdem wurde Ascochlorin in mehreren Organismen nachgewiesen, darunter *Nectria coccinea*, und *Verticillium* sp. [Aldridge *et al.*, 1972, Takamatsu *et al.*, 1994]. Für einen Pilz der Gattung *Phomopsis* ist es das erste Mal, dass Ascochlorin beschrieben wurde.

### Ascochlorin (**15**)

Beschreibung: weiß-braune feste Substanz

Probencode: MP10-1

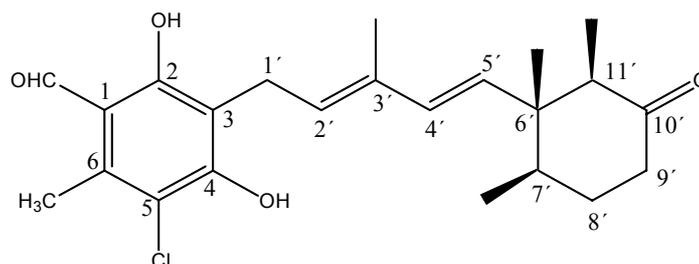
Substanzmenge: 17.5 mg

Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>Cl

Molekulargewicht: 404 g/mol

Quellorganismus: *Phomopsis* sp.

[α]<sub>D</sub>20: -26° (c = 1.0 MeOH)



Retentionszeit: 23.56

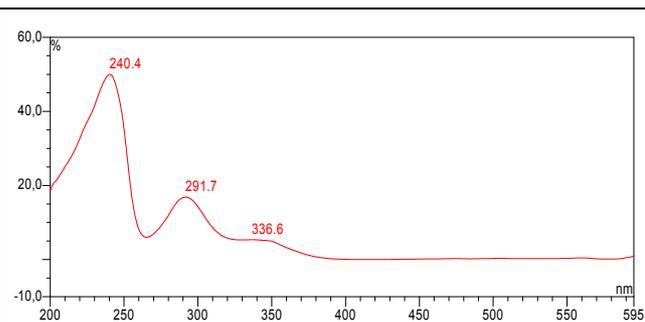
R<sub>f</sub>-Wert: 0.2

Fluoreszenzlöschung (254nm): ++

Eigenfluoreszenz 366 nm: +

+ Anisaldehyd: -

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

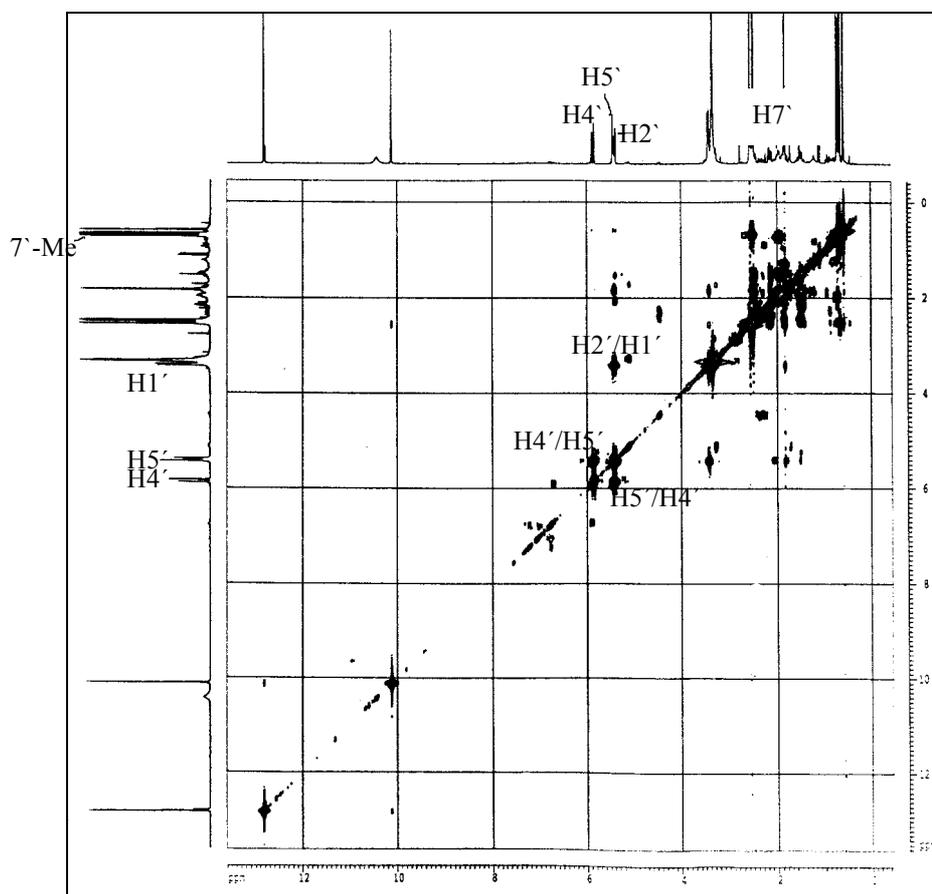


(-) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 807 [2M-H]<sup>-</sup> (8), 403 [M-H]<sup>-</sup> (100)

(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 472 (20), 427 [M+Na]<sup>+</sup> (75), 405 [M+H]<sup>+</sup> (100)

Im COSY konnten vier kleine Spinsysteme detektiert werden. Dabei handelte es sich um ein CH-CH<sub>3</sub> Fragment, eine CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> Gruppe, eine CH<sub>2</sub>-CH Gruppe und eine CH-CH Gruppe. Im <sup>1</sup>H NMR Spektrum konnten außerdem die stark ins tiefe Feld verschobenen Signale bei 12.80 ppm (1H, s) und 10.08 ppm (1H, s) der Hydroxy- bzw. der Aldehydfunktion an C-2 und C-1 zugeordnet werden. Das Signal

bei 3.42 ppm (2H, d,  $J=7.2$  Hz) konnte zwei Protonen einer diastereomeren Methylengruppe zugeordnet werden, was das Zusammenfallen der Signale der beiden Protonen erklärt. Eine geminale Kopplung konnte nicht beobachtet werden, was sich jedoch mit den Literaturdaten [Takamatsu *et al.*, 1994] deckt. Die diastereomere Methylengruppe lag neben einem olefinischen Proton, das bei 5.39 ppm beobachtet werden konnte. Mit Hilfe von HMBC Korrelationen von H-1' zu C-2, C-3 und C-4 sowie von H-2' zu C-3 konnten für die genannten Protonen die Positionen 1' und 2' bestimmt werden. Die bereits im COSY detektierten Methingruppen bei 5.87 ppm und 5.42 ppm zeigten eine Kopplungskonstante von 16.0 Hz, was auf ein AB System mit einer *trans*-konjugierten Doppelbindung hinwies.



**Abb. E16:**  $^1\text{H}$ -COSY des Ascochlorins

Mittels HMBC Kopplungen von 3'-Me zu C-2', C-3' und C-4' konnte die Position von C-3', C-4' und C-5' festgelegt werden. Weiterhin konnten zwei Methylsignale bei 0.73 ppm und 0.68 ppm beobachtet werden, die jeweils zu Doublets aufspalteten.

Methylgruppen dieser chemischen Verschiebung und Multiplizität sind charakteristisch für die substituierte Cyclohexanonfunktion bei Ascochlorinen [Kawagishi *et al.*, 1984]. Kopplungen im HMBC zu den Positionen 6', 7' bzw. 8' sowie 6' und 10' legten die Positionen der beiden Methylgruppen an den Positionen 7' bzw. 11' fest.

Mit der Positionsbestimmung von C-7' wird auch die Position C-8'' und C-9' mit den CH<sub>2</sub> Gruppen festgelegt, die laut COSY zum Spinsystem CH<sub>3</sub>-CH an C-7' gehören. Bestätigt wird dies auch von einer HMBC Kopplung von H-7' zu C-9'. Der Ringschluss kann durch die HMBC Kopplungen H-11' zu C-10' und H-9' zu C-10' und C-11' belegt werden. Die Struktur des Ringes A ergab sich aus den HMBC Kopplungen der Methylgruppe an C-6 sowie durch Vergleich mit den publizierten NMR Daten über Ascochlorin [Takamatsu *et al.*, 1994].

Tabelle E12: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C und HMBC NMR Daten des Ascochlorins  
Die Spektren wurden in DMSO-d<sub>6</sub> bei 300 MHz (<sup>1</sup>H) und 75 MHz (<sup>13</sup>C) aufgenommen

Position	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H δ (ppm)	HMBC-Korrelationen (H-C)
1	113.7 (s)		
2	161.0 (s)		
3	113.7 (s)		
4	157.9 (s)		
5	112.8 (s)		
6	138.8 (s)		
1'	21.8 (t)	A + B 3.42 (d 7.2 Hz)	2, 3, 4, 2', 3'
2'	128.1 (d)	5.39 (d 3.3 Hz)	
3'	133.1 (s)		3, 3'-Me
4'	132.4 (d)	5.87 (d 16.0 Hz)	2', 3', 4', 6', 3'-Me
5'	135.7 d	5.43 (d 16.0 Hz)	3', 5', 6', 7', 11', 6'-Me, 3'-Me <sup>o</sup>
6'	47.8 (s)		
7'	40.1 (d)	1.99 m	6', 7', 8'
8'	30.5 (t)	A 1.96 (m) B 1.52 (ddd 13.1 Hz 12.8 Hz 4.5 Hz)	6', 7', 7'-Me, 9' 6', 7', 7'-Me, 9'
9'	40.8 (t)	A 2.14 dd (13.1 Hz 3.2 Hz) B 2.54 (m)	7', 8', 10', 11'
10'	211.4 (s)		
11'	52.0 (d)	2.54 (m)	6', 7', 10', 6'-Me, 11'-Me
1-CHO	195.2 (d)	10.08 (s)	1-CHO*, 1, 2
6-Me	14.4 (q)	2.56 (s)	1, 5, 6, 6-Me*
3'-Me	12.5 (q)	1.80 (s)	2', 3', 4'
6'-Me	10.1 (q)	0.60 (s)	5', 6', 11'
7'-Me	16.1 (q)	0.73 (d 6.7 Hz)	6', 7', 8'
11'-Me	8.9 (q)	0.68 (d 6.7 Hz)	6', 7', 10', 11', 11'-Me*

<sup>o</sup> HMBC Kopplungen über 4 Bindungen

\* CH-Direkt

### 3.2.4.1. Biologische Aktivität des aus *Phomopsis sp.* isolierten Ascochlorins

Ascochlorin und seine Derivate wurden bereits auf antibiotische Aktivitäten überprüft [Aldridge *et al.*, 1972]. Weder gegen gram-positive noch gegen gram-negative Bakterien konnte eine nennenswerte Aktivität beobachtet werden.

Dagegen wurden Ascochlorin und seine Derivate als Inhibitoren von Testosteron 5  $\alpha$ -Reduktase beschrieben [Takamatsu *et al.*, 1994].

Auch bei unserem antibiotischen Testsystem, wie es bereits im Material und Methodenteil beschrieben wurde, zeigte sich keine nennenswerte Aktivität gegen getestete gram-positive und gram-negative Bakterienstämme. Auch gegen den getesteten Pilz *Candida albicans* konnte keine Wirkung mit Ascochlorin erzielt werden. Im „*brine shrimp assay*“ dagegen zeigte sich eine starke Aktivität. 100  $\mu$ g Ascochlorin reichten aus, um 19 von 20 Larven zu töten. Weitere Untersuchungen mit Ascochlorin zeigten, dass der LC<sub>50</sub> - Wert für Ascochlorin bei etwa 25  $\mu$ g liegt.

Auch die insektizide Aktivität gegenüber *Spodoptera littoralis* wurde wie bei anderen Substanzen untersucht. Eine toxische Wirkung gegenüber den Raupen konnte im Test bei Dosen von 250 ppm und 100 ppm nicht beobachtet werden. Die Raupen überlebten alle, zeigten aber ein etwas schwächeres Wachstum im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Wachstumshemmung fiel jedoch sehr schwach aus und betrug im Vergleich zu den Kontrolltieren nur 10%.

### 3.2.5. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanzen aus *Penicillium citreonigrum*

*Penicillium citreonigrum* ist eine Art, die auf verschiedenen Oberflächen, unter anderem auf Holz und Blättern, gefunden wird. Sie ist auch ein Synonym für *Penicillium citroviride*, aus dem u.a. das Citreoviridin isoliert wurde, das im Rahmen dieser Arbeit bereits als Isolat aus *Cladosporium herbarum* beschrieben wurde [Jadulco *et al.*, 2001].

Die Kultur von *Penicillium citreonigrum*, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, stammte nicht wie die anderen Pilzisolat aus dem Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba*, sondern aus dem Schwamm *Pseudoceratina purpurea*, der in Indonesien gesammelt wurde. Die angelegten Standkulturen bildeten viele ockerfarbene Sporen, so dass die gesamte Kultur nach einigen Wochen Wachstum einen ockerfarbenen Farbton annahm. Auf Agarplatten sah die Kultur sehr ähnlich aus, allerdings war das Myzel weniger stark entwickelt; auch wurden im Vergleich zur Flüssigkultur weniger Sporen gebildet. Diese bedeckten auf Agarplatten nicht die gesamte Oberfläche, sondern kamen in Sporenhaufen über die gesamte Kultur verteilt vor.

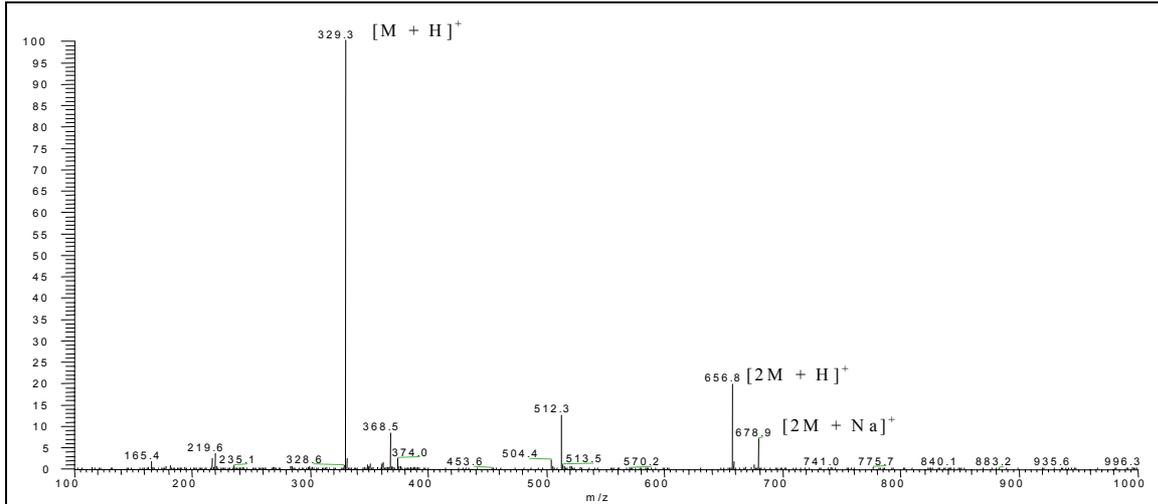
Aus dem Rohextrakt von 4.30 g konnte eine ganze Reihe von Substanzen gewonnen werden. Sieben der isolierten Substanzen konnten aufgeklärt werden, bei weiteren isolierten Substanzen lag nicht genug Substanzmenge für saubere NMR Spektren vor. Vier der isolierten Verbindungen waren bereits bekannt, drei Substanzen erwiesen sich als neue Naturstoffe.

#### 3.2.5.1. Strukturaufklärung von Vermistatin (PAI 1-2)

Die Verbindung PAI 1-2 (**16**) zeigte bei der HPLC in MeOH im UV Adsorptionsmaxima bei 211 nm und 270 nm.

Im ESI-MS ergaben sich bei positiver Ionisierung detektierte Ionen bei  $m/z$  757 [ $2 M + H$ ]<sup>+</sup> und  $m/z$  329 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, woraus ein Molekulargewicht von 328 abgeleitet wurde.

## Ergebnisse



**Abb. E17** : ESI-MS von Vermistatin (PAI 1-2) im positiven Modus

### Vermistatin (**16**)

Beschreibung: bräunliche feste Substanz

Probencode: PAI 1/2

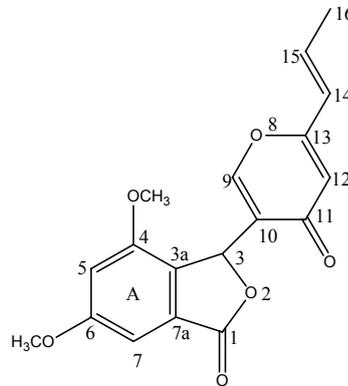
Substanzmenge: 2331.3mg

Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

Molekulargewicht: 328 g/mol

Quellorganismus: *Penicillium citreonigrum*

$[\alpha]_D^{20}$ : -6.3° (c = 0.2 MeOH)



Retentionszeit: 25.22 min

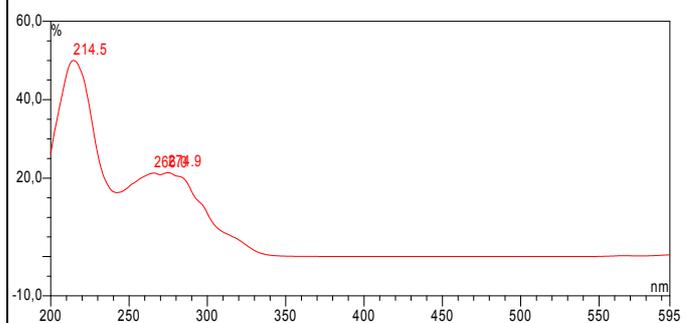
R<sub>f</sub>-wert: 0.7

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: schwach gelblich

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



(+)ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 657 [2M+H]<sup>+</sup> (22), 329 [M+H]<sup>+</sup> (100)

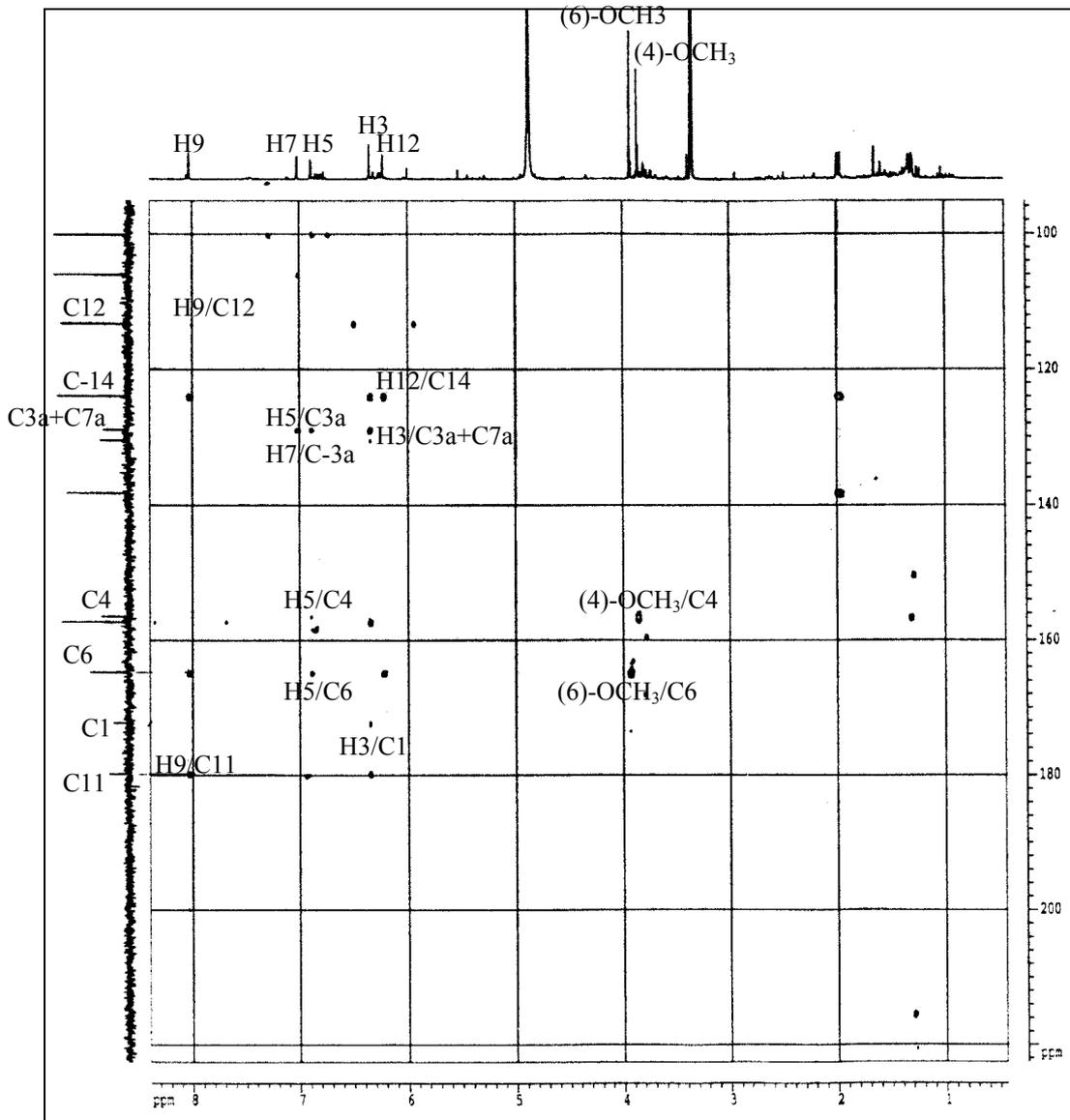
Bei der Literatursuche wurde schnell klar, dass es sich bei PAI 1-2 um Vermistatin handeln musste. Vermistatin wurde 1979 erstmals aus *Penicillium vermiculatum* isoliert und die Struktur aufgeklärt [Fusaka *et al.*, 1979]. Später wurde es auch aus *Penicillium verruculosum* beschrieben [Murtaza *et al.*, 1996]. Für *Penicillium citreonigrum* wurde die Verbindung dagegen bisher noch nicht beschrieben.

Im COSY NMR konnten im Falle vom Vermistatin nur zwei Spinsysteme detektiert werden. Dabei handelte es sich um eine Metakopplung von zwei Protonen bei 6.89 ppm und 7.02 ppm sowie um eine Propylengruppe.

Die Positionen der Methoxygruppen im A-Ring konnten leicht durch ihre Kopplungen im HMBC zu C-4 und C-6 bestimmt werden. Ein Proton der beschriebenen Metakopplung konnte durch HMBC Kopplungen zu C-4 und C-6 an C-5 festgelegt werden. HMBC Kopplungen von H-5 zu C-3a und von H-7 zu C-3a belegten den Ringschluss.

Die chemische Verschiebung von C-3 zeigte das Vorkommen von Sauerstoff an. Kopplungen im HMBC zu C-4, C-3a, C-7a und zu C-1 belegen den Ringschluss des Lactonringes.

## Ergebnisse



**Abb.E18:** HMBC von Vermistatin (PAI 1/2), wichtige Kopplungen wurden beschriftet

Neben dem Benzofuran konnte im NMR ein  $\gamma$ -Pyroneering detektiert werden. Dieser trug an den Positionen C-12 und C-9 ein Wasserstoff, wie HMBC Kopplungen zu C-11 und C-13 bzw. zu C-12 und C-13 belegten.

Eine Kopplung von H-9 zu C-13 machte deutlich, dass der Benzofuransubstituent mit Position C-10 des  $\gamma$ -Pyroneerings verknüpft war. Weiterhin war der  $\gamma$ -Pyroneering an C-13 mit der Propylengruppe verbunden, wie eine HMBC Kopplung von H-14 zu C-12 verdeutlichte.

Tabelle E13:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  sowie HMBC NMR Daten von Vermistatin (PAI 1-2)  
Die Spektren wurden in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) aufgenommen.

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMBC Korrelationen (H-C)
1	172.4 (s)		
3	76.1 (d)	6.35 (s)	1, 3a, 4, 7a, 9, 11
3a	128.9 (s)		
4	156.5 (s)		
5	106.0 (d)	6.89 (d 1.9 Hz)	3a, 4, 6, 7
6	164.8 (s)		
7	100.1 (d)	7.02 (d 1.9 Hz)	3a, 5, 7*, 7a
7a	128.9 (s)		
9	157.3 (d)	8.03 (s)	3, 11, 13, 14°
10	130.5 (s)		
11	179.8 (s)		
12	113.2 (d)	6.22 (s)	13, 14
13	162.1 (s)		
14	124.0 (d)	6.28 (dq 15.6 Hz 1.7 Hz)	12
15	138.3 (d)	6.89 (dq 15.6 Hz 6.9 Hz)	13
16	18.6 (q)	1.98 (dd 6.9 Hz 1.7 Hz)	14, 15
(4)-OCH <sub>3</sub>	56.5 (q)	3.86 (s)	4
(6)-OCH <sub>3</sub>	56.5 (q)	3.93 (s)	6

### 3.2.5.2. Bioaktivität von Vermistatin

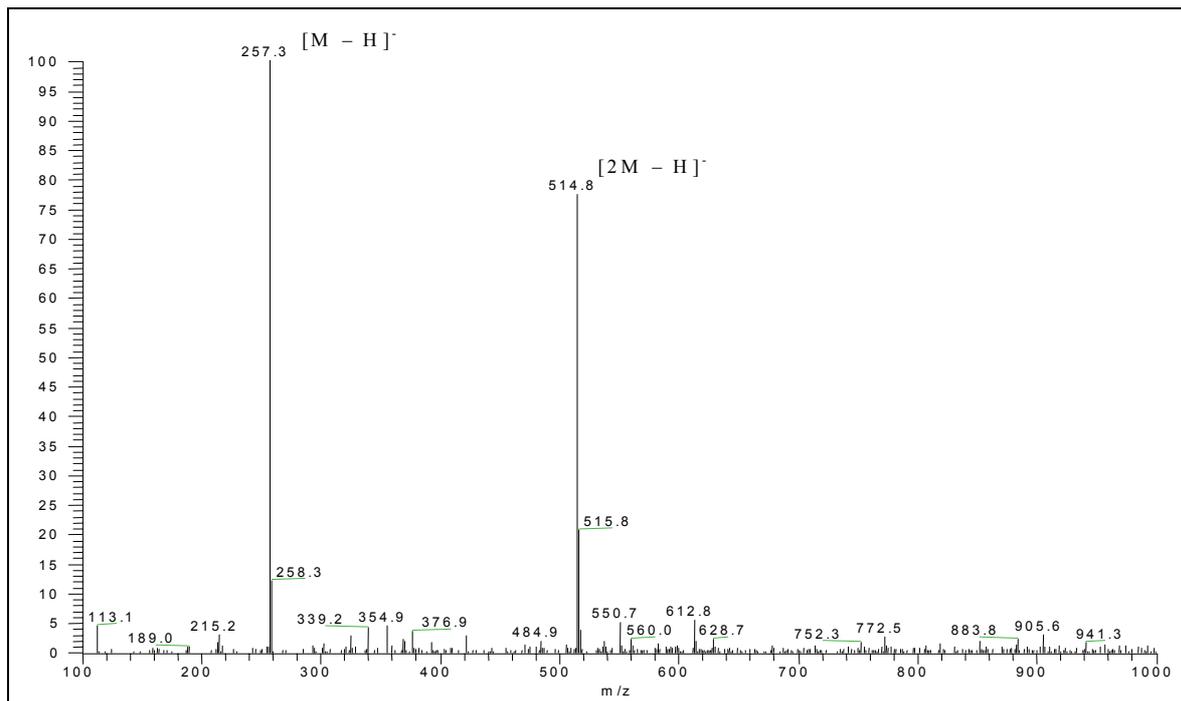
Vermistatin besitzt laut Literatur eine antibiotische Aktivität und weist auch eine Aktivität gegenüber Leukämie-Zelllinien auf [Fusaka *et al.*, 1979]. Vermistatin wurde den bereits im Material und Methodenteil beschriebenen Biotests unterzogen. Dabei zeigte Vermistatin im Antibiotikatest gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* eine schwache Aktivität. Hier traten Hemmhöfe von je 2 mm auf. Gegen die anderen Bakterienstämme sowie gegen den Pilz *Candida albicans* konnte keine Aktivität beobachtet werden.

Im „*brine shrimp assay*“ zeigte sich ebenfalls eine mäßige Aktivität. Bei 100  $\mu\text{g}$  eingesetzter Substanz wurden 8 von 20 Larven getötet.

Im Insektizidtest konnte keine Aktivität beobachtet werden.

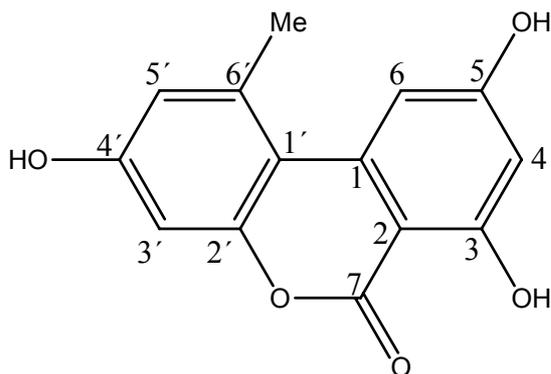
### 3.2.5.3. Strukturaufklärung von Alternariol (PAI 1-3)

Mit PAI 1-3 wurde aus *Penicillium citreonigrum* eine Substanz isoliert, die im UV von dem bereits beschriebenen Vermistatin deutlich abwich. Auch im  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum gab es kaum Ähnlichkeiten zum Vermistatin. Durch ein ESI-MS konnte ein Molgewicht von 258 g/mol festgestellt werden.



**Abb. E19:** ESI-MS von Alternariol (PAI 1-3) im negativen Modus

Bei der Suche in verschiedenen Datenbanken fielen zwei Substanzen ins Auge, die Ähnlichkeiten zu PAI 1-3 aufwiesen. Das Norlichexanthon und das Alternariol (17), wobei die UV-Daten des Alternariols (218 nm, 258 nm, 302 nm, 330 nm) deutlich besser zu PAI 1-3 (214 nm, 257 nm, 303 nm, 335 nm) paßten, als die vom Norlichexanthon. Ein Vergleich der NMR-Daten von PAI 1-3 mit denen des Djalonenson, ein 5-Methylether des Alternariols, räumte schließlich jeden Zweifel aus. Die NMR-Daten beider Verbindungen stimmten sehr gut überein, bis auf die Methoxygruppe an Position C-5 im Djalonenson. Stattdessen lag bei PAI 1-3 eine weitere OH-Gruppe vor, wie es beim Alternariol der Fall ist. Alternariol (3,4',5-Trihydroxy-6'-methyl-dibenzo- $\alpha$ -pyron) wurde erstmals aus einer Hefe der Gattung *Alternaria* isoliert [Raistrick *et al.*, 1953]. Für Alternariol wurde eine phytotoxische Aktivität angegeben [Raistrick *et al.*, 1953].

**Alternariol (17)**Beschreibung: weiß-braune feste SubstanzProbencode: PAI 1/3Substanzmenge: 5.3 mgSummenformel: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Molekulargewicht: 258 g/molQuellorganismus: *Penicillium citreonigrum*

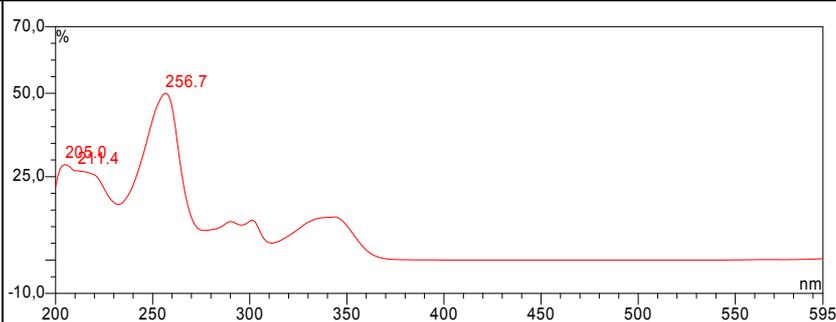
Retentionszeit: 32.15 min

Rf-wert: 0.35

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

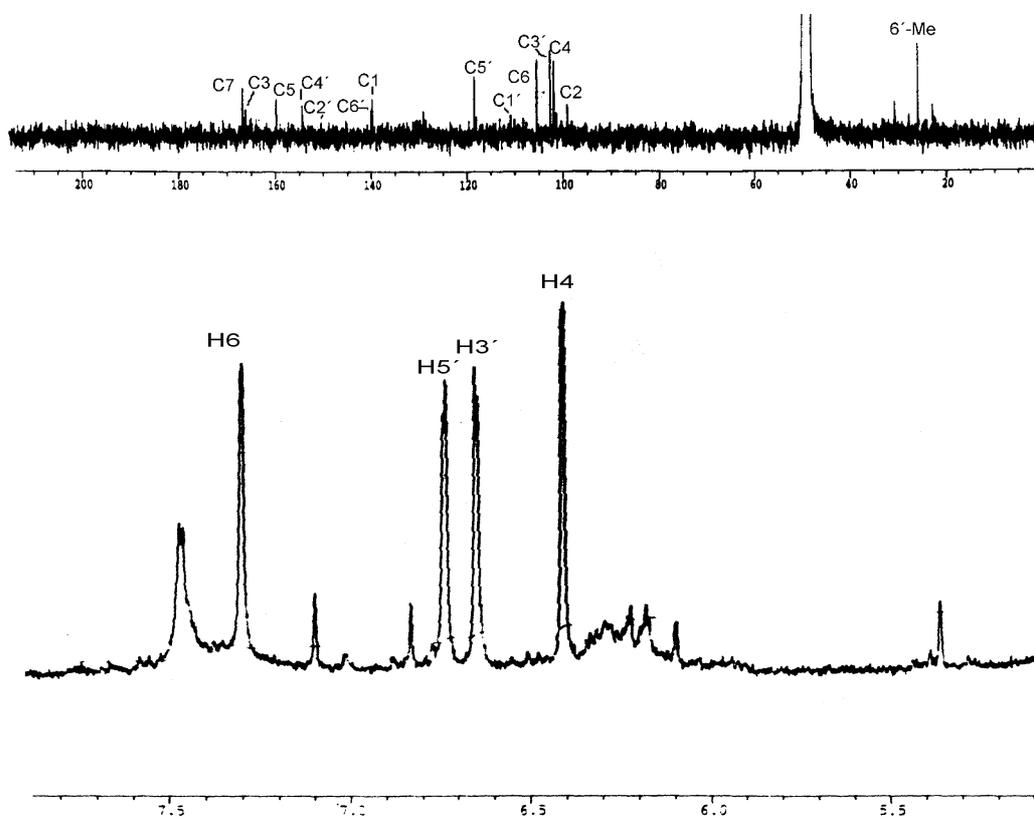
Eigenfluoreszenz 366 nm: +

+ Anisaldehyd: -

+ Vanillin /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: schwach gelb-braun(-)ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 515 [2M-H]<sup>-</sup> (80), 257 [M-H]<sup>-</sup> (100)

Im <sup>1</sup>H-NMR fallen vier Signale im aromatischen Bereich auf, die sich als zwei Pärchen mit Metakopplungen von 1.7 Hz und 2.2 Hz herausstellten. Weiterhin konnte bei 55.4 ppm im <sup>13</sup>C NMR eine Methylgruppe ausgemacht werden. Im <sup>13</sup>C- NMR konnten insgesamt 14 Signale ausgemacht werden. Durch ein DEPT Spektrum konnten vier CH-Gruppen sowie eine Methyl -Gruppe ausgemacht werden. Aufgrund der chemischen Verschiebung konnten fünf Atome, die ein Sauerstoffatom tragen mussten, detektiert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Vergleich mit den bereits publizierten Daten des strukturell sehr ähnlichen Djalonensons (Tab. E14). Da keine größere Abweichung festgestellt werden konnte und auch die UV- sowie die MS-Daten übereinstimmten, wurde auf die Aufnahme von 2 D-NMR Daten verzichtet.

# Ergebnisse



**Abb. E20:**  $^{13}\text{C}$  - und  $^1\text{H}$  - NMR des Alternariols (PAI 1-3)

Tab. E14:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Daten von PAI 1-3 und des Vergleichs Djaloneson; PAI 1-3 wurde in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) aufgenommen, das  $^{13}\text{C}$  - NMR des Vergleichs in  $\text{CDCl}_3$  bei 50.3 MHz, das  $^1\text{H}$  - NMR bei 200 MHz.

Position	Alternariol (PAI 1-3)		Djaloneson	
	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
1	139.8 (s)		138.1 (s)	
2	99.2 (s)		98.2 (s)	
3	166.2 (s)		164.3 (s)	
4	102.0* (d)	6.41 (d 1.7 Hz)	101.8 (d)	6.3(d 2.0 Hz)
5	159.9 (s)		161.3 (s)	
6	105.5 (d)	7.30 (d 1.7 Hz)	104.0 (d)	
7	166.9 (s)		165.5 (s)	7.1 (d 2.0 Hz)
1'	110.9 (s)		109.6 (s)	
2'	151.8 (s)		152.8 (s)	
3'	102.8* (d)	6.65*(d 2.2 Hz)	101.8 (d)	6.5 (d 2.0 Hz)
4'	154.5 (s)		157.9 (s)	
5'	118.6 (d)	6.74* (d 2.2 Hz)	117.5 (d)	6.5 (d 2.0 Hz)
6'	140.1 (s)		138.2 (s)	
5-OMe	-		55.4 (q)	
6'-Me	25.8 (q)		25.23 (q)	

\* Austauschbar, ohne HMBC Position nicht genau zu verifizieren

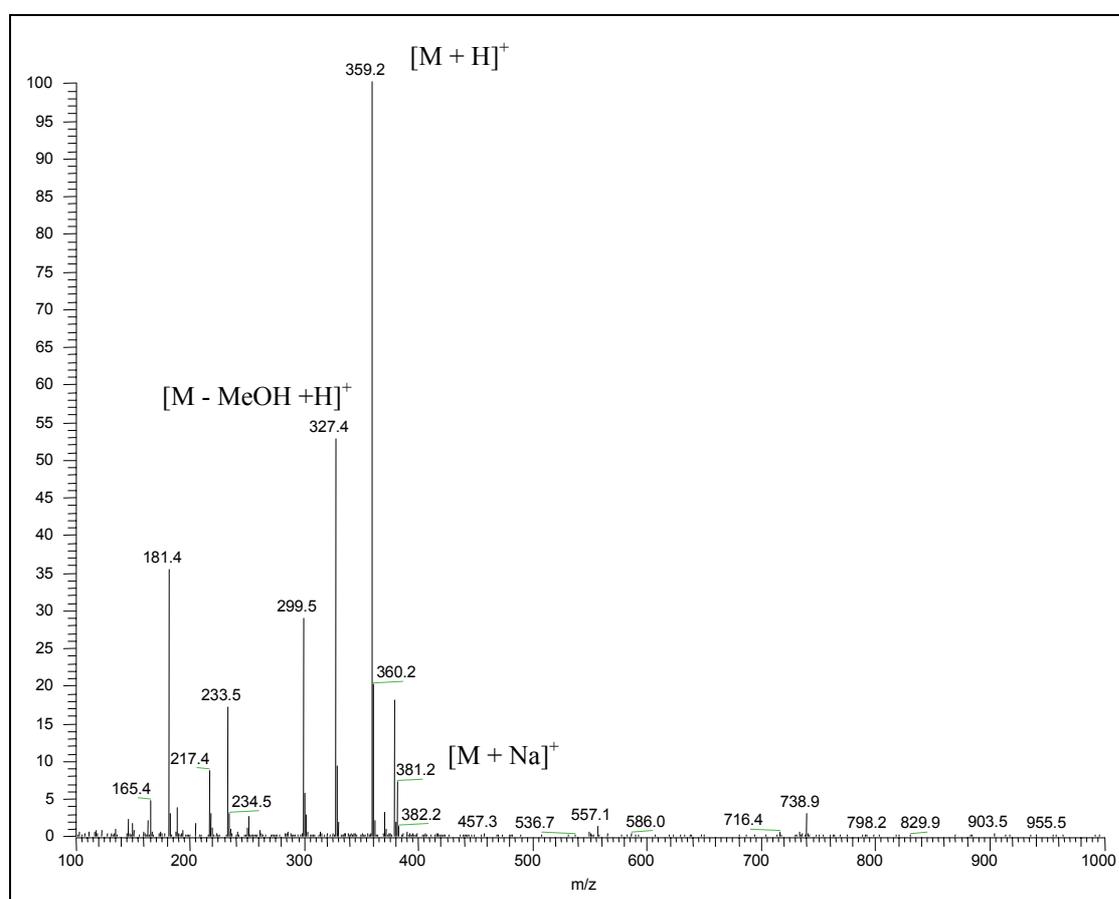
#### 3.2.5.4. Aktivität von Alternariol ( PAI 1-3)

Auch das Alternariol (PAI 1-3) wurde dem "*brine shrimp assay*", dem Insektizidtest und dem Antibiotikatest unterzogen. Dabei erwies sich der Naturstoff im "*brine shrimp assay*" als moderat aktiv. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}$  wurden 12 von 20 Nauplien abgetötet. Im Insektizidtest dagegen konnte weder eine letale Wirkung, noch eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *Spodoptera littoralis* beobachtet werden. Im Antibiotikatest fiel das Ergebnis ebenfalls negativ aus.

### 3.2.5.5. Strukturaufklärung von Desoxyfunicon (PAI 1-4)

PAI 1-4 zeigte im UV Absorptionsmaxima bei 209 nm und 251 nm. Damit zeigte es eine gewisse Ähnlichkeit zu PAI 1-2, auch wenn das zweite Maximum in seiner Intensität ausgeprägter war als beim Vermistatin (PAI 1-2).

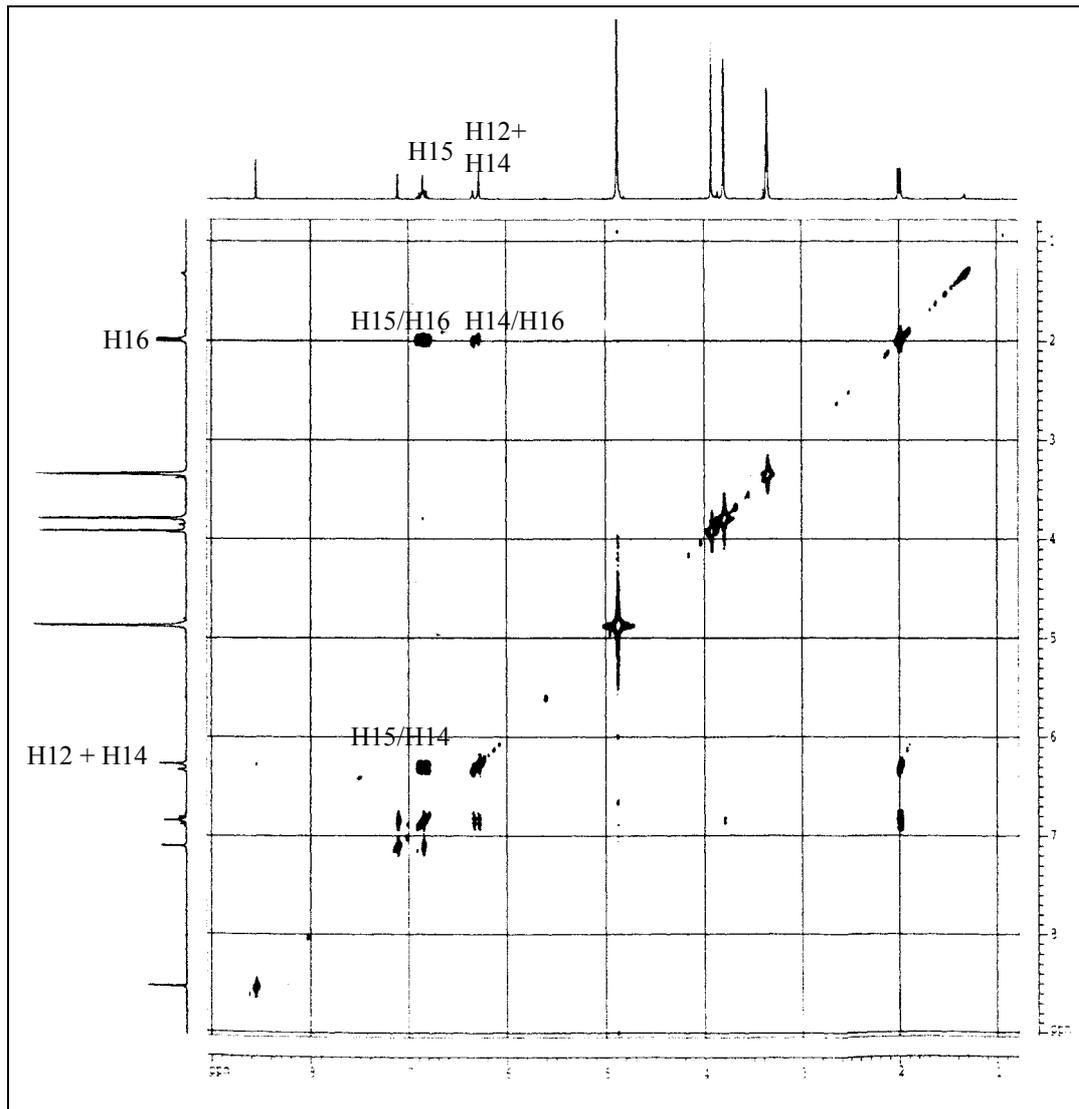
Durch ESI-MS konnte eine Masse von  $m/z$  358 festgestellt werden.



**Abb. E21** : ESI-MS von Desoxyfunicon (PAI1-4) im positiven Modus

Beim Vergleich der NMR-Daten fielen ebenfalls Ähnlichkeiten zu Vermistatin auf. Im COSY (Abb.22) konnte wieder eine Propylengruppe detektiert werden, wie schon beim Vermistatin. Auch die Metakopplung zweier Protonen bei 7.10 ppm und 6.85 ppm war erneut zu beobachten. Desweiteren konnten im <sup>1</sup>H NMR Spektrum die Signale bei 3.89 ppm, 3.91 ppm und 3.78 ppm aufgrund ihrer Verschiebung leicht Methoxygruppen zugeordnet werden. Ein Vergleich mit den Daten von Vermistatin

zeigte, dass auch in PAI 1-4 ein 1,2,3,5-tetrasubstituiertes Aromat zu finden war sowie ein  $\gamma$ -Pyrone. Deutlich wurde auch aufgrund der chemischen Verschiebung weiterer Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR, dass kein Lactonring vorliegen konnte. Vielmehr legte die chemische Verschiebung von 193.0 ppm und 168.0 ppm das Vorkommen von Ketogruppen nahe.



**Abb. E22:** COSY von Desoxyfunicon (PAI 1-4)

Beim Vergleich dieser NMR Daten mit Daten aus der Literatur konnte die Substanz schließlich als Desoxyfunicon identifiziert werden, das erstmals aus einem nicht näher bestimmten *Penicillium* Stamm 1991 isoliert wurde [Sassa *et al.*, 1992]. Weitere

Funicone sind aus *Penicillium funicolosum* [Merlini *et al.*, 1970] und *Penicillium sp.* [Kimura *et al.*, 1995] bekannt.

Da die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und COSY-NMR Daten sehr genau mit denen bereits beschriebenen Daten übereinstimmten wurde auf die Aufnahme eines HMBC-Spektrums verzichtet.

### Deoxyfunicon (**18**)

Beschreibung: braun-gelbliche feste Substanz

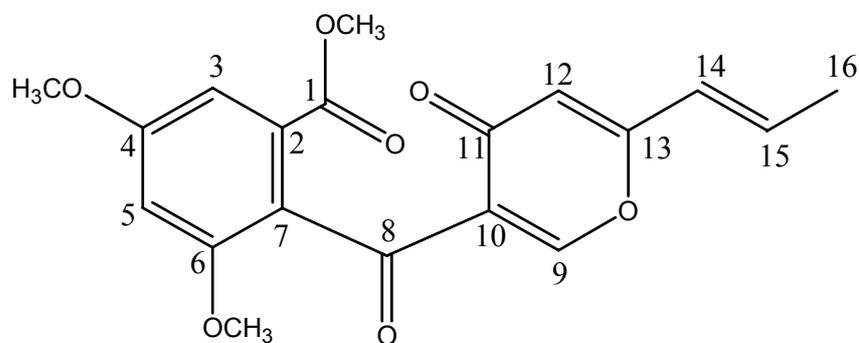
Probencode: PAI 1-4

Substanzmenge: 13.4 mg

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$

Molekulargewicht: 358 g/mol

Quellorganismus: *Penicillium citreonigrum*



Retentionszeit: 28.3 min

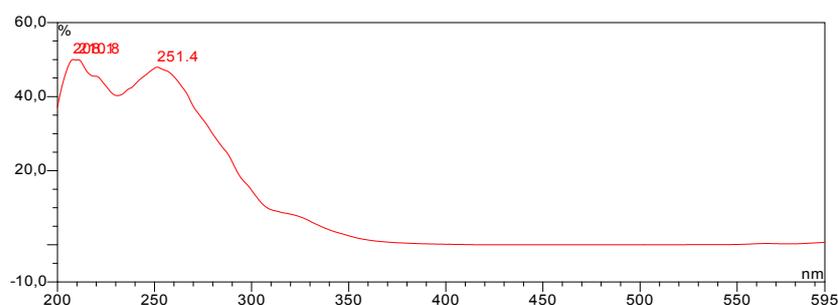
R<sub>f</sub>-wert: 0.68

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: schwach gelb

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



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 359 [M+H]<sup>+</sup> (100), 327 [M-MeOH+H]<sup>+</sup>

### 3.2.5.6. Biologische Aktivität von Desoxyfunicon (PAI 1-4)

In der Literatur wird angegeben, dass Deoxyfunicon das Wachstum von Wurzeln beim Chinakohl fördert. Weiterhin wurde eine fungizide Aktivität gegen *Giberrella jujikuroi*, *Pyricularia oryzae* und *Fusarium solani* beschrieben [Sassa *et al.*, 1991].

Im Antibiotikatest konnte keine Aktivität gegen die verwendeten gram-positiven und gram-negativen Stämme nachgewiesen werden. Auch gegen den Pilz *Candida albicans* wurde mit Deoxyfunicon keine Wirkung erzielt.

Im „brine shrimp assay“ war nur bei der Dosis von 250 µg eine leichte Aktivität zu beobachten, die sich in 4 toten Nauplien gegenüber 16 Überlebenden zeigte.

Gegen *Spodoptera littoralis* zeigte Deoxyfunicon in zwei verschiedenen Konzentrationen, die mit 250 ppm und 100 ppm recht hoch angesetzt waren, überhaupt keinen Effekt.

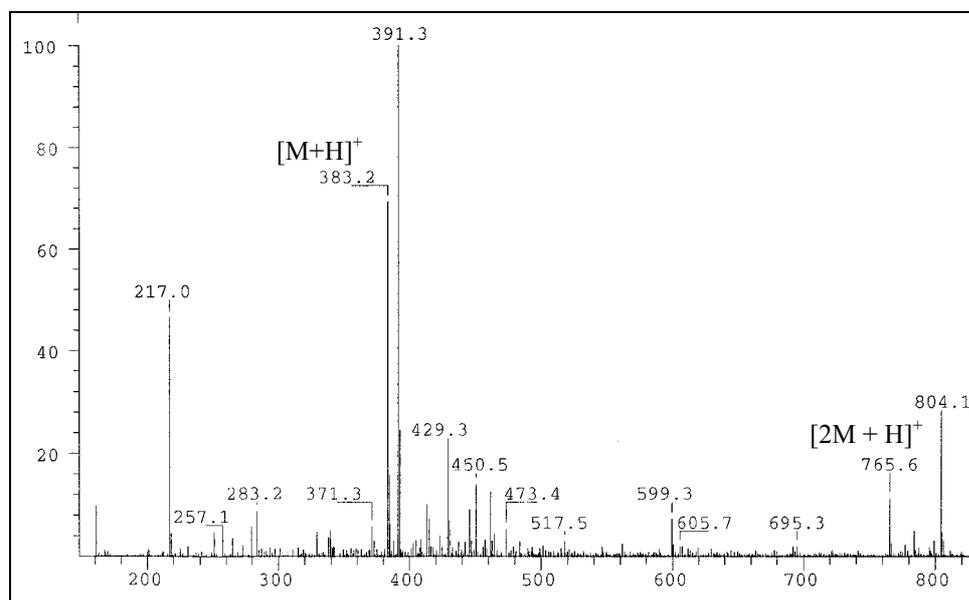
Tab. E15:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von Deoxyfunicon (PAI 1-4). Aufgenommen wurden die Spektren in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Pos	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
1	168.0 (s)	
2	131.9 (s)	
3	107.2 (d)	7.10 (d 2.2 Hz)
4	163.1 (s)	
5	103.5 (d)	6.85 (d 2.2 Hz)
6	159.5 (s)	
7	127.4 (s)	
8	193.0 (s)	
9	163.2 (d)	8.55 (s)
10	125.7 (s)	
11	178.3 (s)	
12	103.5 (d)	6.27 (br s)
13	164.1 (s)	
14	123.6 (d)	6.30 (dq 14.4 Hz, 1.7 Hz)
15	138.7 (d)	6.85 (dq 14.4 Hz, 6.9 Hz)
16	18.9 (q)	1.98 (dd 6.9 Hz, 1.6 Hz)
C1-OCH3	52.9 (s)	3.89 (s)
C4-OCH3	56.3 (s)	3.91 (s)
C6-OCH3	57.7 (s)	3.78 (s)

### 3.2.5.7. Strukturaufklärung von (-) Mitorubrin (PAI 1-7)

PAI 1-7 zeigte im UV in MeOH drei ausgeprägte Absorptionsmaxima bei 210 nm, 274 nm und 352 nm, sowie eine kleine Schulter bei 303 nm. Neben den bereits beschriebenen Substanzen Vermistatin und Deoxyfunicon wurde mit PAI 1-7 eine weitere Verbindung isoliert, die einige Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen

Substanzen aufwies. Durch ein ESI-MS konnte ein Molgewicht von 382 g/mol bestimmt werden.



**Abb. E23:** ESI-MS von Mitorubrin (PAI 1-7) im positiven Modus

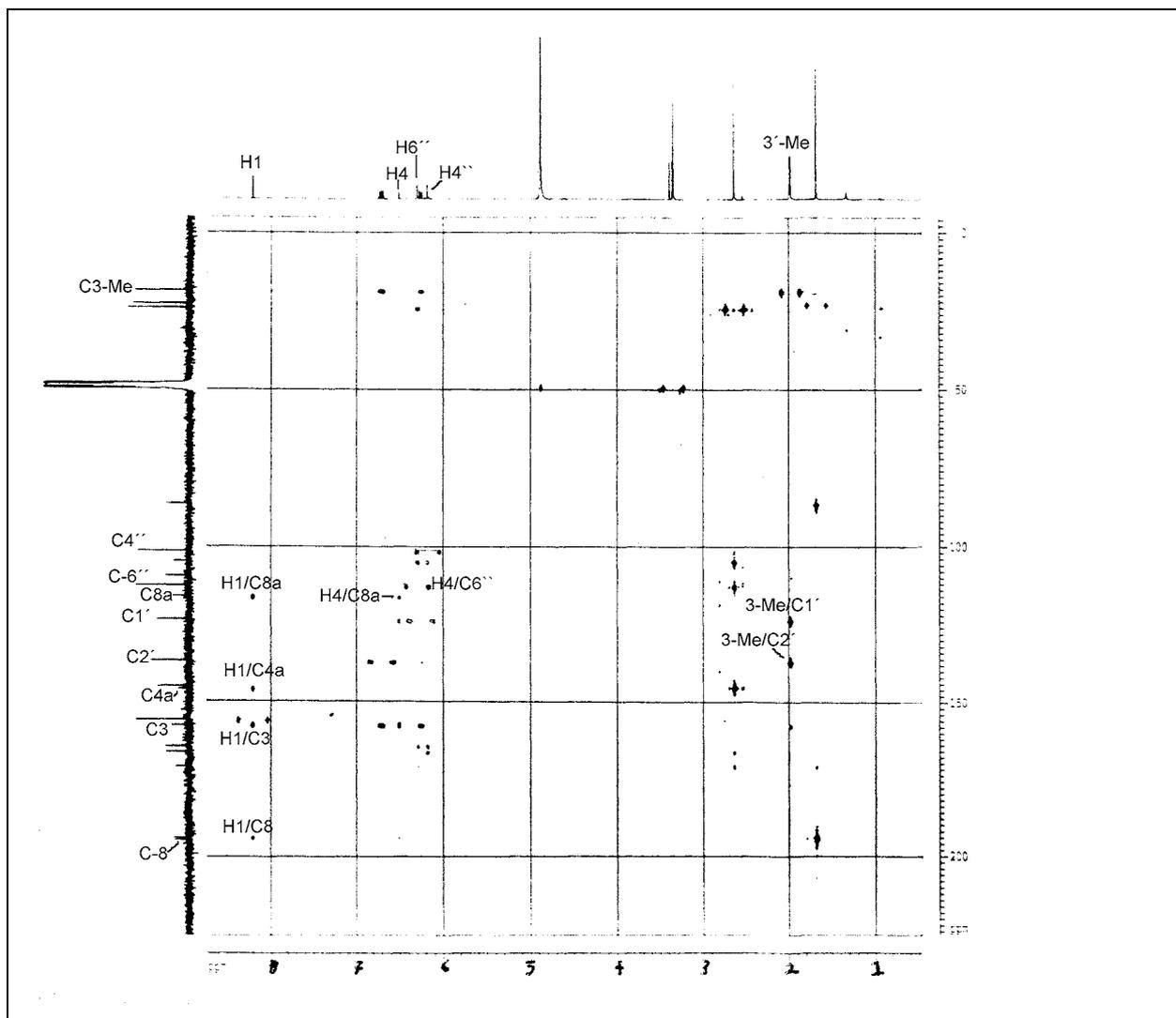
Erneut konnte eine Propylengruppe mittels COSY Daten detektiert werden. Bestätigt wurde dies ebenfalls durch HMBC-Signale von 3'-Me zu C-2' und C1' (Abb. E24). Auch die zuvor schon beobachtete Metakopplung von zwei Protonen tauchte erneut auf, was ebenfalls im HMBC beobachtet werden konnte. Weitere Signale im  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  machten deutlich, dass auch in PAI 1-7 wieder ein 1,2,3,5- tetrasubstituierter Aromat vorhanden war.

Durch eine Literatursuche konnte die Substanz PAI 1-7 bald als Mitorubrin (**19**) identifiziert werden. Mitorubrin wurde erstmals aus *Penicillium rubrum* isoliert [Büchi *et al.*, 1965]. Seitdem wurde es ebenfalls aus dem Fruchtkörper des Pilzes *Hypoxylon fragiforme* [Steglich *et al.*, 1974] isoliert. Nahe verwandte Mitorubrinderivate wurden aus einem Pilz der Gattung *Talaromyces* beschrieben [Suzuki *et al.*, 1999].

Im Unterschied zu den bereits beschriebenen Substanzen aus *Penicillium citreonigrum* besitzt Mitorubrin keine Methoxygruppen, diese wurden durch OH-Gruppen ersetzt. Auch der  $\gamma$ - Pyronring ist in Mitorubrin nicht zu finden. Die NMR-Daten, die sehr gut mit den bereits publizierten Daten übereinstimmen, zeigten vielmehr eine  $\alpha$ ,  $\beta$ - ungesättigten Carbonylfunktion an, die Teil eines sechsgliedrigen Ringsystems ist. Das neue Ringsystem ließ sich besonders an den HMBC

## Ergebnisse

Kopplungen von H-1 zu C-8, C-4a und C-8a sowie durch die Kopplung von H-4 zu C-8a erkennen. Das zusätzliche Ringsystem bringt neben zwei Carbonylfunktionen noch eine Methylgruppe mit und ist über eine Esterbindung an Position C-7 mit der 2,4- Dimethoxy- 6-methyl- benzoessäure (Orsellinsäure) substituenten verknüpft. Diese Verknüpfung wird im HMBC durch eine Kopplung von C-7 Me zu C1'' deutlich. Durch eine Messung des Drehwertes wurde bei Vergleich mit Literaturdaten deutlich, dass (-) - Mitorubrin isoliert worden war.



**Abb. E24:** HMBC von Mitorubrin (PAI 1-7), wichtige Kopplungen wurden beschriftet

(-)-Mitorubrin (**19**)

Beschreibung: gelbliche feste pudrige Substanz

Probencode: PAI 1-7

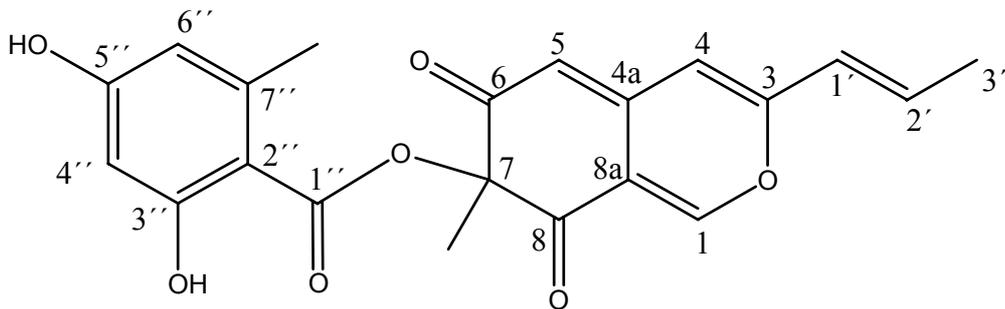
Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>

Quellorganismus: *Penicillium citreonigrum*

Substanzmenge: 12.4 mg

Molekulargewicht: 382 g/mol

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -48° (c = 0.1 MeOH)



Retentionszeit: 32.16 min

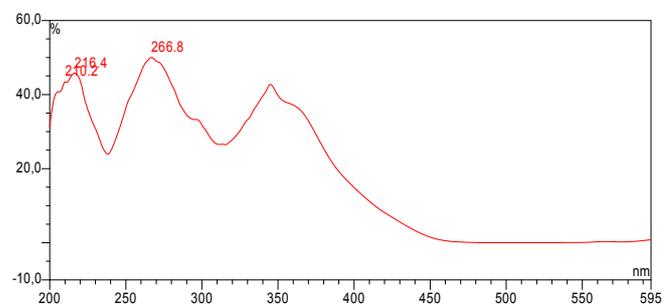
R<sub>f</sub>-wert: 0.55

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: braun-rot

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



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 804 (24), 765 [2M+H]<sup>+</sup> (20), 391 (100), 383 (M+H)<sup>+</sup> (78), 217 (52)

## Ergebnisse

Tab. E16:  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Daten vom (-) Mitorubrin (PAI 1-7) aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 300 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMBC C-H
1	156.1 (d)	8.05 (s)	1*, 3, 4a, 8, 8a
3	157.8 (s)		
4	109.7 (d)	6.51 (s)	1', 3, 4*, 8a
4a	146.1 (s)		
5	109.7 (d)	6.23 (s)	
6	194.0 (s)		
7	86.5 (s)		
Me-7	22.8 (q)	1.64 (s)	1''°, 6, Me-7*, 7
8	194.7 (s)		
8a	116.2 (s)		
1'	123.7 (d)	6.22 (dq 16.0 Hz 1.2 Hz)	1'', 3, 3'-Me
2'	137.0 (d)	6.58 (dq 16.0 Hz, 6.0 Hz)	2'', 3, 3'-Me
3'-Me	18.7 (q)	1.92 (dq 6.0 Hz 1.2 Hz)	1', 2', 3°, 3'-Me*
1''	171.1 (s)		
2''	104.9 (s)		
3''	166.4 (s)		
4''	101.7 (d)	6.14 (d 1.5 Hz)	2'', 3'', 4''*, 5'', 6''
5''	164.6 (s)		
6''	112.8 (d)	6.29 (d 1.5 Hz)	2'', 5'', 6''*
7''	145.3 (s)		
Me-7''	24.1 (q)	2.61 (s)	1''°, 2'', 3''°, 6'', 7'', Me-7''*

\* CH-Direktsignale

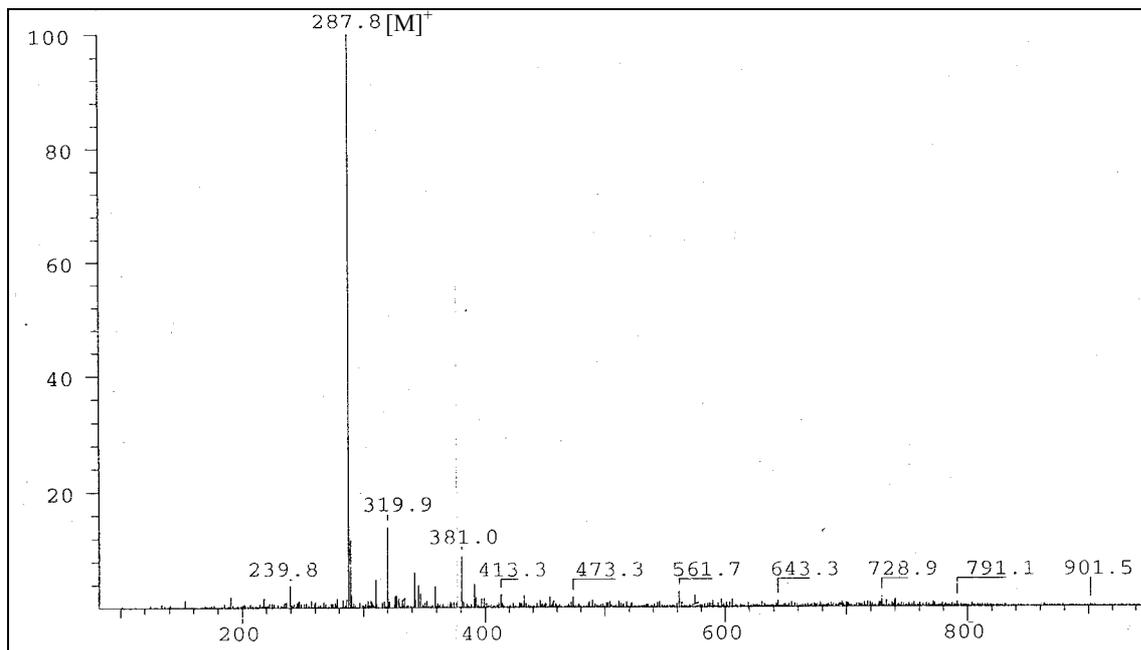
° Kopplungen über 4 Bindungen oder "through space"

### 3.2.5.8. Biologische Aktivität von Mitorubrin (PAI 1-7)

Für Mitorubrin wurden in den bereits bestehenden Veröffentlichungen keine nennenswerten Aktivitäten beschrieben. Dieses Bild bestätigten auch die eigenen Tests. Weder im antibiotischen Test noch im „*brine shrimp assay*“ und im Insektizidtest mit *Spodoptera littoralis* war eine Aktivität zu beobachten.

### 3.2.5.9. Strukturaufklärung von PAI 1-5

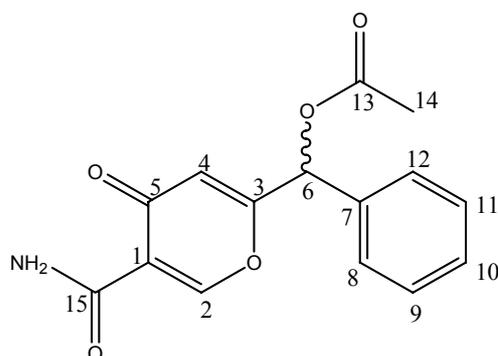
Die Substanz PAI 1-5 ist mit 287 g/mol (EIMS) die kleinste der aus *Penicillium citreonigrum* isolierten Verbindungen. Mit Hilfe einer EI-Hochauflösung wurde eine Summenformel von  $C_{15}H_{13}NO_5$  bestimmt.



**Abb. E25:** EI-MS von PAI 1-5

Im UV konnte ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 204 nm, eine kleine Schulter bei 211 nm und ein zweites kleineres Maximum bei 249 nm detektiert werden. Damit sind Ähnlichkeiten zu Vermistatin und Desoxyfunicon vorhanden. Ein Vergleich der NMR Daten mit denen von Vermistatin und Desoxyfunicon zeigte schnell, dass auch in PAI 1-5 wieder ein  $\gamma$ -Pyroneering zu finden war.

## PAI 1-5 (20)

Beschreibung: schmutzig weiße SubstanzProbencode: PAI 1-5Substanzmenge: 5.0 mgSummenformel: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>Molekulargewicht: 287 g/molQuellorganismus: *Penicillium citreonigrum*[α]<sub>D</sub>20: + 6.8 ° (c = 1.0 MeOH)

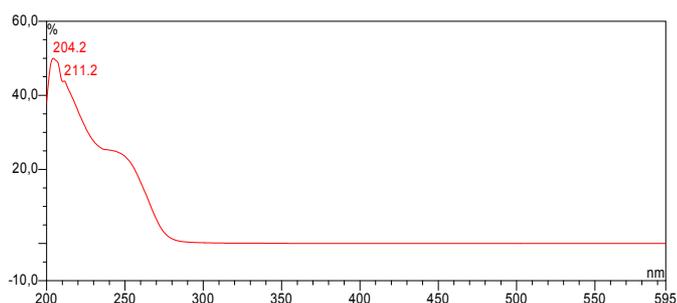
Retentionszeit: 22.58 min

R<sub>f</sub>-wert: 0.62

Fluoreszenzlöschung (254nm): +

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

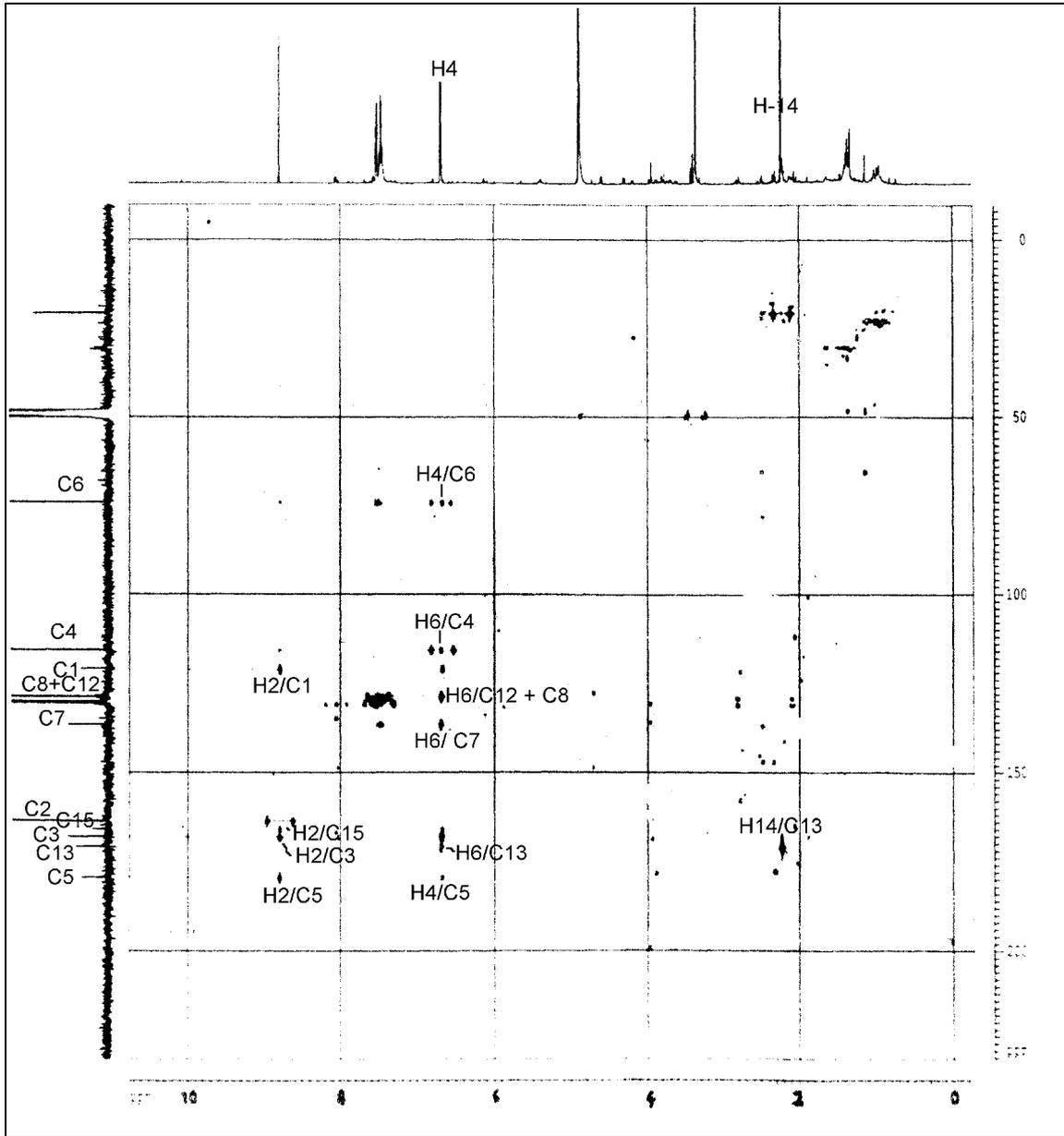
+ Anisaldehyd: schwach gelb

+ Vanillin /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: schwach gelbEI-MS (*m/z*, rel. Int.): 287 [M]<sup>+</sup> (100)

Die chemische Verschiebung eines Signals von 161.1 ppm im <sup>13</sup>C zeigte, dass eine Carbonylfunktion entweder als Ester oder als Amid vorliegen musste. Eine Kopplung im HMBC (**Abb. E26**) von H-2 zu dieser Carbonylfunktion legte die Position bei C-1 fest. Eine weitere Kopplung von H-4 zu C-6 zeigte deutlich, dass ein weiterer Substituent bei C-3 zu suchen war. Die Verschiebung des Kohlenstoffs C-6 machte auch deutlich, dass es ein Methin oder ein Sauerstoff substituierter Kohlenstoff sein musste. Die im HMBC beobachteten Kopplungen von H-6 zu C-13 und von H-14 zu C-13 zeigten, dass es sich bei dem Substituenten an Position C-6 um eine Acetoxygruppe handelte. Im aromatischen Bereich des <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C waren noch einige weitere Signale ausgemacht worden. Bei ihnen konnte es sich nur um einen monosubstituierten Aromaten handeln, was sich deutlich durch das Zusammenfallen einiger Signale zeigte und durch die chemische Verschiebung der entsprechenden

# Ergebnisse

Signale. Eine Kopplung im HMBC von H-8 bzw. von H-12 zu C-6 legte die Position des Aromaten bei C-6 fest. Nun blieb laut der Summenformel nur noch ein Amid übrig, das an C-15 zu suchen war.



**Abb. E26** : HMBC von PAI 1-5, wichtige Kopplungen wurden beschriftet

Tab. E17:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und HMBC-NMR-Daten von PAI 1-5, aufgenommen in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMBC Korrelationen (H-C)
1	120.8 (s)		
2	161.1 (d)	8.79 (s)	C-1, C-2*, C-3, C-5, C-15
3	167.9 (s)		
4	115.6 (d)	6.67 (s)	C-1, C-3, C-4*, C-5, C-6
5	178.5 (s)		
6	74.1 (d)	6.69 (s)	C-4, C-6*, C-7, C-8, C-12, C-13
7	136.5 (s)		
8/12	128.7 (d)	7.51 (m)	C-6, C-9, C-10
9/11	130.1 (d)	7.45 (m)	C-7
10	130.5 (d)	7.43 (m)	C-8, C-12
13	170.8 (s)		
14	20.6 (q)	2.23 (s)	C-13
15	163.6 (s)		

### 3.2.5.10. Biologische Aktivität von PAI 1-5

Der neue Naturstoff PAI 1-5 wurde den bereits beschriebenen Standardtests unterzogen (siehe Material und Methoden). Im Antibiotikatest zeigte PAI 1-5 nur eine schwache Aktivität gegen *E. coli*. Diese war bei einer Konzentration von 125  $\mu\text{g}$  mit einem Hemmhof-Durchmesser von 1.5 mm nur schwach ausgeprägt. Gegen die anderen getesteten Bakterienstämme sowie *Candida albicans* war keine Aktivität zu beobachten.

Beim „brine shrimp assay“ zeigte sich bei einer Dosis von 250  $\mu\text{g}$  eine leichte Aktivität. Bei dieser Dosis wurden 8 von 20 Nauplien abgetötet. Beim Test mit *Spodoptera littoralis* war weder ein toxischer Effekt noch ein wachstumshemmender Einfluss zu beobachten.

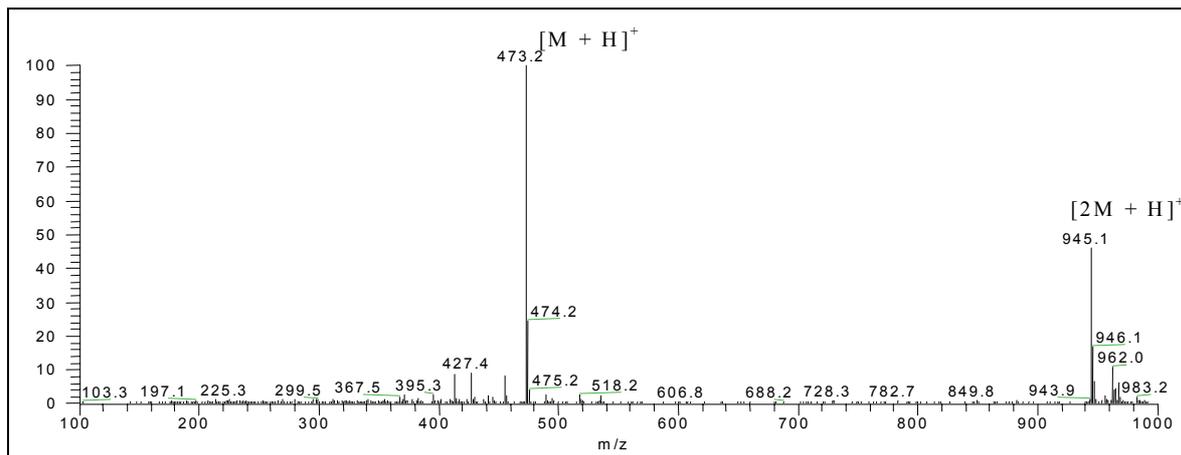
### 3.2.5.11 Strukturaufklärung von PAI 1-6 (21)

Neben den bereits beschriebenen Substanzen aus *Penicillium citreonigrum*, die allesamt Pyrone darstellen oder nahe mit ihnen verwandt sind, wurden zwei weitere Naturstoffe isoliert. Diese zeigten bereits in ihren UV-Spektren deutliche Unterschiede zu den bereits aufgeklärten Substanzen und eine große Ähnlichkeit zueinander. PAI 1-6 wies in MeOH zwei Maxima bei 204 nm und 249 nm auf,

## Ergebnisse

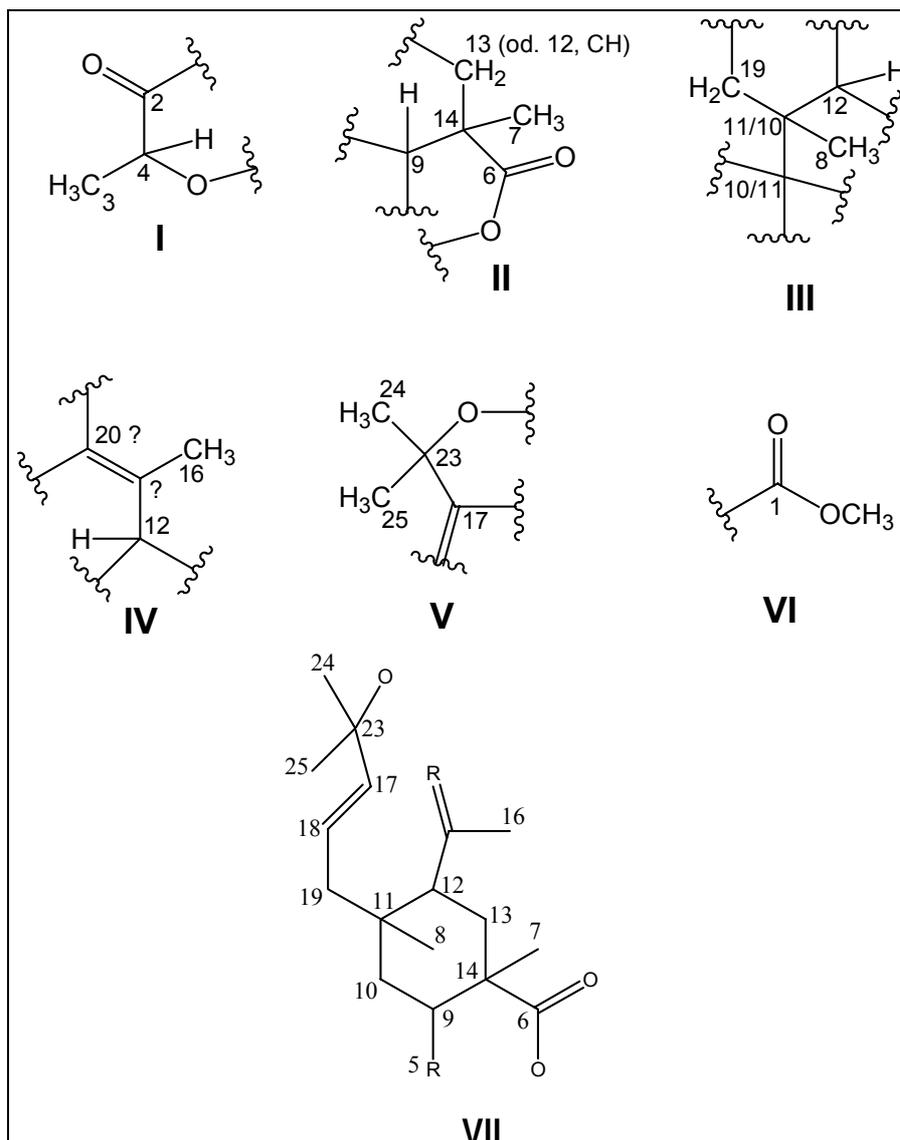
während PAI 1-8 ebenfalls zwei Maxima zeigte, die gegenüber PAI 1-6 leicht bathochrom verschoben waren und in MeOH bei 217 nm und 256 nm lagen.

Im ESI-MS ergab sich bei positiver Ionisierung ein  $m/z$  von 473 ( $[M + H]^+$ ), woraus ein Molekulargewicht von 472 für PAI 1-6 abgeleitet wurde. Durch HR-EIMS wurde eine Präzisionsmasse von 472.2140 g/mol bestimmt.



**Abb. E27:** ESI-MS von PAI 1-6 im positiven Modus

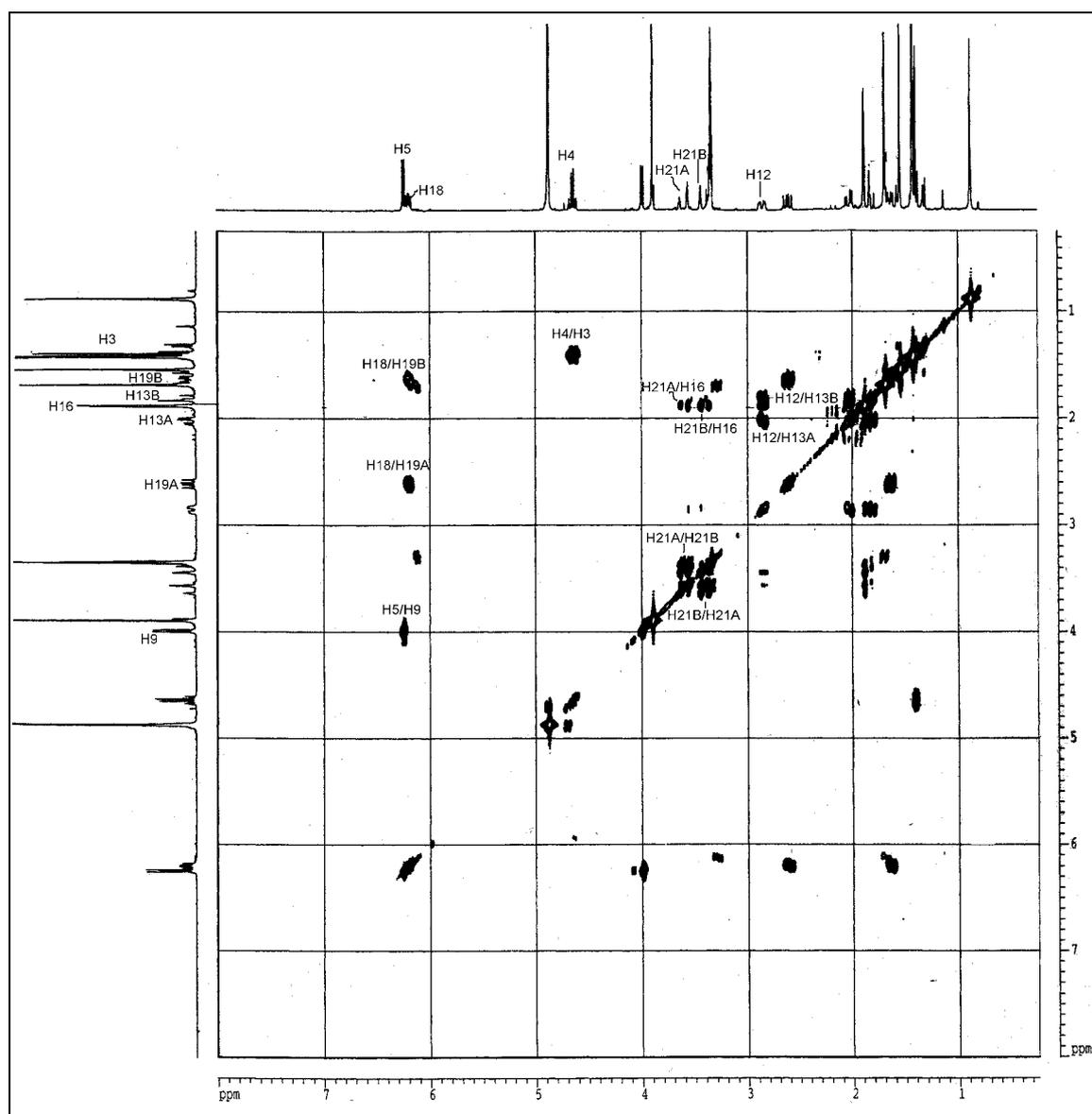
Zusammen mit den NMR-Daten ergab sich die Summenformel  $C_{26}H_{32}O_8$  für PAI 1-6 (**21**), was 11 Doppelbindungsäquivalenten entspricht. Eine Literatursuche in verschiedenen Datenbanken, darunter Antibase, Dictionary of Natural Products und Chemical Abstracts, die einige aus den HMBC- und COSY-Spektren abgeleitete Substrukturen (s.u.) einschloss, brachte keine Hinweise auf bereits bekannte Substanzen.



**Abb. E28:** Substrukturen von PAI 1-6

Im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum konnten lediglich vier kleine Spinsysteme sowie eine isolierte  $\text{CH}_2$ -Gruppe ausgemacht werden. Dabei handelte es sich um zwei  $\text{CH-CH}_2$ -, eine  $\text{CH-CH-}$  und eine  $\text{CH}_3\text{-CH}$ -Partialstruktur. Für die Aufklärung der Struktur von PAI 1-6 musste somit das HMBC-Spektrum herangezogen werden. Dabei erwies es sich als vorteilhaft, zunächst mit den gut zu erkennenden Korrelationen der verschiedenen in der Verbindung enthaltenen Methylprotonen zu beginnen. Insgesamt konnten die sechs in Abb. 7 mit I – VI gekennzeichneten Partialstrukturen abgeleitet werden.

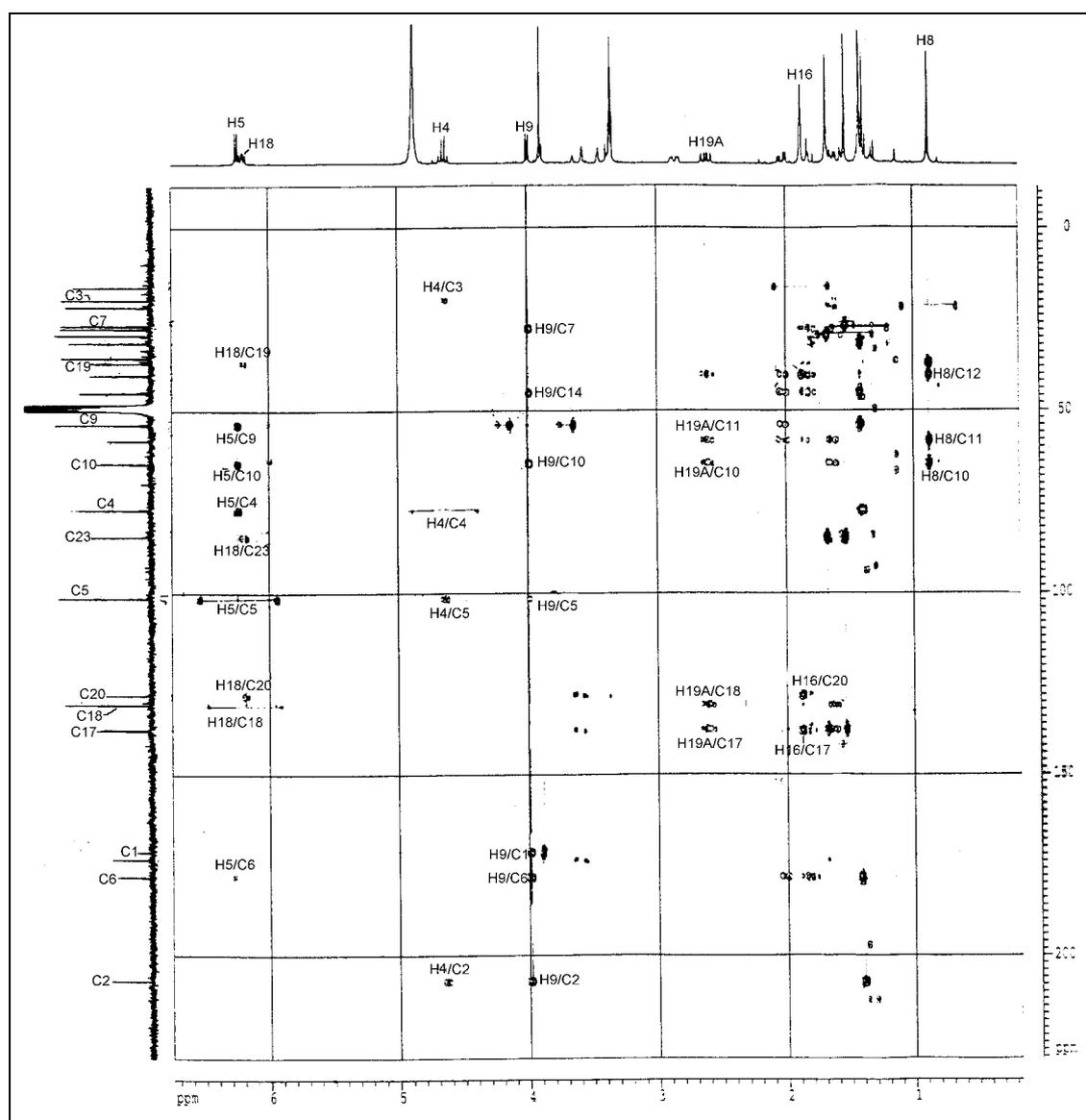
## Ergebnisse



**Abb. E29:** COSY NMR-Daten von PAI 1-6, Signale der detektierten Spinsysteme wurden beschriftet

Schon aufgrund seiner Multiplizität (d, 6.6 Hz) musste H-3 einer CH-Gruppe benachbart sein. Sowohl aus dem HMBC- als auch dem COSY-Spektrum ergab sich, dass es sich dabei um C-4 bzw. H-4 handeln musste. Im HMBC-Spektrum trat zusätzlich lediglich eine weitere Korrelation zu einem Signal bei  $\delta$  207.0 auf, bei dem es sich folglich nur um eine Ketogruppe handeln konnte. Das Fehlen der dritten möglichen Korrelation und die chemische Verschiebung von C-4 (77.1 ppm) legten nahe, dass letzteres einen Sauerstoffsubstituenten tragen musste (**Abb. E29, Partialstruktur I**). Dagegen erschien H-7 als Singulett im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und

musste somit an einem quartären C-Atom verknüpft sein. Von allen beobachteten Korrelationen im HMBC-Spektrum kam dafür nur C-14 in Betracht (**siehe Abb. E29, II**). HMBC Kopplungen zeigten, dass es sich bei den benachbarten C-Atomen um die Positionen C-6, C-7 und C-9 handeln musste. Es wurde auch deutlich, dass eine Kopplung über vier Bindungen vorlag. So war an diesem Punkt nicht zu entscheiden, ob neben C-14 C-12 oder C-13 zu suchen war. Aufgrund der chemischen Verschiebung wurde außerdem noch deutlich, dass an C-6 ein Amid oder Ester vorlag. Da Stickstoff im Molekül nicht vorhanden war, musste ein Ester vorhanden sein.



**Abb. E30:** HMBC von PAI 1-6

Eine weitere Substruktur (**Abb. 29, III**) konnte über die HMBC Kopplungen ausgehend von der Methylgruppe 8 ermittelt werden. Auch die Methylgruppe an Position 8 sitzt wieder an einem quartären C-Atom. Weitere Kopplungen zeigen, dass die Kohlenstoffatome 10 und 11 in der Nähe zu finden sind. Allerdings konnte hier noch nicht hinreichend geklärt werden, ob die Methylgruppe an C-10 oder C-11 zu finden ist. Eine Korrelation zu C-12 legt außerdem den Schluß nahe, dass in Partialstruktur II die Position 13 diejenige neben C-14 ist, bei der Kopplung zu C-12 handelt es sich dagegen über eine Korrelation über vier Bindungen.

Die Verschiebung von der Methylgruppe 16 (**Abb. 29, IV**) zeigt, dass sie an einem Kohlenstoff mit einer Doppelbindung sitzen muss. HMBC Kopplungen zeigen weiterhin, dass die Positionen C-12 und C-20 bei C-16 zu finden sind und eine Kopplung über zwei Bindungen fehlt. Somit konnte das C-Atom, das die Methylgruppe trägt noch nicht bestimmt werden.

Die letzten beiden Methylgruppen zeigten im HMBC Signale zueinander. Dies und weitere HMBC Kopplungen führten zu einer weiteren Partialstruktur (**Abb. 29, V**). Kopplungen von beiden Methylgruppen zu C-23 machten deutlich, dass diese Position unmittelbar neben den Methylgruppen zu suchen ist. Die Verschiebung von C-23 lässt außerdem als weiteren Substituenten einen Sauerstoff vermuten. In die andere Richtung ist das Kohlenstoff C-17 zu finden, wie eine HMBC-Kopplung von der Methylgruppe an Position 25 zu C-17 deutlich macht.

Neben den Methylgruppen konnte bei 3.90 ppm im  $^1\text{H-NMR}$  eine Methoxy-Gruppe detektiert werden. Die HMBC-Kopplungen dieser Gruppe führten zu Substruktur VI.

Mit Hilfe der COSY-Daten, sowie weiteren HMBC-Korrelationen lassen sich die Partialstrukturen zu einem Grundgerüst zusammenfügen (**Abb. 29, VII**). Der Ringschluss von Ring C wird durch die HMBC-Korrelationen von C-9 zu C-10 bzw. zu C-14 deutlich. Außerdem konnte nun auch C-11 durch eine Korrelation von C-18 zu C-11 zugeordnet werden. Deutlich wurde nun auch, dass zwischen C-17 und C-18 eine Doppelbindung zu finden ist. Außerdem konnte nun das übriggebliebene Signal im aromatischen Bereich dem Kohlenstoff C-15 in der Partialstruktur IV zugeordnet werden.

Die Verschiebung im  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  von C-5 machte deutlich, dass ein acetalisches System vorliegen musste. Zusammen mit HMBC Kopplungen von C-5 zu C-6 und von C-5 zu C-4 zeigte sich, dass es einen B-Ring gab, und dass die Partialstruktur I

# Ergebnisse

durch einen Sauerstoff getrennt neben C-5 zu finden war. Eine HMBC-Kopplung von C-9 zu C-2 machte außerdem den Ringschluss von Ring A deutlich.

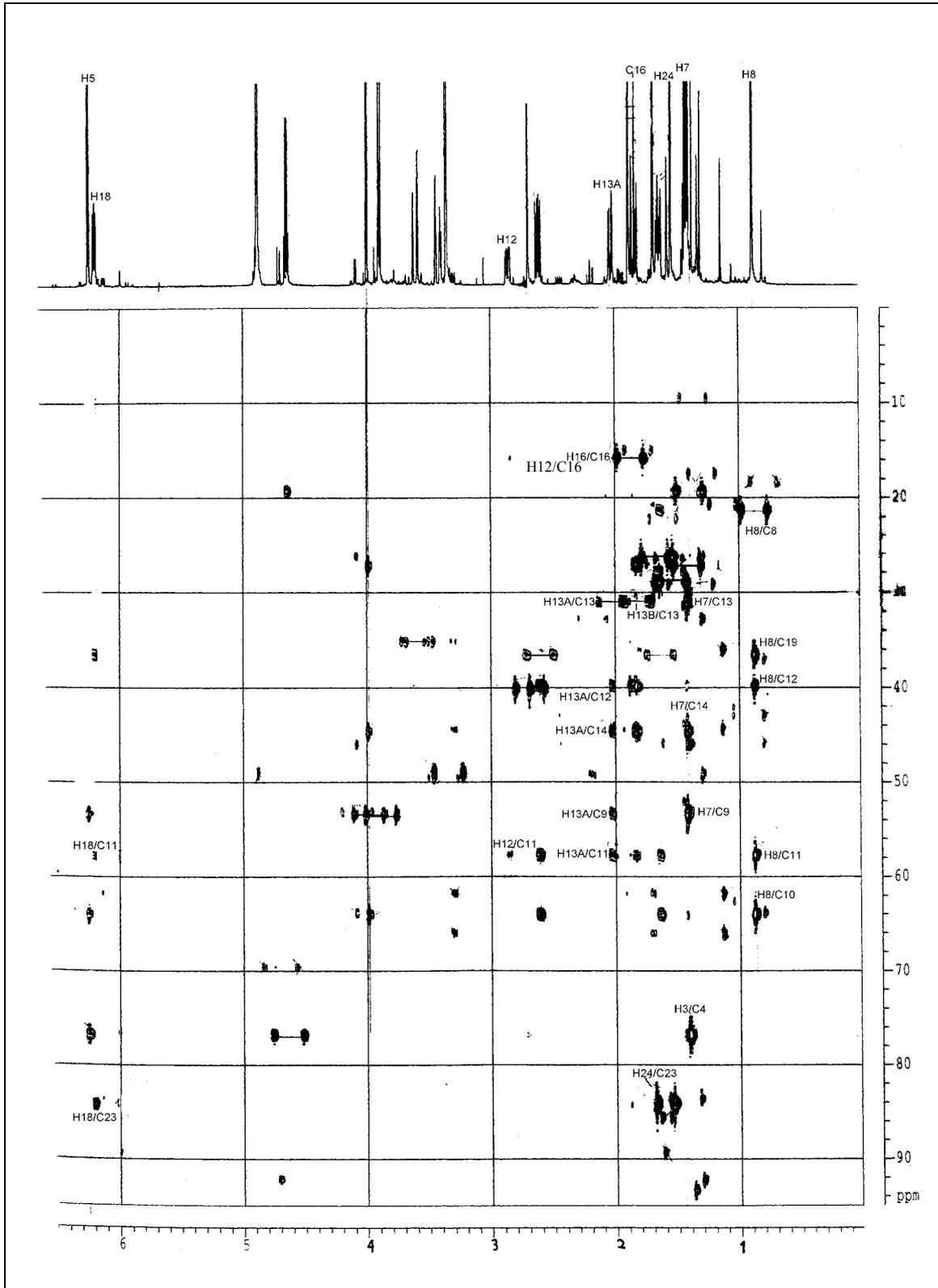


Abb. E31: HMBC Vergrößerung von PAI 1-6

Nun waren nur noch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe, eine CO-Gruppe sowie ein Carbonsäuremethylester noch nicht zugeordnet. Der Carbonsäuremethylester konnte aufgrund einer HMBC-Korrelation von C-9 zu C-1 an C-10 ausgemacht werden. Die CH<sub>2</sub>-Gruppe zeigte HMBC-Korrelationen zur übriggebliebenen CO-Gruppe, die aufgrund der Verschiebung ebenfalls im Verdacht stand, ein Ester statt einer einfachen CO-Gruppe zu sein.

Bei dieser Teilstruktur waren noch zwei Doppelbindungsäquivalente übrig. Aufgrund der Summenformel sprach alles für zwei weitere Ringe in PAI 1-6, womit alle Doppelbindungsäquivalente aufgebraucht wären. Der Ringschluss im Ring E zeigte sich deutlich durch die HMBC-Kopplung von C-21 zu C-22 und C-17. Die Kopplung von C-12 zu C-20 und C-16 zu C-20 macht auch den Ringschluss in Ring D deutlich. Nachdem die Struktur mit Hilfe der NMR-Daten aufgeklärt werden konnte, zeigte eine erneute Literatursuche, dass es sich mit PAI 1-6 tatsächlich um eine neue Verbindung handelte. Verwandte Verbindungen waren allerdings bereits isoliert worden. 1983 wurden die Substanzen ED-1 und ED-2 aus dem Pilz *Emericella dentata* isoliert [Maebayashi *et al.*, 1982], 1983 folgte Paraherquonin aus *Penicillium paraherquei* [Okuyama *et al.*, 1983]. Die genannten Strukturen wurden durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Der größte Unterschied zum Paraherquonin liegt im Fehlen eines F-Ringes. Stattdessen findet sich in PAI-6 an Position C-2 eine Ketongruppe sowie an Position 10 ein Carbonsäuremethylester. Im Unterschied zum Paraherquonin gibt es in PAI 1-8 keine OH-Gruppe und im E Ring liegt eine CH<sub>2</sub> Gruppe vor. ED-1 und ED-2 besaßen im Gegensatz zu PAI 1-6 eine Exomethylengruppe sowie einen Hexanring statt des Heptanringes von PAI 1-6. Die absolute Konfiguration von PAI 1-6 konnte bislang nicht näher geklärt werden. Auch ein NOE-Spektrum führte zu keinen klaren Ergebnissen. Für eine Röntgenstrukturanalyse, wie sie bei den verwandten Verbindungen angewendet wurde, standen leider keine geeigneten Kristalle zur Verfügung.

PAI 1-6 (21)

Beschreibung: weiß-braune Substanz

Probencode: PAI 1-6

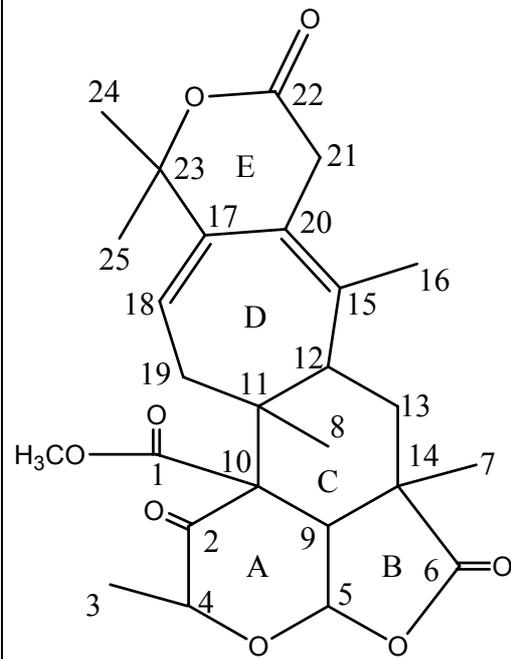
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>

Quellorganismus: *Penicillium citreonigrum*

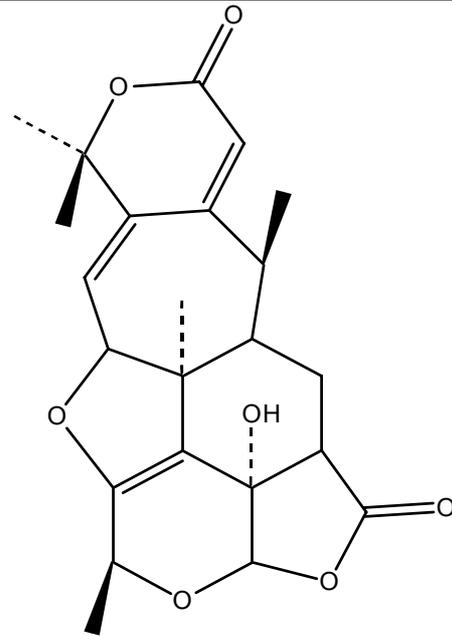
Substanzmenge: 13.0 mg

Molekulargewicht: 472 g/mol

[α]<sub>D</sub>20: + 22° (c = 1.0 MeOH)



PAI 1-6



Paraherquonin

Retentionszeit: 27.9 min

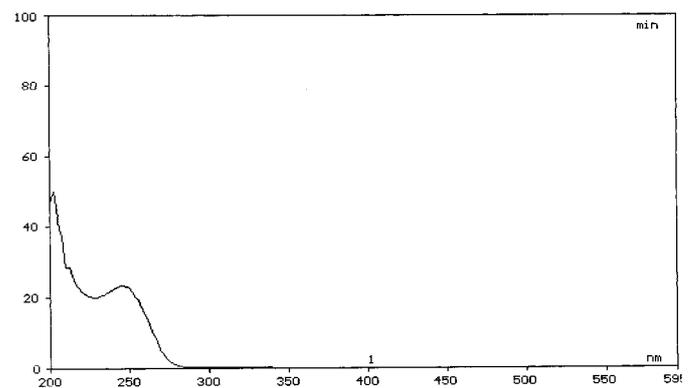
R<sub>f</sub>-wert: 0.84

Fluoreszenzlöschung (254nm): schwach

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: schwach gelb

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



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 945 [2M+H]<sup>+</sup> (45), 473 [M+H]<sup>+</sup> (100)

Tab. E18:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und HMBC-Daten von PAI 1-6. Die Messung erfolgte in CD3OD bei 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), ein COSY wurde bei 300 MHz aufgenommen.

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (H-C)
1	171.2 s		
2	207.0 s		
3	19.6 q	1.41 (d, 6.6 Hz)	2, 3*, 4
4	77.1 d	4.64 (q, 6.6 Hz)	2, 3, 4*, 5
5	101.3 d	6.25 (d, 5.3 Hz)	4, 5*, 6, 9, 10
6	178.2 s		
7	27.4 q	1.43 (s)	6, 7*, 9, 12, 13, 14
8	21.6 q	0.88 (s)	8*, 10, 11, 12, 19
9	53.7 d	3.99 (d, 5.3 Hz)	1, 2, 5, 6, 7, 9*, 10, 14
10	64.3 s		
11	58.0 s		
12	40.1 d	2.86 (dd, 14.1 Hz, 3.3 Hz)	11, 12*, 15, 16, 20
13	31.3 t	13 <sub>A</sub> : 2.03 (dd, 14.2 Hz, 4.3 Hz) 13 <sub>B</sub> : 1.83 (t, 14.1 Hz)	6, 9, 11, 12, 13*, 14, 20 6, 11, 12, 13*, 14, 20
14	44.9 s		
15	137.7 s		
16	16.1 q	1.88 (br s)	12, 16*, 17, 20
17	137.4 s		
18	130.6 d	6.20 (dd, 5.3 Hz, 8.2 Hz)	11, 17, 18*, 19, 23
19	36.8 t	19 <sub>A</sub> : 2.61 (dd, 14.1 Hz, 8.2 Hz) 19 <sub>B</sub> : 1.64 (dd, 14.0 Hz, 5.5 Hz)	10, 11, 17, 18, 19* 8, 10, 11, 17, 18, 19*
20	128.0 s		
21	35.4 t	21 <sub>A</sub> : 3.60 (dt, 21.4 Hz, 1.0 Hz) 21 <sub>B</sub> : 3.42 (dquin, 21.4 Hz, 1.7 Hz)	17, 20, 21*, 22 17, 20, 21*, 22
22	173.4 s		
23	84.5 s		
24	29.2 q	1.54 (s)	17, 23, 24*, 25
25	26.6 q	1.69 (s)	24, 25*
OMe	53.7 q	3.90 (s)	1, OMe*

\* Direkt Signale

### 3.3.5.12. Biologische Aktivität von PAI 1-6

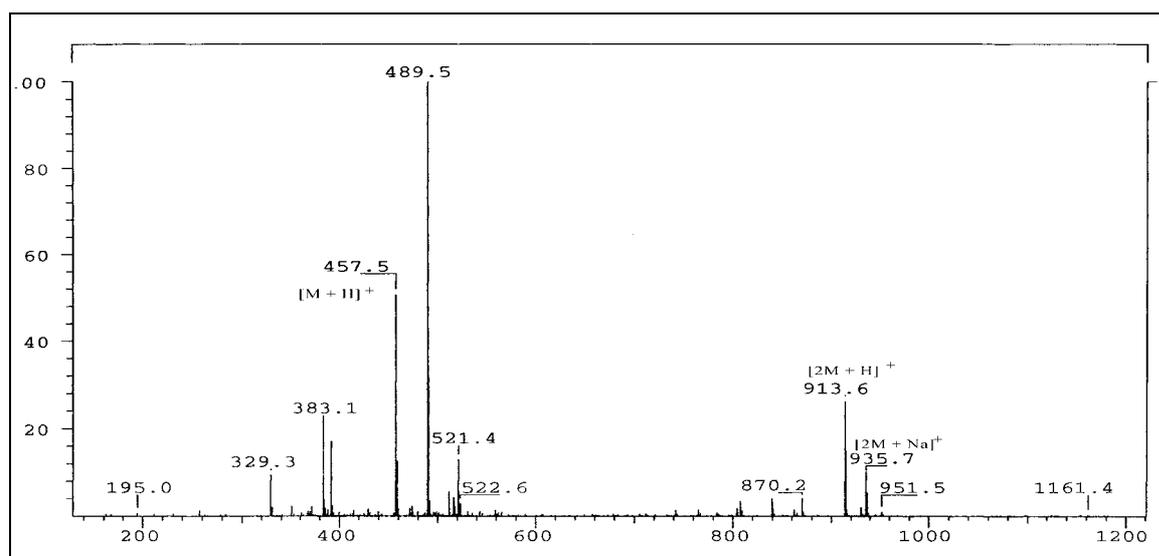
Der neue Naturstoff PAI 1-6 wurde allen bisher beschriebenen Standardtest unterzogen. Im antibiotischen Assay konnte bei den Standardstämmen keine nennenswerte Aktivität beobachtet werden, auch gegen *Candida albicans* zeigte sich nur eine minimale Aktivität. Beim Test mit *Artemia salina* zeigte sich bei 100  $\mu\text{g}$  eine moderate Aktivität, von 29 Nauplien überlebten 11. Weitere Untersuchungen zur Zytotoxizität mit verschiedenen Zelllinien verliefen ergebnislos. Im Insektizidtest war

keine toxische Wirkung zu beobachten, auch eine Fraßhemmung oder Wachstumsbeeinflussung war nicht zu beobachten.

### 3.3.5.13. Strukturaufklärung von PAI 1-8

Wie bereits unter 3.3.5.11 beschrieben, wies PAI 1-8 eine große Ähnlichkeit zu PAI 1-6 auf. Aber nicht nur die UV-Spektren ähnelten sich, auch im NMR waren große Übereinstimmungen zu beobachten.

Im ESI-MS (**Abb. E32**) ergab sich bei positiver Ionisierung u.a. ein  $m/z$  von 457 ( $[M + H]^+$ ), woraus ein Molekulargewicht von 456 g/mol für PAI 1-8 abgeleitet wurde. Durch HR-EI-MS wurde eine Präzisionsmasse von 546.5268 g/mol bestimmt.



**Abb. E32:** ESI-MS von PAI 1-8 im positiven Modus

Zusammen mit den NMR-Daten ergab sich für PAI 1-8 die Summenformel  $C_{26}H_{32}O_7$ . Damit war die Summenformel der von PAI 1-6 ( $C_{26}H_{32}O_8$ ) sehr ähnlich, der Unterschied betrug lediglich ein Sauerstoff.

Wie bereits beschrieben, erbrachte eine Literatursuche zunächst keine Hinweise auf schon bekannte Verbindungen.

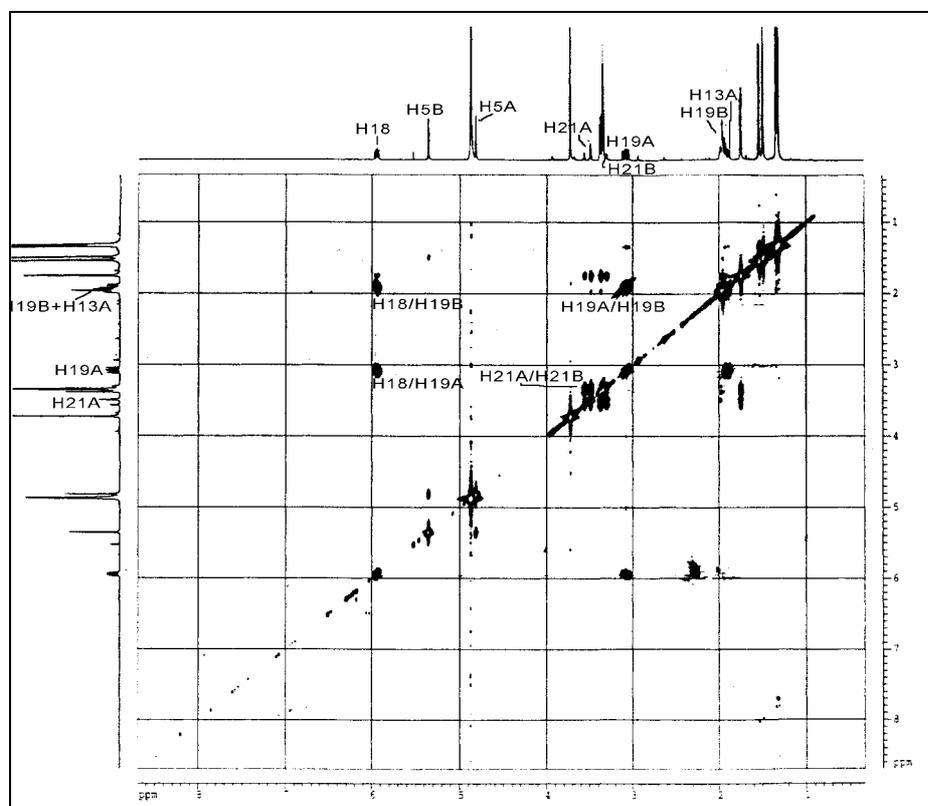
Im  $^1H$ - $^1H$ -COSY-Spektrum (**Abb. E33**) konnten im Gegensatz zu PAI 1-6 nur ein kleines Spinsystem, sowie zwei isolierte  $CH_2$ -Gruppen ausgemacht werden. Ein

weiteres Spinsystem wurde vermutet, konnte aber nicht eindeutig identifiziert werden, da die entsprechenden Signale zu eng zusammen lagen.

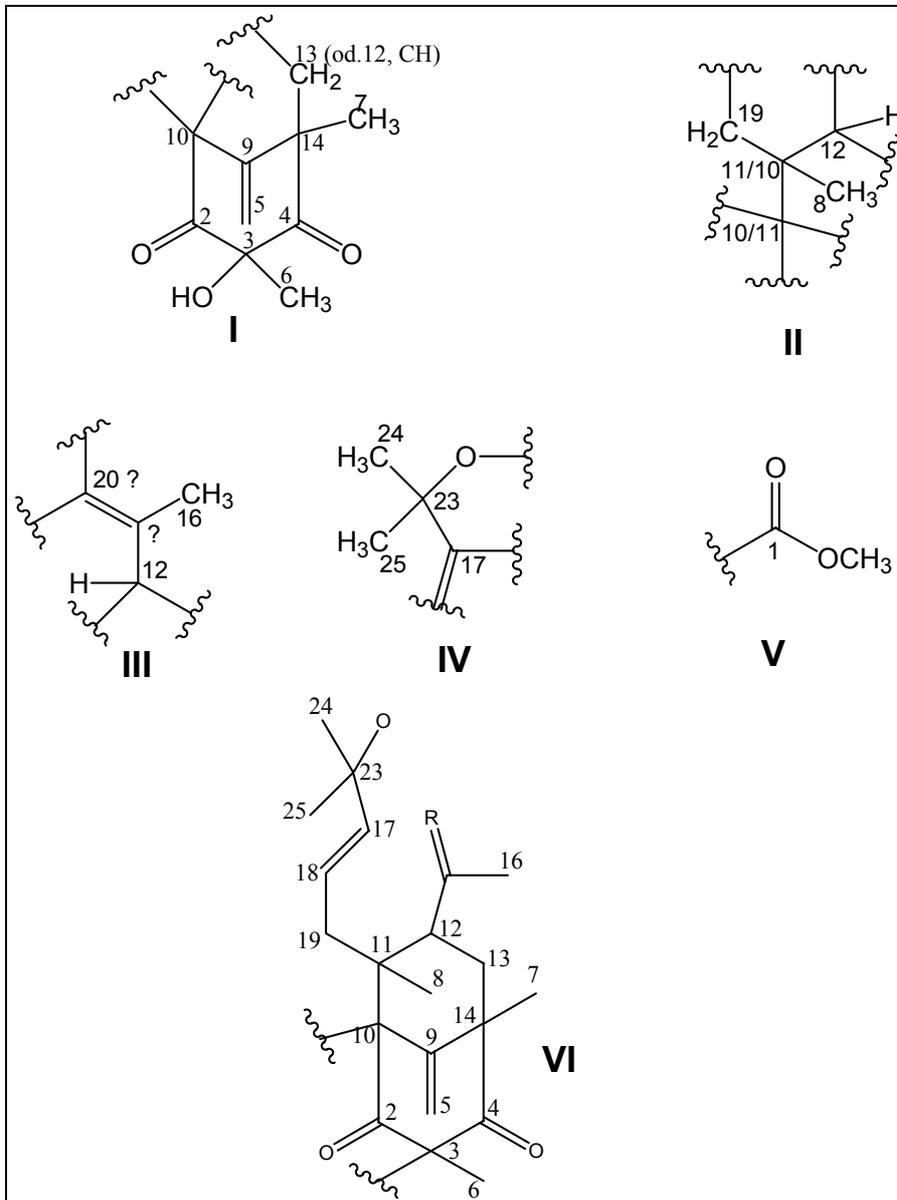
Eine der  $\text{CH}_2$ -Gruppen konnte auf Grund der chemischen Verschiebung schnell als eine Exomethylengruppe identifiziert werden. Bei dem verbliebenen Spinsystem handelte es sich um eine  $\text{CH-CH}_2$  Substruktur, die auch schon bei PAI 1-6 ausgemacht worden war.

Wie schon bei PAI 1-6 wurde die Strukturaufklärung mit Hilfe der HMBC-Daten vorangetrieben.

Auch bei PAI 1-8 wurde dabei mit den Methylprotonen begonnen. Dabei konnten insgesamt fünf Substrukturen abgeleitet werden (**Abb. E34**). Es zeigte sich, dass vier dieser Substrukturen (II, III, IV und V) schon in PAI 1-6 nachgewiesen werden konnten. Die NMR-Daten und HMBC Kopplungen stimmten mit denen überein, die bereits in PAI 1-6 beschrieben worden waren. Die in PAI 1-6 beschriebenen Substrukturen I und II konnten allerdings in PAI 1-8 nicht nachgewiesen werden. Hier musste sich PAI 1-8 vom bereits aufgeklärten PAI 1-6 unterscheiden.



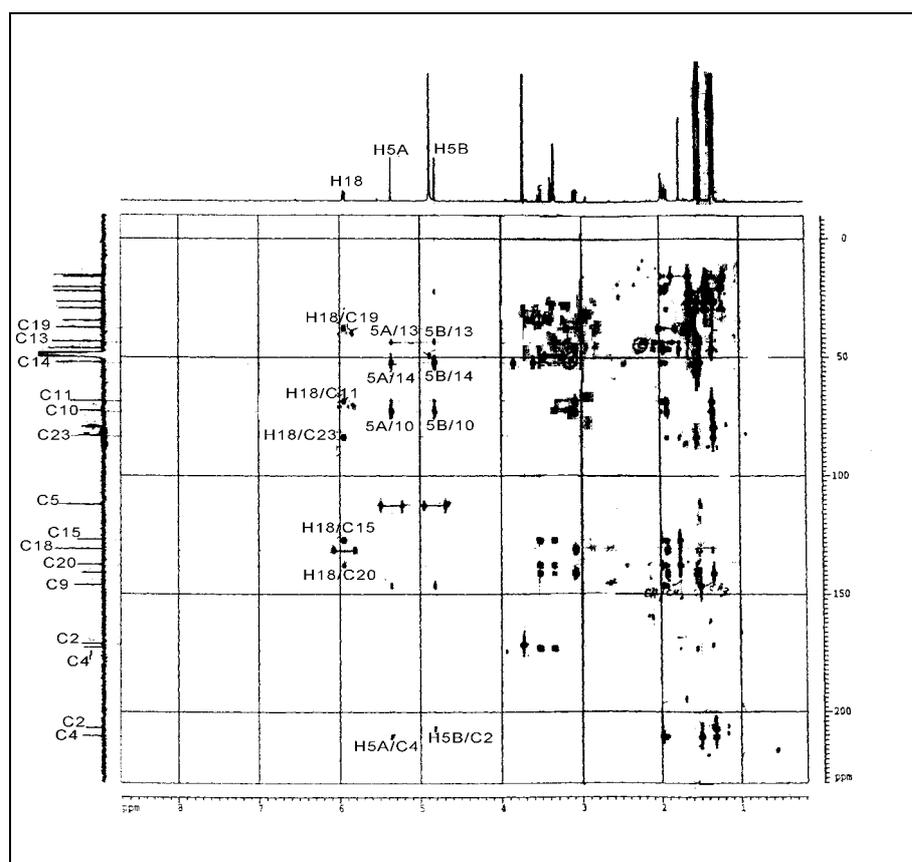
**Abb. E31:**  $^1\text{H}$  - COSY von PAI 1-8



**Abb. E34:** Substrukturen von PAI 1-8

Bei den Betrachtungen der HMBC-Kopplungen konnte in PAI 1-8 eine sich von PAI 1-6 unterscheidende Substruktur nachgewiesen werden. Die Kopplungen von H-7 zu C-13 und C-4 entsprachen denen in PAI 1-6, allerdings zeigte die chemische Verschiebung von C-4 an, dass in PAI 1-8 kein Ester vorlag, sondern eine Ketogruppe. Diese zeigte im HMBC eine Kopplung mit einer weiteren Methylgruppe (C-6). Neben C-4 koppelte diese Methylgruppe mit einer weiteren Ketogruppe, die an

C-2 ausgemacht werden konnte. Außerdem erschien H<sub>3</sub>-6 als Singulett, wodurch klar wurde, dass sie an einem quartären C-Atom sitzen musste, zu dem im HMBC-Spektrum auch eine Kopplung beobachtet werden konnte und somit C-3 zugeordnet wurde. Der verbleibende Substituent an C-3 konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden.



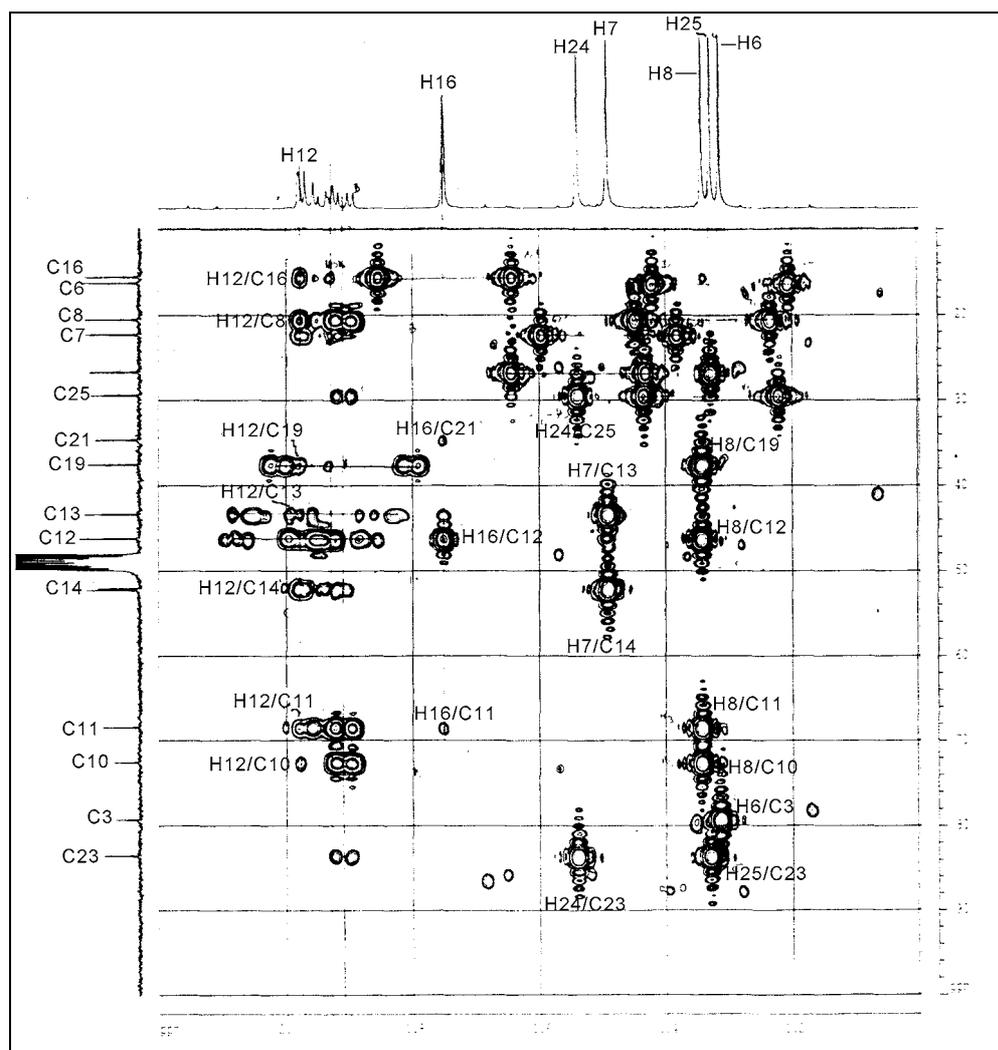
**Abb. E35:** HMBC-Spektrum von PAI 1-8

Kopplungen der bereits ausgemachten Exomethylengruppe (C-5) zu C-14 und C-9 zeigten die Nähe dieser Gruppe zur Methylgruppe an Position 7 an. Weitere Kopplungen von H-5<sub>A</sub> und H-5<sub>B</sub> zu C-10 sowie eine Fernkopplung von H-5<sub>A</sub> zu C-4, bzw. von H-5<sub>B</sub> zu C-2 zeigte den Ringschluss an, was zu Substruktur I führte.

Wie schon bei PAI 1-6 ließen sich die ermittelten Substrukturen durch weitere beobachtete HMBC-Strukturen zu einer zusammengesetzten Substruktur zusammenfügen (VI). Der Ringschluss von Ring B wird durch die HMBC-

Korrelationen von C-5 zu C-10 bzw. zu C-14 deutlich. Wie bereits bei PAI 1-6 wurde C-11 durch eine Korrelation von C-18 zu C-11 zugeordnet.

Wie bereits bei PAI 1-6 konnte der Ringschluss von Ring D durch HMBC-Korrelationen von C-21 zu C-22 und C-17 deutlich abgelesen werden. Die Kopplung von C-16 zu C-20 verdeutlicht den Ringschluss von Ring C.



**Abb. E36:** HMBC, Vergrößerung der Methylgruppenregion von PAI 1-8

Ein Vergleich mit den Daten von PAI 1-6 ergab, dass der detektierte Carbonsäuremethylester wieder an derselben Position zu finden war, wie schon in PAI 1-6.

Damit war klar, dass die Struktur in den Ringen B, C und D der von den Ringen C, D und E in PAI 1-6 entsprach. Im Falle von PAI 1-6 kam es zu einer Ringöffnung und Sauerstoffabspaltung. Es entstand ein neuer A-Ring, der zwei Ketogruppen trägt. Laut der Summenformel von PAI 1-8 fehlte im Molekül nun nur noch eine OH-

Gruppe, die nun leicht der Position C-3 zugeordnet werden konnte. Auch im Falle von PAI 1-8 lagen keine geeigneten Kristalle vor, was eine Röntgenstrukturanalyse zur Bestimmung der absoluten Konfiguration unmöglich machte.

## PAI 1-8 (22)

Beschreibung: schmutzig-weiße feste Substanz

Probencode: PAI 1-8

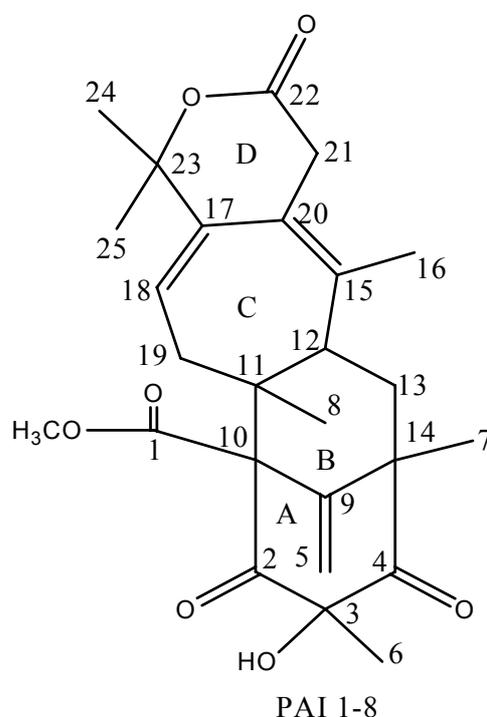
Substanzmenge: 14.2 mg

Summenformel:  $C_{26}H_{32}O_7$

Molekulargewicht: 456 g/mol

Quellorganismus: *Penicillium citreonigrum*

$[\alpha]_D^{20}$ : + 14° (c = 1.0 MeOH)



Retentionszeit: 22.9.0 min

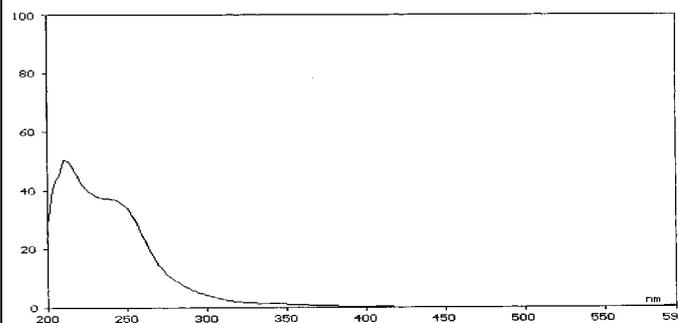
R<sub>f</sub>-wert: 0.76

Fluoreszenzlöschung (254nm): schwach

Eigenfluoreszenz 366 nm: -

+ Anisaldehyd: schwach gelb

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



(+) ESI-MS (*m/z*, rel. Int.): 935 [2M+Na]<sup>+</sup> (18), 913 [2M+H]<sup>+</sup> (40), 489 (100), 457 [M+H]<sup>+</sup> (60)

## Ergebnisse

Tab. E19:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und HMBC Daten von PAI 1-8. Die Messung erfolgte in  $\text{CD}_3\text{OD}$  bei 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), ein COSY wurde bei 300 MHz aufgenommen.

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}\delta$ (ppm)	HMBC (H-C)
1	171.3 (s)		
2	206.9 (s)		
3	79.3 (s)		
4	210.3 (s)		
5	112.3 (t)	5A 5.36 (d 0.5 Hz) 5B 4.80 (d 0.5 Hz)	5A: 4°, 5*, 9, 10, 11°, 13°, 14 5B: 2°, 5*, 10, 13°, 14
6	16.3 (q)	1.32 (s)	2, 3, 4, 6*
7	22.3 (q)	1.49 (s)	4, 5°, 7*, 9, 13, 14
8	20.5 (q)	1.34 (s)	8*, 10, 11, 12, 18°, 19
9	146.2 (s)		
10	72.6 (s)		
11	68.4 (s)		
12	46.2 (d)	1.96 (d 1.1 Hz)	8, 10, 11, 12*, 13, 14, 15, 16, 19
13	43.3 (t)	13 A + B: 1.85 - 1.95 m	7, 11, 12, 14, 16°, 19°
14	52.3 (s)		
15	127.1 (s)		
16	15.5 (q)	1.75 (s)	15, 16*, 17 (18), 20, 21°, 13, 11°, 23,
17	141.1 (s)		
18	131.0 (d)	5.94 (dd 8.0 Hz 5.0 Hz)	11, 15, 18*, 19, 20°, 23
19	37.5 (t)	19 A 3.07 (dd 8.2 Hz 14.1 Hz) 19 B: 1.90 - 1.94 m	19 A: 10, 11, 12, 17, 18, 19* 19 B: 8, 10, 11, 17, 18, 19*, 23°, 25°
20	137.6 (s)		
21	34.7 (t)	21 A 3.52(d 21.2 Hz) 21 B 3.40 (d 21.2 Hz)	21 A: 15, 17, 20, 22 21 B: 15, 17, 20, 22
22	172.8 (s)		
23	83.6 (s)		
24	26.7 (q)	1.54 (s)	17, 18°, 23, 24*, 25
25	29.4 (q)	1.33 (s)	17, 23, 24, 25*
1-OMe	52.1 (q)	3.73 (s)	1, 1-Ome*

### 3.2.5.14. Bioaktivität von PAI 1-8

PAI 1-8 verhielt sich in Bezug auf seine Aktivität in allen Testsystemen ähnlich wie auch PAI 1-6. Weder im antibiotischen Test, noch im Insektizidtest war eine

nennenswerte Aktivität zu beobachten. Auch der „*brine shrimp assay*“ fiel negativ aus. PAI 1-8 stellte damit eine ,in allen angewendeten Testsystemen, inaktive Substanz dar.

### **3.3. Vergleich schwamm-assoziiierter Pilze von verschiedenen Standorten**

Das Beispiel vom Pilz *Microsphaeropsis sp.*, aus dem wie bereits beschrieben neue Antrachinone und Betaenone isoliert wurden, nach einer Mutation aber die strukturell völlig unterschiedlichen *Microsphaerone* akkumulierte zeigt, welches Potential in Bezug die Synthese von Naturstoffen in Pilzen steckt. Es erschwert die Arbeiten aber auch, Stämme sind schwer zu vergleichen und können nur schwer, oder vielleicht sogar gar nicht auf Grund ihrer Inhaltsstoffe identifiziert werden, da das Inhaltstoffmuster so variabel ist.

Im Verlauf der Untersuchungen von schwamm-assoziierten Pilzen wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrmals Pilzstämme isoliert. Der Schwamm *Aplysina aerophoba* wurde an zwei unterschiedlichen Standorten (Banyuls-sur-Mer und Elba) gesammelt. Weitere Schwämme wurden auf den Philippinen oder in Indonesien (Bali Barat Nationalpark) gesammelt. Bei der Identifizierung der isolierten Pilze zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pilze *Cladosporium herbarum* und *Penicillium citreonigrum* noch zwei weitere Male isoliert werden konnten. Die beiden weiteren Stämme von *Cladosporium herbarum* stammten dabei aus *Aplysina aerophoba* (Elba, 1998) und dem Schwamm *Pseudoceratina purpurea* (Indonesien, 1996). Die zwei weiteren *Penicillium citreonigrum* Stämme stammten im Gegensatz zum untersuchten Stamm nicht aus *Callyspongia aerizusa* (Indonesien, 1996), sondern aus *Aplysina aerophoba* (Elba, 1999).

#### **3.3.1. Vergleich des Inhaltstoffmusters von *Cladosporium herbarum* verschiedener Standorte**

Neben dem bearbeiteten Pilz *Cladosporium herbarum*, der aus einem Schwamm der Art *Aplysina aerophoba* stammt, der 1996 in Banyuls-sur-Mer gesammelt wurde, wurden bislang zwei weitere Stämme als *Cladosporium herbarum* identifiziert. Es wurden auch weitere Stämme isoliert, die optisch *Cladosporium herbarum* sehr

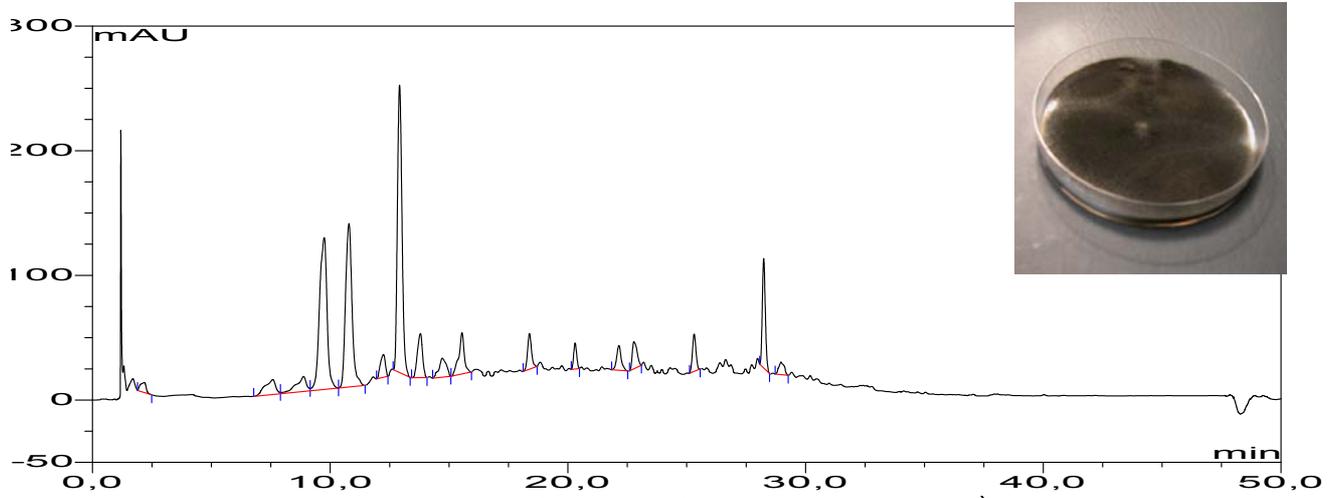
ähneln, doch bislang noch nicht zweifelsfrei identifiziert sind. Die beiden weiteren Stämme von *Cladosporium herbarum* stammen erneut aus *Aplysina aerophoba*, sowie aus dem Schwamm *Callyspongia aerizusa*. Dies ist ein erster Hinweis, dass *Cladosporium herbarum* nicht nur im terrestrischen Lebensraum weltweit verbreitet ist, auch seine marinen Stämme scheinen sehr weit verbreitet zu sein. Allerdings müssen erst weitere Nachweise erbracht werden, um zweifelsfreie Aussagen machen zu können.

Von allen drei *Cladosporium* Stämmen wurde eine kleine Standkultur (300 ml) unter denselben Bedingungen angelegt, die Pilzkultur wurde mit Ethylacetat extrahiert, der Rohextrakt wurde mittels HPLC und LC-MS untersucht.

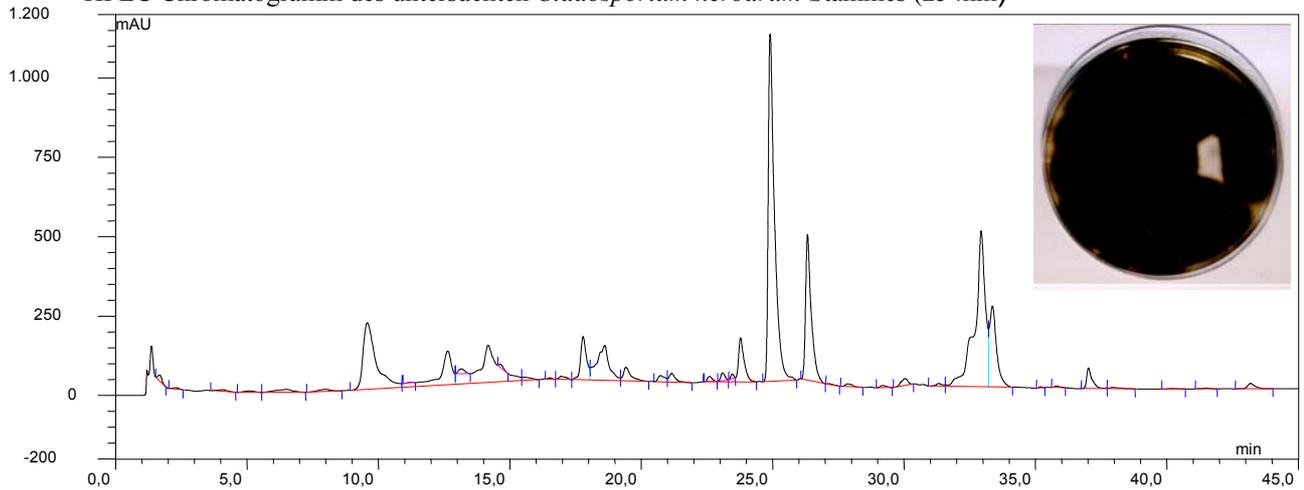
Bei einem Vergleich mit dem HPLC-Chromatogramm (Abb. E37) des bearbeiteten Pilzes *Cladosporium herbarum* war keine Übereinstimmung zu beobachten. Die aufgeklärten Verbindungen aus dem bearbeiteten *Cladosporium herbarum* Stamm konnten in den Extrakten der beiden anderen Pilzstämmen nicht nachgewiesen werden. Auch untereinander zeigten die Pilze in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe keine große Ähnlichkeit. Es bleibt zu klären, ob die Unterschiede im Inhaltstoffmuster aufgrund der verschiedenen Standorte oder durch genetische Unterschiede der einzelnen Stämme erklärt werden können.

Ergebnisse

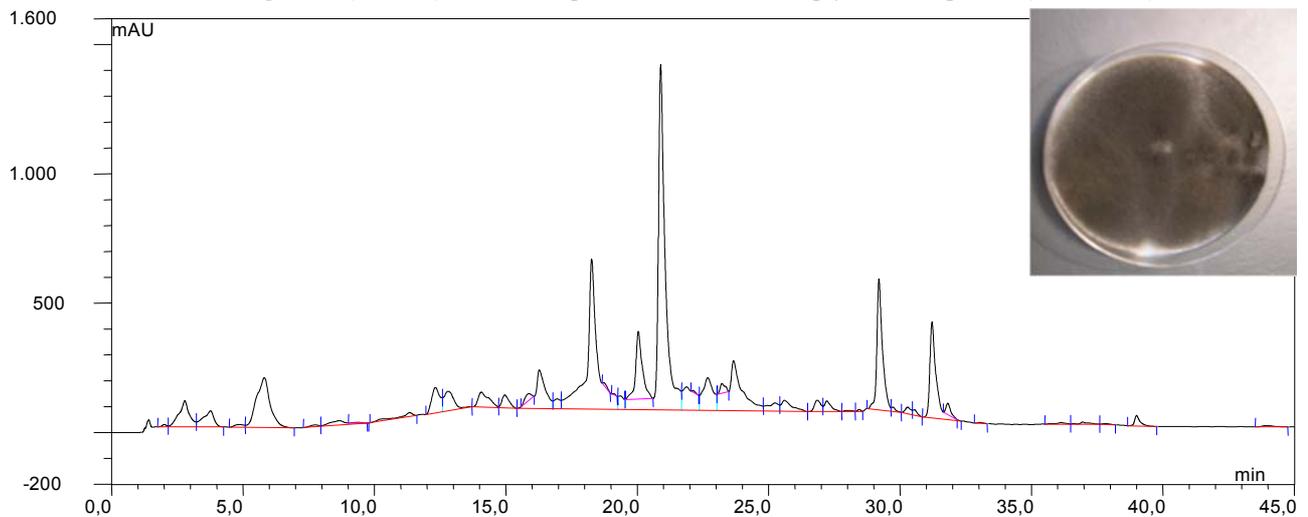
Abb. E37: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Stämme von *Cladosporium herbarum*



HPLC Chromatogramm des untersuchten *Cladosporium herbarum* Stammes (254nm)



HPLC Chromatogramm (254 nm) von *Cladosporium herbarum* aus *Aplysina aerophoba* (Elba, 1998)



HPLC Chromatogramm von *Cladosporium herbarum* (254 nm) aus *Callyspongia aerizusa* (Indonesien)

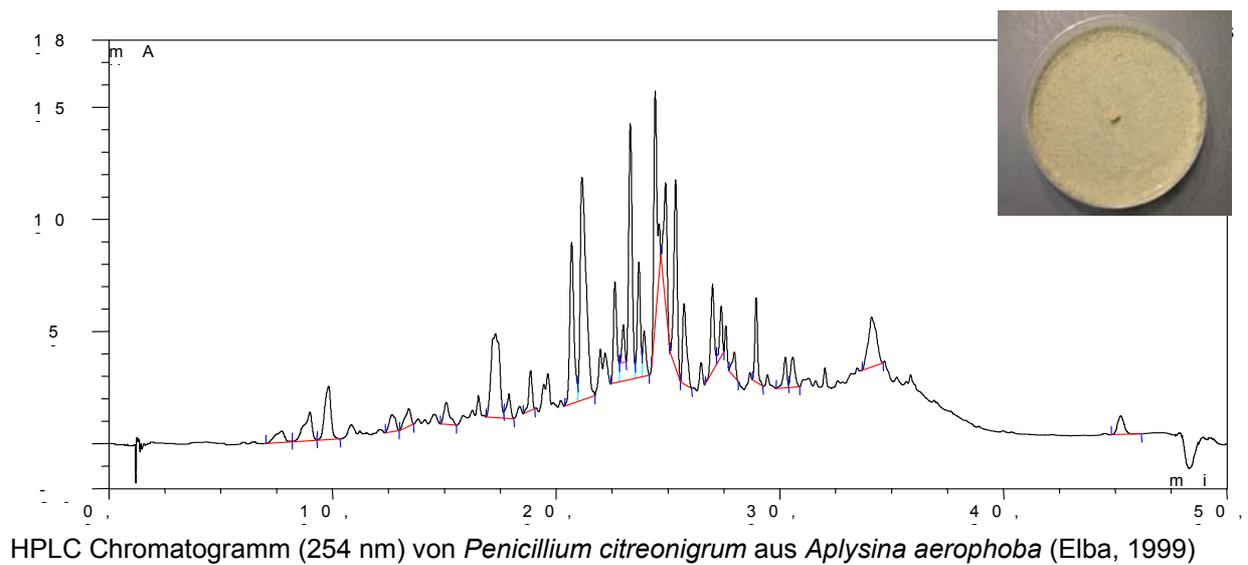
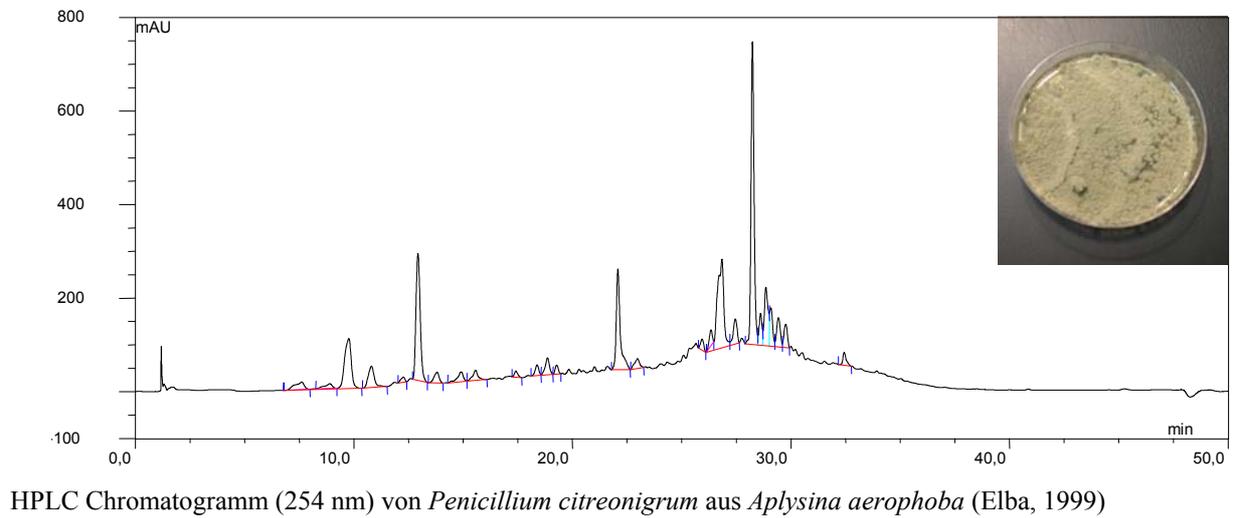
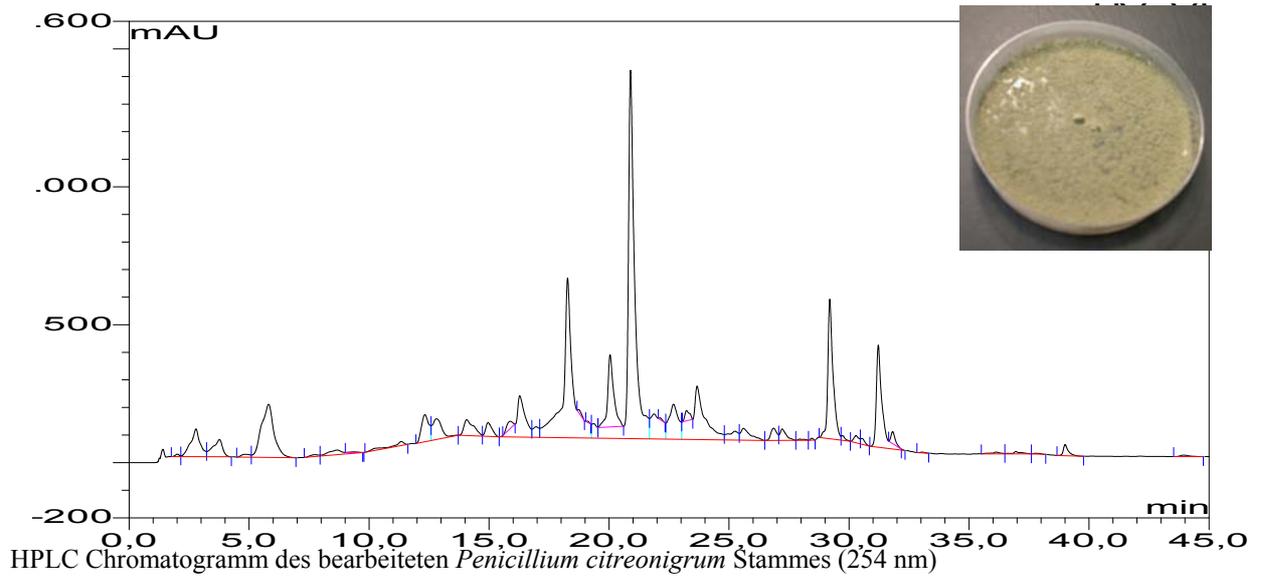
### 3.3.2 Vergleich der Inhaltstoffmuster von *Penicillium citreonigrum* von verschiedenen Standorten

Im Falle von *Penicillium citreonigrum* wurden bislang ebenfalls zwei weitere Stämme als *Penicillium citreonigrum* identifiziert. Diese konnten jedoch aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* gewonnen werden, der 1999 bei Elba gesammelt wurde, während der bearbeitete Pilzstamm aus Indonesien stammte. Auch *Penicillium citreonigrum* scheint also weiter verbreitet zu sein und immer wieder in Schwämmen vorzukommen. Aber auch hier müssen weitere Belege gesammelt werden; kann man eine Kontamination mit terrestrischen Stämmen von *Penicillium citreonigrum* bei den beschriebenen Arbeitsmethoden (siehe Material und Methoden) nicht vollkommen ausschließen. Eine ganze Reihe weitere Stämme, darunter auch solche aus philippinischen Schwämmen, stehen im Verdacht, ebenfalls ein Stamm von *Penicillium citreonigrum* zu sein. Aber hier steht eine Identifizierung noch aus.

Die HPLC-Chromatogramme (**Abb. E38**) der Rohextrakte zeigten, wie schon bei *Cladosporium herbarum*, keine große Übereinstimmung zueinander. Auch die beiden Stämme, die aus *Aplysina aerophoba* stammen, zeigten ein stark abweichendes Inhaltstoffmuster. Bestätigt wurde dieses Bild durch die aufgenommenen LC-MS-Spektren. Selbst wenn Peaks nahe beieinander lagen, waren die Molekulargewichte unterschiedlich. Abgesehen davon waren die UV-Spektren ebenfalls nicht zu vergleichen.

Die Versuchsergebnisse zeigen deutlich, dass es sich um drei Stämme mit grundlegend unterschiedlichen Sekundärstoffen handelt.

Abb. E38: HPLC-Chromatogramme der drei *Penicillium citreonigrum* Stämme



## 4. Diskussion

Nach den im Ergebnisteil präsentierten Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt werden konnten, sollen diese nun unter folgenden Aspekten diskutiert werden.

1. Stellen Schwämme eine günstige Quelle für marine Pilze dar, oder sollten besser andere Quellen gesucht werden?
2. Sind Pilze möglicherweise die eigentlichen Produzenten von Naturstoffen, die in den entsprechenden Quellorganismen gefunden wurden?
3. Wie sollte eine erfolgreiche Strategie aussehen, um neue aktive Naturstoffe zu finden?
4. Stellen Pilze marinen Ursprungs eine lohnende Quelle für neue Naturstoffe dar? Welche Art von Naturstoffen sind aus Pilzen marinen Ursprungs zu erwarten?
5. Erschwert die Diversität der Pilze im Hinblick auf die Produktion von Sekundärstoffen die Forschung an Pilzen marinen Ursprungs, oder ist sie eher eine Chance bei der Suche nach interessanten neuen Naturstoffen?

### 4.1. Sind Schwämme eine günstige Quelle für marine Pilze

Bereits in der Einleitung wurde erwähnt, dass die Biomasse von Schwämmen zu einem großen Teil aus Mikroorganismen besteht.

Schon der erste Versuch, Mikroorganismen aus dem sehr gut untersuchten Schwamm *Aplysina aerophoba* zu isolieren, verlief erfolgreich. Neben einigen Bakterienstämmen und Algen [Ebel, 1998] konnten auch einige Pilze isoliert werden.

Weitere Isolate wurden aus *Aplysina aerophoba* gewonnen sowie aus Schwämmen, die in Indonesien, auf den Philippinen oder in jüngster Zeit auch in China gesammelt wurden. Mittlerweile konnten so mehr als 150 Pilzstämme gewonnen werden. Einige Arten konnten dabei mehrfach detektiert werden, während andere Stämme bislang einmalig auftreten. Leider konnten bis heute noch nicht alle isolierten Stämme identifiziert werden, so dass noch keine Aussagen über die Häufigkeit, oder das Vorkommen einer Art in verschiedenen Schwämmen gemacht werden kann.

Bei der großen und vielfältigen Ausbeute an Pilzen aus Schwämmen ist es doch überraschend, dass es bislang nicht gelungen ist, Pilze durch elektronenmikroskopische Verfahren oder durch andere Untersuchungen im Schwammgewebe auszumachen, was für Bakterien und Algen bereits gelungen ist.

Trotz des fehlenden Nachweises von Pilzen im Schwammgewebe ist es äußerst unwahrscheinlich, dass es sich bei den isolierten Stämmen um Kontaminationen handelt. Wurde doch mit dem im Material und Methodenteil beschriebenen Isolationsverfahren eine Methode angewendet, die die Möglichkeit von Kontaminationen minimiert. Luftkeimplatten, die mehrmals während der Isolierung aufgestellt wurden, zeigten ebenfalls keinen Befall. Hinzu kommt, dass bei dem Verfahren, ein Schwammstück auf ein Nährmedium zu plazieren, mehrmals beobachtet werden konnte, wie Pilzhyphen aus dem Schwammstückchen zu wachsen begannen.

Wahrscheinlich ist davon auszugehen, dass im Zuge des Wasserstroms durch den Schwamm viele Pilzsporen oder kleine Zellverbände in den Schwamm gelangen, die dann isoliert werden können. Leider lässt sich bislang nicht beantworten, ob diese Pilze längere Zeit im Schwamm überleben. Auch die Frage von Pilzen als Symbionten oder Kommensalen von Schwämmen lässt sich mit den bisherigen Wissensstand weder widerlegen noch beweisen. Auch lässt sich beim bisherigen Kenntnisstand nicht völlig ausschließen, dass Pilze isoliert wurden, die aus einem terrestrischen Habitat ins Meer gelangten. Um die angesprochenen Fragen beantworten zu können, muss noch viel mehr über Pilze aus marinen Habitaten gelernt werden.

Trotz dieser offenen und auch gerade wegen dieser offenen Fragen, die im übrigen auch bei Pilzen aus anderen marinen Quelle auftreten und der Problematik, die damit einhergeht, sind Schwämme sicher als lohnende Quelle für marine Pilze zu betrachten und stellen ein interessantes Forschungsobjekt für die Zukunft dar. Die

Vielfalt der bereits isolierten Stämme macht deutlich, dass die Diversität größer ist, als z.B. von Bodenproben. Auch zeigen die bislang untersuchten Pilze eine erstaunliche Vielfalt an Sekundärstoffen, was das Interesse an ihnen noch ansteigen lässt.

#### **4.2. Sind Pilze die Produzenten oder Mitproduzenten von Naturstoffen aus Schwämmen?**

Als die ersten Pilze aus dem Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba* isoliert wurden, stellte sich schon bald die Frage, ob die Pilze vielleicht einen Anteil an der aus *Aplysina aerophoba* schon bekannten bromierten Substanzen haben könnten. Von einigen marinen Naturstoffen war bereits bekannt, dass sie von assoziierten Bakterien oder Algen produziert wurden und nicht vom Organismus, aus dem sie letztendlich zuerst isoliert wurden. Dazu gehören unter anderem die bereits genannte Okadainsäure oder das Tetrodotoxin. Bei den bislang untersuchten Pilzen aus *Aplysina aerophoba* konnte zwar eine Reihe von Naturstoffen gefunden werden, darunter einige neue, doch weder in *Microsphaeropsis* sp., *Cladosporium herbarum*, *Hortaea werneckii*, noch in *Phomopsis* sp. konnten Substanzen oder Vorstufen nachgewiesen werden, die aus *Aplysina aerophoba* oder nahe verwandten Arten bekannt sind. Dasselbe gilt für die isolierten Naturstoffe aus *Penicillium citreonigrum*, der aus dem indonesischen Schwamm *Pseudoceratina purpurea* stammte.

Neben den in dieser Arbeit auf ihre Inhaltsstoffe hin untersuchten Pilzstämmen aus *Aplysina aerophoba* wurden weitere Pilzstämmen per LC-MS auf mögliche Naturstoffe, die aus diesem Schwamm bereits bekannt waren, untersucht. Aber auch hier konnten keine Kulturen ausgemacht werden, die womöglich Naturstoffe produzieren, die in *Aplysina aerophoba* oder verwandten Arten ausgemacht worden waren.

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist die Frage nach der Produktion von Schwamm-inhaltstoffen aus *Aplysina aerophoba* durch Pilze aus diesem Schwamm klar zu verneinen. Dasselbe gilt für den untersuchten Pilzstamm aus dem Schwamm *Pseudoceratina purpurea*.

Ausgeschlossen werden kann eine Rolle der schwamm-assoziierten Pilze bei der Synthese von aus Schwämmen bekannten Naturstoffe damit auch noch nicht. Möglicherweise ist es bislang aufgrund des mangelnden Wissens über Pilze aus dem marinen Habitat noch nicht gelungen, diese zu isolieren, oder die geeigneten Bedingungen zu finden, unter denen die entsprechenden Naturstoffe produziert werden. Auch hier bietet sich also noch viel Raum für weitere Forschungsprojekte.

### **4.3. Strategie bei der Suche nach neuen Naturstoffen**

Bei Beginn der Arbeiten mit marinen Pilzen [Brauers, 1998], stand zunächst die Frage im Vordergrund, ob in den Pilzisolaten interessante Sekundärstoffe nachgewiesen werden konnten und somit eine weitere lohnende Quelle für Naturstoffe gefunden war und ob es sich bei diesen um Naturstoffe handelte, die bereits aus den entsprechenden Schwämmen bekannt waren. Unter diesem Gesichtspunkten wurden nach Sichtung am AWI in Bremen Stämme ausgewählt, die mit großer Wahrscheinlichkeit obligat marinen Ursprungs waren, ein gutes Wachstum in der Kultur zeigten und die eine Produktion von Sekundärstoffen versprochen.

Im Verlauf der Arbeiten nahm die Anzahl der Pilzstämme aus verschiedenen Schwämmen immer mehr zu, was die Auswahl eines geeigneten Stammes ohne weitere Informationen immer mehr erschwerte. Um das Risiko zu minimieren, bereits untersuchte Stämme zu wählen, oder noch wichtiger, um zu vermeiden bereits bekannte Strukturen zu isolieren, wurden Testsysteme entwickelt, die geeignete Stämme herausfiltern sollten.

Fortan wurde von marinen Stämmen zunächst eine 300 ml Standkultur angelegt. Diese wurde extrahiert und mittels HPLC und LC-MS auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Parallel wurde mit den Extrakten einige Biotest durchgeführt. Als Basis wurde der „*brine shrimp assay*“ und der beschriebene Insektizidtest angewandt, wobei die Ergebnisse des „*brine shrimp assay*“ niedriger zu bewerten waren als die Ergebnisse des Insektizidtestes an *Spodoptera littoralis*, da der „*brine shrimp assay*“ relativ unspezifische Ergebnisse zur zytotoxischen Aktivität liefert. Hinzu kam die Untersuchung auf antibiotische Aktivität gegenüber einigen Bakterienstämmen (siehe Material und Methoden) sowie gegen den humanpathogenen Pilz *Candida albicans*.

Aufgrund der Screeningergebnisse und nach Vergleich der LC-MS und HPLC-Daten mit Datenbanken konnten Pilzstämmen gezielt ausgemacht werden, die aktive und bis dato unbekannte Naturstoffe produzierten.

Das beschriebene Verfahren erhöhte die Chance, neue aktive Naturstoffe zu isolieren, und verhindert, Zeit zu verlieren, indem bekannte Substanzen isoliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kam dieses Verfahren noch nicht zum Einsatz, da die entsprechenden Testsysteme und Geräte zum Teil noch nicht zur Verfügung standen. Außerdem war die Anzahl der isolierten Pilzstämmen zu diesem Zeitpunkt noch übersichtlich und das Augenmerk auf neue Naturstoffe gerichtet. Erst mit der großen Fülle an verschiedenen Stämmen wurde es möglich, gezielt nach aktiven neuen Naturstoffen zu suchen.

#### **4.4. Sind marine Pilze eine lohnende Quelle neuer Naturstoffe? Welche Typen von Naturstoffen sind in marinen Pilzen zu erwarten?**

Um die Frage zu beantworten, welche Bedeutung Pilze marinen Ursprungs als Quelle für neue Naturstoffe darstellen und um zu untersuchen, welche Qualität diese Naturstoffe haben, sollen zunächst die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Naturstoffe besprochen werden.

Aus den Standkulturen der untersuchten fünf Pilzstämmen konnten insgesamt zwanzig Verbindungen identifiziert werden. Elf davon stellten sich als neue Naturstoffe heraus, neun waren bereits beschrieben worden. Weitere Verbindungen wurden isoliert, konnten aber strukturell nicht aufgeklärt werden. Darunter waren auch weitere Verbindungen, die im Verdacht standen, neue Naturstoffe zu sein. Die aufgeklärten Naturstoffe zeigten eine große Strukturvielfalt. Neben Anthrachinonen,  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Pyronen wurde eine chlorierte Verbindung isoliert sowie mit PAI 1-6 und PAI1-8 zwei Meroterpenoide.

Die Trennung der isolierten Verbindungen erfolgte in aller Regel über verschiedene flüssigkeitschromatographische Methoden. Die isolierten Verbindungen konnten mit Hilfe der HPLC ausnahmslos in den Rohextrakten nachgewiesen werden. Es handelte sich bei den isolierten Naturstoffen also nicht um Artefakte, die erst während der Aufarbeitung entstanden. Eine Untersuchung des unbeimpften

Mediums zeigte auch, dass die Substanzen nicht aus dem Medium stammen konnten.

#### 4.4.1. Anthrachinone und Betaenonderivate aus *Microsphaeropsis* sp.

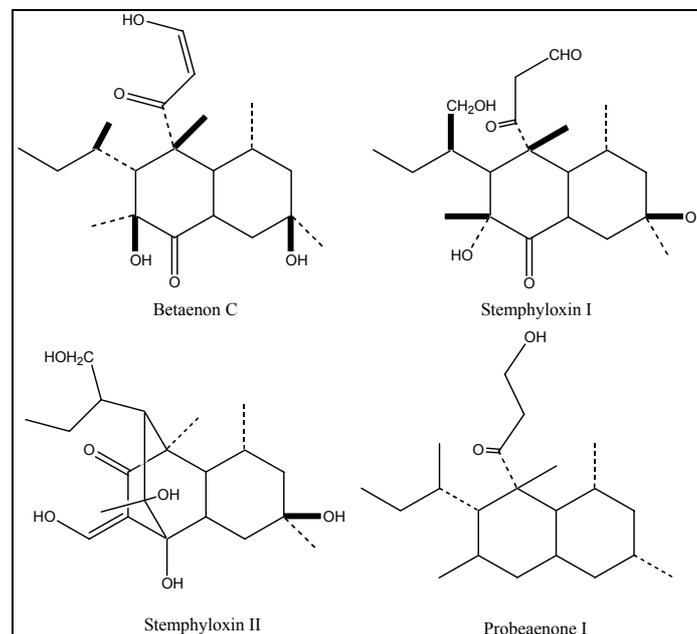
Aus dem Extrakt der *Microsphaeropsis* sp.-Kultur wurde eine Reihe von verschiedenen Naturstoffen isoliert. Sechs Verbindungen konnten aufgeklärt werden. Dabei handelte es sich um vier 1,3,6,8-Tetrahydroxyanthrachinone und zwei Betaenonderivate.

Anthrachinone (5, 6, 7, 8): Bei drei der aus *Microsphaeropsis* sp. isolierten Anthrachinonen (5, 6, 7) handelt es sich um neue Naturstoffe. Sie weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit zum 1-Acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxyanthraquinon auf. Mit Rheoemodin (8) wurde ein Anthrachinon isoliert, das bereits 1980 aus *Aspergillus versicolor* beschrieben worden war [Berger, 1980]. Anthrachinone sind als sekundäre Inhaltsstoffe weit verbreitet. Neben Mikroorganismen werden sie auch in vielen Pflanzen, Echinodermen und Insekten gefunden [Thomson, 1997]. Zusätzlich zu den Anthrachinonen konnten auch einige Bianthrone aus Pilzen nachgewiesen werden, so z.B. aus dem Pilz *Curvulatia lunata* [Jadulco *et al.*, 2001]. Für den Pilz *Microsphaeropsis* sp. ist es das erste mal, dass Anthrachinone nachgewiesen wurden, wie eine Literatursuche im Dictionary of Natural Products [Chapman and Hall, 2003] zeigte. Bislang wurden aus der Gattung *Microsphaeropsis* 22 Verbindungen beschrieben [Chapman and Hall, 2003]. Darunter sind eine ganze Reihe von Makrozyklen, die als Macrosphelide (A-K) bezeichnet werden, sowie Fettsäuren und Oligothiadiketopiperazine [Takamatsu *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 1996; Funabashi *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1996].

Anthrachinone zeigen eine Fülle an unterschiedlichen Aktivitäten, darunter purgative und laxierende Eigenschaften, aber auch Anthrachinone mit cytotoxischen und anti-cancerogenen Wirkungen wurden beschrieben [Solis *et al.*, 1995; El-Gammal *et al.*, 1995].

Biotests der isolierten Anthrachinone, die bereits während der Diplomarbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass die isolierten Anthrachinone einige Proteinkinasen inhibierten [Brauers, 1998].

**Betaenone:** Bei den beiden aus dem Pilz *Microsphaeropsis* sp. isolierten Betaenonderivaten handelte es sich um neue Naturstoffe. Betaenone wurden erstmals aus dem Pilz *Phoma betae* isoliert [Ichihara *et al.*, 1983]. Inzwischen wurden sechs Betaenone (A-F) isoliert [Ichihara *et al.*, 1983]. Untersuchungen zeigten, dass es sich bei den Betaenonen um Phytotoxine handelte. Der Pilz *Phoma betae* ist dafür bekannt eine Blattfleckenkrankheit bei Pflanzen auszulösen. Als am stärksten aktiv stellte sich das Betaenon C heraus (**Abb. D1**) [Ichihara *et al.*, 1983]. Strukturell verwandte Verbindungen, die Stemphyloxine I und II (**Abb. D1**), konnten aus dem Pilz *Stemphylium botryosum* isoliert werden (Barash *et al.*, 1982), der ebenfalls eine Blattfleckenkrankheit hervorruft. Weitere Untersuchungen zur phytotoxischen Aktivität zeigten, dass der  $\beta$ -Ketoaldehyd-Bestandteil der Betaenone und des Stemphyloxins I essentiell für die phytotoxische Wirkung ist [Manulis *et al.*, 1986].



**Abb.D1:** Betaenon C, die Stemphyloxine I und II und die Betaenonvorstufe Probetaenon I

Biosynthetisch werden die Betaenone über den Polyketidweg und nicht über den Isoprenoidstoffwechsel synthetisiert wie man bei den Strukturen vielleicht vermuten würde, wobei Probetaenon I (**Abb. D1**) eine Vorstufe darstellt [Miki *et al.*, 1989;

Oikawa *et al.*, 1984]. Auch zeigte sich, dass bei der Biosynthese der Betaenone eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion eine Schlüsselrolle spielt [Oikawa *et al.*, 1988]. Auch eine Totalsynthese von Betaenone C ist inzwischen beschrieben worden [Ichihara *et al.*, 1989].

Pilze der Gattung *Microsphaeropsis* wurden bislang nicht als Verursacher von Blattfleckenkrankheiten beschrieben worden. Untersuchungen zur Bioaktivität des isolierten 10-Hydroxy-18-O-Methylbetaenones sowie des 10-Hydroxy-18-N-2-naphtyl-N-phenylaminobetaenons zeigten, dass sie einige Proteinkinasen inhibierten [Brauers *et al.*, 2000]. Die phytotoxische Aktivität konnte nicht untersucht werden, da das in der Literatur beschriebene Testsystem nicht zur Verfügung stand. Laut den bereits bekannten Struktur-Wirkungsbeziehungen [Manulis *et al.*, 1986] sollten beide isolierten Betaenonderivate jedoch eine phytotoxische Aktivität zeigen, weisen sie doch beide die  $\beta$ -Ketoaldehydgruppe auf.

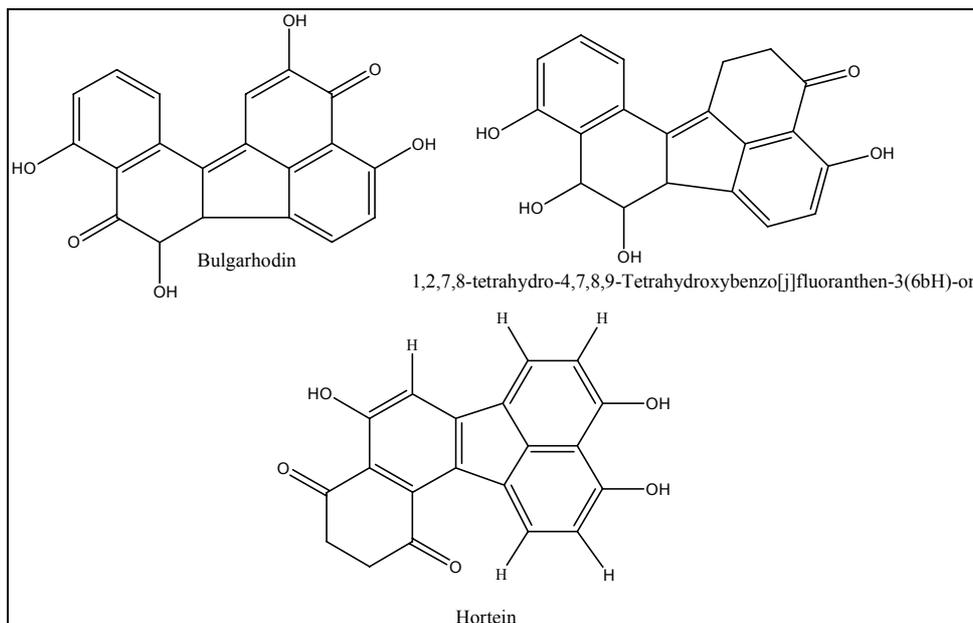
Interessant ist, dass mit den beiden isolierten Betaenonen zwar strukturell verwandte Strukturen nachgewiesen wurden, diese aber aus einem ganz anderen Pilz stammen. Auch wies das 10-Hydroxy-18-N-2-naphtyl-N-phenylaminobetaenon mit dem N-Phenyl-2-naphtylamin einen ungewöhnlichen Substituenten auf. Dieser war aber zweifelsfrei nativen Ursprungs, wie durch Untersuchungen bereits im Rahmen der Diplomarbeit gezeigt werden konnte.

#### **4.4.2 Hortein aus *Hortaea werneckii***

Aus dem Pilz *Hortaea werneckii* konnte lediglich eine Verbindung isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Aufgrund des langsamen Wachstums und der geringen Biomasseproduktion im Vergleich zu den anderen bearbeiteten Pilzen konnte von weiteren Verbindungen nicht genügend Substanzmenge für eine Strukturaufklärung isoliert werden. *Hortaea werneckii* wurde bislang weniger auf seine Inhaltstoffe hin untersucht, sondern vielmehr in Hinsicht auf seine Eigenschaft tinea nigra beim Menschen auslösen zu können [Uijthof *et al.*, 1994]. Neben pathogenen Stämmen wurden auch nichtpathogene Stämme beschrieben [Uijthof *et al.*, 1994]. Untersuchungen zeigten auch, dass *Hortaea werneckii* auch bei hohen Salzkonzentrationen noch wachsen kann [De Hoog und van den Ende, 1992]. Auf Sekundärstoffe hin wurde *Hortaea werneckii* bislang kaum untersucht. Lediglich

Peptidogalctomannane und Peptidophosphogalctomannane wurden bislang beschrieben [Loyd, 1970].

Hortein: Mit dem Hortein wurde eine Verbindung isoliert, bei der es sich nicht nur um einen neuen Naturstoff handelte, vielmehr lag eine Verbindung vor, deren Acenaphto- [1', 2': 7,8]-naphtalen-Baustein bei Naturstoffen nur selten vorkommt. So sind strukturell verwandte Verbindungen unter den Naturstoffen kaum zu finden [Chapman and Hall, 2003]. Unter den bereits bekannten Naturstoffen weisen lediglich Bulgarhodin und 1,2,7,8-Tetrahydro-4,7,8,9-tetrahydroxybenzo[j]fluoranthren-3(6bH)-on (**Abb. D2**) eine strukturelle Verwandtschaft zum Hortein auf. Unter den vom Menschen synthetisierten Substanzen kommt das acenaphto [1', 2':7,8]napht[1,2-b]oxiren der Struktur des Hortein nahe.



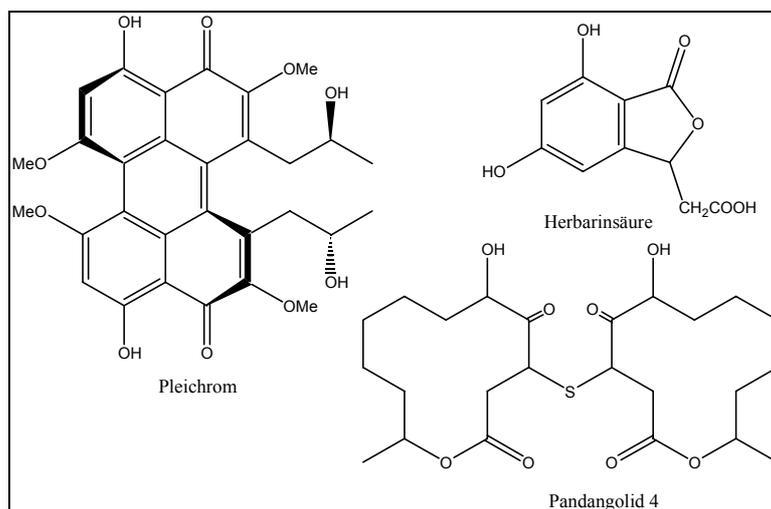
**Abb. D2:** strukturell ähnliche Naturstoffe zum Hortein

Hortein stellt somit ein gutes Beispiel zur biogenetischen Potenz von Pilzen dar, was die Synthese von neuen Naturstoffen angeht, mit Strukturelementen, die bislang in der Form noch nicht bekannt waren, und zeigt, dass neben neuen Naturstoffen, deren Grundstrukturen aber schon bekannt waren, durchaus noch mit einigen bislang nicht bekannten Strukturelementen gerechnet werden kann.

Auch als aktiver Naturstoff birgt Hortein einiges an Potential, wie Biotests zeigten. Zwar war weder im Insektizidtest noch im Antibiotikatest eine nennenswerte Aktivität zu beobachten, auch im „*brine shrimp assay*“ war die Aktivität nur moderat, doch bei Tests gegenüber verschiedenen Enzymen war durchaus eine Aktivität zu beobachten (siehe Ergebnisteil). Im Falle des Horteins wäre es von Nutzen, weitere Strukturen zu finden, die dem Hortein ähnlich sind, auch bleibt der Syntheseweg noch offen, über den bislang nur spekuliert werden kann.

#### 4.4.3. Inhaltsstoffe aus *Cladosporium herbarum*

Pilze der Gattung *Cladosporium* sind sehr weit verbreitet, sie können weltweit in der Luft nachgewiesen werden. Im Dictionary of Natural Products lassen sich für die Gattung *Cladosporium* 56 Naturstoffe finden [Chapman and Hall, 2003]. Aus Pilzen der Gattung *Cladosporium* sind bisher u.a. Cladospolide, Isocumarine (Cladosporin, Isocladosporin), Cotylenine, Mycosporine und einige einfache Alkohole (2-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-propanol, 3-Methyl-1-butanol) bekannt [Fujii *et al.*, 1995; Jacyno *et al.*, 1993; Hirota *et al.*, 1980; Kobayashi *et al.*, 1989; Pittet *et al.*, 1983]. Aus *Cladosporium herbarum* sind bereits Herbarinsäure, Padangolide und Pleichrom (Abb. D3) bekannt.



**Abb. D3:** Einige bereits aus *Cladosporium herbarum* beschriebene Naturstoffe

Citreoviridin: Citreoviridin wurde bereits 1940 in *Penicillium toxicarium* gefunden. Die Struktur konnte aber erst 1964 aufgeklärt werden [Sakabe *et al.*, 1964]. Mit den Citreoviridinen B – F [Franck und Gehrken, 1980] sowie Citreoviridinol und

Citreopyron [Niwa *et al.*, 1981] konnten weitere sehr ähnliche Naturstoffe isoliert werden. Bei Citreoviridin handelt es sich um ein  $\alpha$ - Pyron, das auch aus *Penicillium citreoviride*, *P. pulvillorum* sowie einigen anderen *Penicillium* Arten isoliert werden konnte. Citreoviridin wird zu den polyenen Pyronen gezählt und ist strukturell neben den bereits erwähnten Substanzen auch mit Aurovertin, Asteltoxin, Citreomontanin und Asteltoxin verwandt.

Interessanterweise wurden auch einige Pyrone aus marinen Schnecken beschrieben, die strukturelle Ähnlichkeit zum Citreoviridin aufweisen [Cimino *et al.*, 1987]. Von einigen Pyronen aus Schnecken weiß man bereits, dass die Tiere sie über die Nahrung aufnehmen und zum Teil abwandeln, andere können sie scheinbar aber auch selbst synthetisieren.

Citreoviridin ist ein starkes neurotoxisches Mycotoxin, das die ATP Synthese hemmt [Linett *et al.*, 1978]. Die Toxizität von Citreoviridin ist vergleichbar mit der von Aflatoxinen. In den selbst durchgeführten Tests zeigte Citreoviridin keine nennenswerte Aktivität im Antibiotikatest. Auch im „*brine shrimp assay*“ zeigte sich keine Aktivität, das Wachstum der Raupen von *Spodoptera littoralis* konnte aber sehr deutlich gehemmt werden.

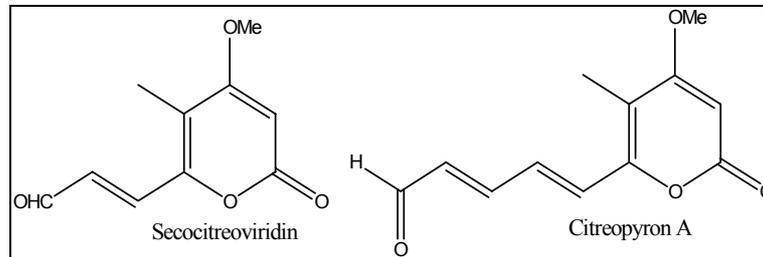
Biosynthetisch wird Citreoviridin auf dem Polyketidweg durch eine Acetateinheit und acht Malonat Einheiten hergestellt. Das so entstandene Grundgerüst wird dann an fünf Positionen durch Methionin methyliert [Steyn *et al.*, 1982]. Auch die Totalsynthese von Citreoviridin ist bereits gelungen [Nishiyama *et al.*, 1985].

Herbarin A + Herbarin B: Die beiden isolierten Herbarine sind strukturell sehr nahe mit dem Citreoviridin verwandt. Möglicherweise stellen sie ein Abbauprodukt des Citreoviridins durch eine catabolische Oxidation dar, wie sie für das Secocitreoviridin (**Abb. D4**), das aus *Penicillium citreo-viride* isoliert wurde, angenommen wird [Niwa *et al.*, 1981].

Als Vorstufe zum Citreoviridin sind sie mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zu sehen, da sie nicht mit dem publizierten Biosyntheseweg für Citreoviridin in Einklang zu bringen sind [Steyn *et al.*, 1982] und es unwahrscheinlich ist, dass im Falle von *Cladosporium herbarum* ein völlig neuer Syntheseweg eingeschlagen wird.

Neben dem Citroviridin sind die aus *Cladosporium herbarum* isolierten Herbarine strukturell sehr nahe mit den Citreopyronen verwandt. Besonders das Citreopyron A

(Abb. D4) [Kosemura *et al.*, 1997] ist fast identisch mit Herbarin A, das lediglich eine Säurefunktion anstelle der Aldehydfunktion von Citreopyron A trägt.



**Abb. D4:** Verwandte Naturstoffe der Harbarine A und B

Als Partialstrukturen lassen sich Strukturelemente, die denen von Herbarin A und B ähnlich sind in vielen Naturstoffen finden, was nicht weiter verwunderlich ist, da sich Pyronbausteine in vielen Verbindungen wiederfinden lassen.

Im Biotest erwiesen sich Herbarin A und B als aktive Verbindungen im „*brine shrimp assay*“, gegenüber *Spodoptera littoralis* war dagegen keine Aktivität zu beobachten. Damit verhalten sie sich deutlich anders als das Citreoviridin. Scheinbar spielt der Tetrahydrofuranring, der sich in Citreoviridin findet, eine wichtige Rolle bei der Aktivität der Citreovirdins.

Microsphaerone A + B: neben den beschriebenen  $\alpha$ -Pyrone Citreoviridin, Herbarin A und Herbarin B konnten aus *Cladosporium herbarum* zwei  $\gamma$ -Pyrone isoliert werden.  $\gamma$  - Pyrone waren bislang schon aus einigen terrestrischen Pilzisolaten beschrieben worden, z.B das Rapicon aus *Ramichloridium apiculatum* [Nozawa *et al.*, 1992], das Isofunicon aus *Penicillium sp.* [Kimura *et al.*, 1995] oder das Vermistatin aus *P. verruculosum* [Murtaza *et al.*, 1997].

Die Biosynthese der genannten  $\gamma$  - Pyrone ist bis heute noch nicht zweifelsfrei geklärt, auch wenn schon lange der Polyketidweg angenommen wird [Merlini *et al.*, 1970].

Erstmals wurden die Microsphaerone A + B aus dem Pilz *Microspheropsis sp.* isoliert und publiziert [Wang *et al.*, 2001]. Bei dem untersuchten Stamm handelte es sich um denselben, aus dem schon zuvor im Rahmen dieser Arbeit die beschriebenen Anthrachinone und Betaenonderivate isoliert worden waren. Der Stamm hatte

zwischenzeitlich eine Mutation durchgemacht und produzierte nun ein ganz neues Spektrum an Naturstoffen. Dies ist für Mikroorganismen kein ungewöhnlicher Fall, auch andere Naturstoffe wurden schon aus Pilzstämmen isoliert, die bereits untersucht waren und nach einer Mutation neue Substanzen bildeten, z.B. das Desoxyfunicon aus *Penicillium* sp. [Sassa *et al.*, 1991].

Für *Cladosporium herbarum* ist es das erste Mal, dass ein  $\gamma$ -Pyron beschrieben wurde. Interessant ist auch, dass bei *Cladosporium herbarum* sowohl  $\gamma$ - als auch  $\alpha$ -Pyrone nebeneinander produziert werden.

Im Test gegenüber *Artemia salina* und *Spodoptera littoralis* war keine nennenswerte Aktivität zu beobachten. Damit wurden die bereits von Wang publizierten Ergebnisse nochmals bestätigt. Diese Ergebnisse sind auch ein erstes Indiz dafür, dass bei Pyronen, die Citroviriden oder den Microsphaeren gleichen, die  $\alpha$ -Pyrone aktiver als die  $\gamma$ -Pyrone sind. Um aber wirklich aussagekräftige Informationen hinsichtlich dieser Vermutung zu bekommen, müssen weitere strukturell verwandte Substanzen untersucht werden

#### **4.4.4. Ascochlorin aus *Phomopsis* sp.**

Es wurden bereits einige Pilze der Gattung *Phomopsis* untersucht. Im Dictionary of Natural Products [Chapmann and Hall, 2003] werden 167 Substanzen für die Gattung *Phomopsis* angegeben. Die meisten Arten der Gattung *Phomopsis* sind nicht humanpathogen, es finden sich aber einige Arten, die als Pflanzenschädlinge auftreten.

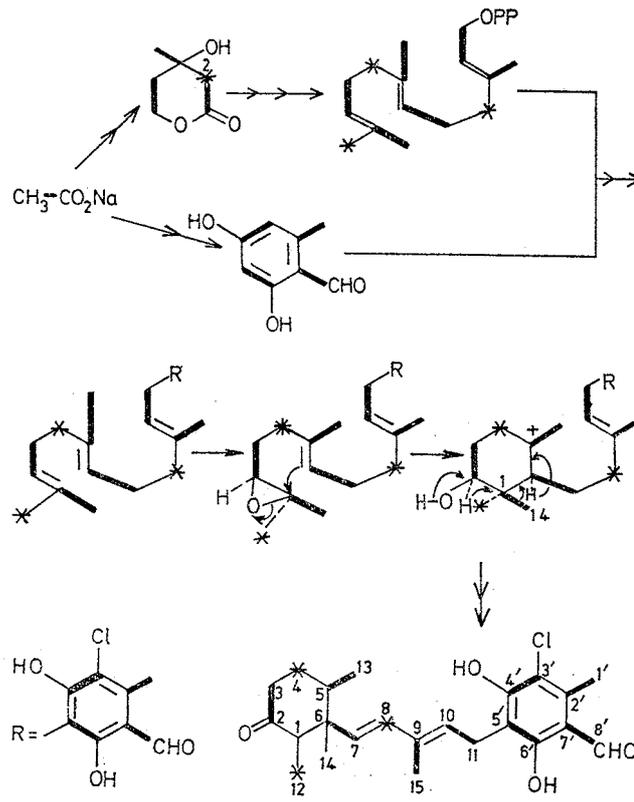
Ascochlorin: Ascochlorin wurde erstmals 1969 aus einem Pilz der Gattung *Fusarium* isoliert [Ellestad *et al.*, 1969]. Inzwischen wurde Ascochlorin ebenfalls in *Nectria coccinea*, *Nectria lucida* und *Cephalosporium diospyri* nachgewiesen. 1994 wurde das nahe verwandte Derivat Dehydroascochlorin [Takamatsu *et al.*, 1994] aus *Verticillium* sp. beschrieben. Weitere nahe verwandte Verbindungen des Ascochlorins wurden aus *Fusarium* sp. [Ellestad *et al.*, 1969] und *Nectria coccinea* [Aldridge *et al.*, 1972] beschrieben.

Bei Ascochlorin handelt es sich um ein Triprenylphenol. Der Chlorsubstituent ist für Verbindungen terrestrischen Ursprungs ungewöhnlich, bei Substanzen marinen Ursprungs finden sich Chlor oder Brom hingegen häufiger.

Allerdings eignet sich im Falle von Ascochlorin der Chlorsubstituent nicht als Hinweis, um von einem marinen Pilz zu sprechen. Gerade bei Pilzen konnten chlorierte Verbindungen auch bei Stämmen aus terrestrischen Habitaten nachgewiesen werden.

Die Biosynthese von Ascochlorin ist bereits aufgeklärt (**Abb. D5**), ein Teil der Verbindung setzt sich aus mehreren Isoprenoideinheiten zusammen, wobei eine Methyl-Gruppe verlagert wird. Der aromatische Ring im Ascochlorin leitet sich dagegen über den Polyketidweg her, über den Orsellinsäure entsteht, die weiter substituiert und in Ascochlorin inkorporiert wird [Tanabe und Suzuki, 1974; Hunter und Mellows, 1978].

## Diskussion



**Abb. D5:** Biosyntheseweg des Ascochlorins soweit bislang bekannt nach Tanabe und Suzuki 1971

Auch eine Totalsynthese von Ascochlorin ist inzwischen gelungen [Mori und Fujioka, 1983].

Laut Literatur weist Ascochlorin antibiotische Eigenschaften auf [Aldridge *et al.*, 1972], außerdem hemmt es wie auch das Dehydroaschochlorin die T-5-alpha-Reduktase [Takamtsu *et al.*, 1994]. In unseren Tests zeigte Ascochlorin eine starke Wirkung im „brine shrimp assay“.

### 4.4.5. Inhaltstoffe aus *Penicillium citreonigrum*

Unter den Pilzen ist die Gattung *Penicillium* mit mehr als 200 Vertretern eine der größten. Viele Arten wurden bereits auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht, wichtige Verbindungen, wie die Penicilline wurden erstmals in Pilzen dieser Gattung entdeckt.

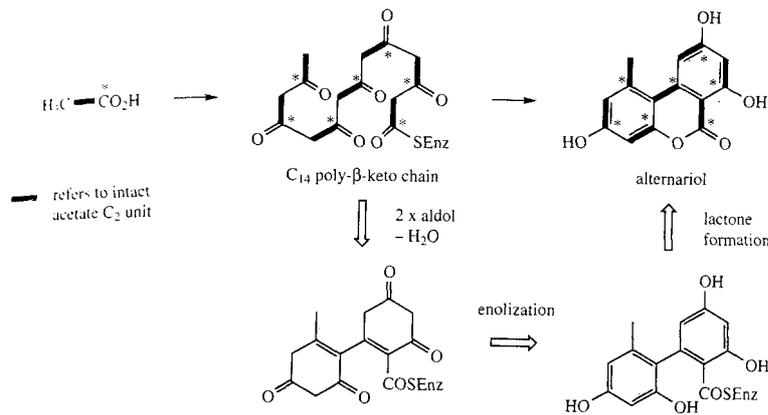
Bis heute wurden mehr als 800 strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen aus der Gattung *Penicillium* beschrieben.

Aus dem Vertreter *Penicillium citreonigrum* wurden bislang laut den Datenbanken Antibase und dem Dictionary of Natural Products nur fünf Substanzen beschrieben, darunter das Citreoviral.

Vermistatin (PAI 1-2): Vermistatin wurde erstmals aus *Penicillium vermiculatum* isoliert [Fusaka *et al.*, 1972], die Struktur konnte aber erst später aufgeklärt werden [Fusaka *et al.*, 1986]. Seitdem wurde es ebenfalls in *Penicillium verruculosum* [Murtaza *et al.*, 1996] und in *Mycosphaerella fijiensis* [Upadhyay *et al.*, 1990] nachgewiesen. Beim Vermistatin ist ein  $\gamma$ -Pyrone mit einem 4,6-Dimethoxyphthalid verbunden. Nach den bereits veröffentlichten Daten ist Vermistatin antibiotisch aktiv und weist auch antileukemische Eigenschaften auf [Fusaka *et al.*, 1979]. In den selbst durchgeführten Tests zeigte sich eine schwache antibiotische Aktivität, eine insektizide Aktivität war nicht auszumachen.

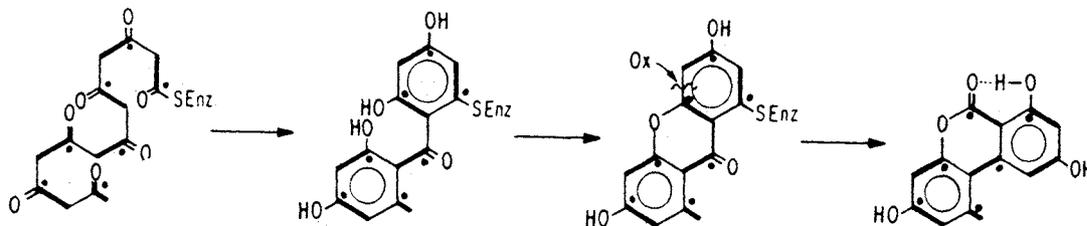
Alternariol (PAI 1-3): Alternariol wurde erstmals 1953 aus dem Pilz *Alternaria tenuis* isoliert [Raistrick *et al.*, 1953]. *Alternaria* wird als Schädling bei Papayas und Passionsfrüchten beschrieben, außerdem werden *Alternaria*-Stämme immer wieder mit Lebensmittelvergiftungen in Verbindung gebracht. Nahe verwandte Strukturen konnten ebenfalls aus *Anthocleista djalonensis* isoliert werden [Onocha *et al.*, 1995], einer Pflanze, die in West Afrika vorkommt und dort in der traditionellen Medizin verwendet wird u.a. als Stomachicum.

Biosynthetisch lässt sich laut Derwick (Medicinal Natural Products, Second Edition) das Alternariol von einer C-14 Polyketidkette ableiten, die gefaltet und zyklisiert wird (**Abb. D6**).



**Abb. D6:** Synthese des Alternariols

Weitere Untersuchungen zeigten [Stinson *et al.*, 1985], dass zumindest im Falle von *Alternaria tenuis* Alternariol nicht direkt aus der Polyketidkette gebildet wird, sondern Norlichexanthon als Zwischenprodukt, das schließlich zu Alternariol weiter reagiert. Damit ist eine Verwandtschaft zwischen diesen beiden Verbindungen hergestellt. Norlichexanthon konnte als Naturstoff sowohl in der Flechte *Lecanora reuteri* als auch im Pilz *Penicillium patulum* nachgewiesen werden. In *Alternaria tenuis* konnte es bislang nicht gefunden werden, vielleicht wird es quantitativ zu Alternariol umgesetzt. Die Biosynthese des Alternariols über Norlichexanthon (**Abb. D7**), bei dem ein aromatischer Ring oxidativ gespalten wird und die Arylsubstruktur eine Rotation durchmacht, konnte bereits bei der Synthese des  $\alpha$ -Pyrons Chartreusin nachgewiesen werden [Canham *et al.*, 1977].

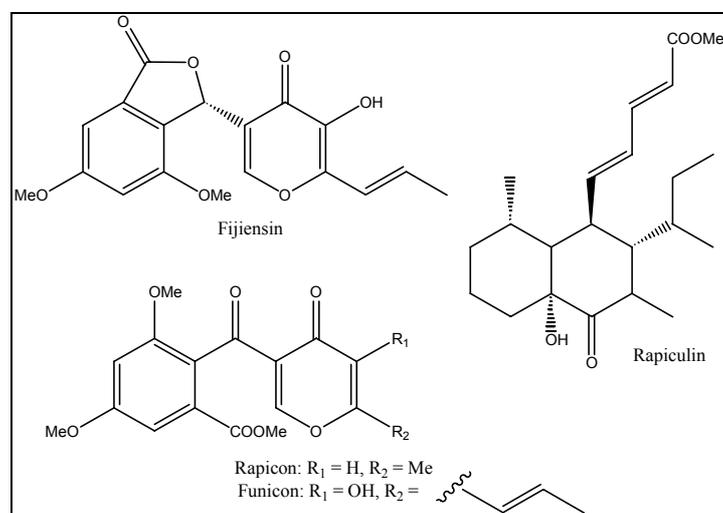


**Abb. D7:** Biosynthese des Alternariols über Norlichexanthon als Zwischenstufe

Das Vorkommen von nahe verwandten Verbindungen des Alternariols in der westafrikanischen Pflanze *Anthocleista djalonensis* wirft einmal mehr die Frage nach dem Produzenten der entsprechenden Substanzen auf. Ein Zeichen für den Pilz als Produzenten wäre es, *Alternaria* Stämme, die Alternariol oder seine Vorstufen bilden, auf der Pflanze *Anthocleista djalonensis* zu finden, was bislang aber scheinbar noch nicht untersucht wurde.

Mit *Penicillium citreonigrum* kommt nun ein weiterer Produzent des Alternariols hinzu. Ob aber auch hier eine Biosynthese über Norlichexanthon erfolgt, oder ein anderer Weg maßgeblich ist, ist unbekannt.

Desoxyfunicon (PAI 1-4): Desoxyfunicon wurde erstmals aus *Penicillium* sp. isoliert [Sassa *et al.*, 1991]. Zuvor war schon das Funicon (**Abb. D8**) beschrieben worden [Merlini *et al.*, 1970]. Weitere Derivate, so das 3-O-Methylfunicon konnten inzwischen beschrieben werden [de Stefano *et al.*, 1999]. Strukturell verwandte Verbindungen, so das Fijiensin und das Rapicon (**Abb. D8**) sind ebenfalls aus *Ramichloridium apiculatum* bekannt [Nozawa *et al.*, 1992]. Aus diesem Pilz wurde ebenfalls das Rapiculin isoliert, das eine Ähnlichkeit zu den beschriebenen Betaenonen aufweist (**Abb. D8**). Auch das bereits beschriebene Vermistatin ist strukturell mit dem Desoxyfunicon verwandt.

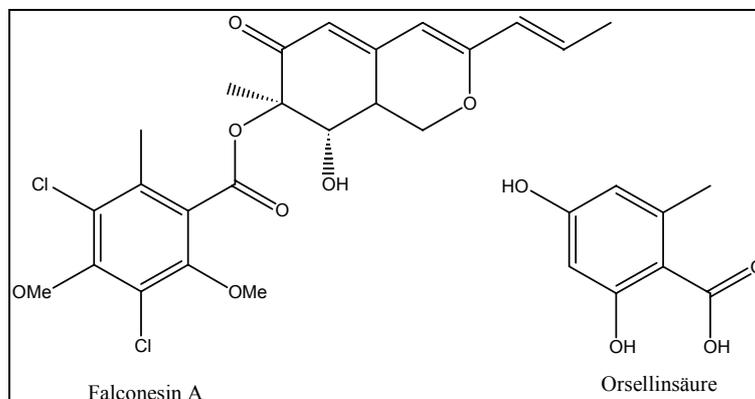


**Abb. D8:** Strukturell verwandte Verbindungen des Desoxyfunicons

Die Biosynthese des Desoxyfunicones ist noch nicht bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass das Funicon auf dem Polyketidweg durch ein Oktaketid über ein trizyklisches Intermediat synthetisiert wird [Merlini *et al.*, 1970].

Funicon und Desoxyfunicon stellen starke pflanzenwachstumshemmene Substanzen dar. In den durchgeführten Assays zeigte sich dagegen keine antibiotische Aktivität. Lediglich eine schwache Aktivität gegen *Artemia salina* war zu beobachten.

Mitorubrin (PAI 1-7): Mitorubrin wurde erstmals von Büchi aus *Penicillium rubrum* beschrieben [Büchi *et al.*, 1965]. Seitdem konnten Mitorubrin, oder seine Derivate in *Talaromyces* sp. [Suzuki *et al.*, 1999] *Talaromyces tardifaciens* [Notawa *et al.*, 1995], *Hypoxylon fragiforme* [Steglich *et al.*, 1974] und *Penicillium funiculosum* [Merlini *et al.*, 1970] nachgewiesen werden. Die strukturell ähnlichen Falconensine (**Abb. D9**) wurden aus *Emericella falconensis* isoliert [Itabashi *et al.*, 1992]. Interessant ist die Beschreibung von Mitorubrin aus *Penicillium funiculosum*, aus dem auch schon Funicone isoliert worden waren. Damit liegen die verwandten Verbindungen auch nebeneinander in einer Art vor.



**Abb. D9:** Orsellinsäure und Falconesin A

Die Biosynthese von Mitorubrin ist noch nicht bekannt, ganz klar wird jedoch bei Betrachtung der Struktur, dass Orsellinsäure (**Abb. D9**) ein Bestandteil des Mitorubrins ist. Diese konnte von Merlini auch direkt neben Mitorubrin und Funicon isoliert werden. Betrachtet man die verwandten Strukturen von Desoxyfunicon und Vermistatin, wird klar, dass auch hier Orsellinsäure als Baustein der Naturstoffe in Frage kommt, auch wenn die Veränderungen gegenüber Mitorubrin ausgeprägter

sind. Auch beim Ascochlorin spielte die Orsellinsäure bereits eine Rolle als Baustein der Verbindung. Welche Rolle die Orsellinsäure jedoch genau bei Vermistatin und Desoxyfunicon spielt, muss im Detail noch geklärt werden. Die Falconesine zeigen jedenfalls deutlich, dass Orsellinsäure als Baustein auch selbst noch verändert werden kann, im Falle der Falconesine durch Halogensubstituenten.

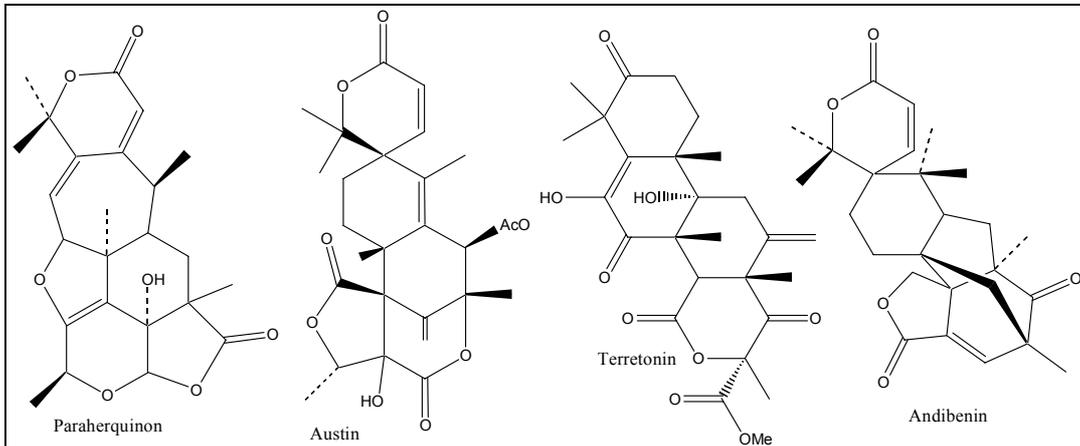
Mitorubrin wurde bereits in den bestehenden Veröffentlichungen als ein biologisch inaktiver Stoff beschrieben, zumindest in den Tests, die bislang durchgeführt worden waren. Dieses Bild wurde ebenfalls mit den durchgeführten Tests bestätigt (siehe Ergebnisteil), bei denen keine Aktivität zu beobachten war.

PAI 1-5: PAI 1-5 stellte sich bei einer Literatursuche als ein neuer Naturstoff heraus. Im Vergleich mit den aus *Penicillium citreonigrum* bereits beschriebenen Substanzen fallen einige Unterschiede auf. Die  $\gamma$ -Pyron-Substruktur von PAI 1-5 weist keine Propylengruppe auf, wie sie bei Vermistatin, Desoxyfunicon und Mitorubrin zu finden ist. Mit einem Benzolring als Baustein dürfte auch die Orsellinsäure, die bei den bereits beschriebenen Naturstoffen als Baustein diskutiert wird, keine Rolle spielen. Somit liegt mit PAI 1-5 ein Naturstoff vor, der sicher mit den bereits beschriebenen  $\gamma$ -Pyronen verwandt ist, aber biosynthetisch, wenn vom Pyronkörper selbst abgesehen wird, sicher deutliche Unterschiede aufweisen wird.

Die Biotests zeigten nur schwache Wirkungen. PAI 1-5 stellt in dieser Form eher einen nicht aktiven Naturstoff dar. Allerdings ist die Struktur von PAI 1-5 leicht zu modifizieren, was zu aktiveren Verbindungen führen könnte, aber im Detail untersucht werden müsste.

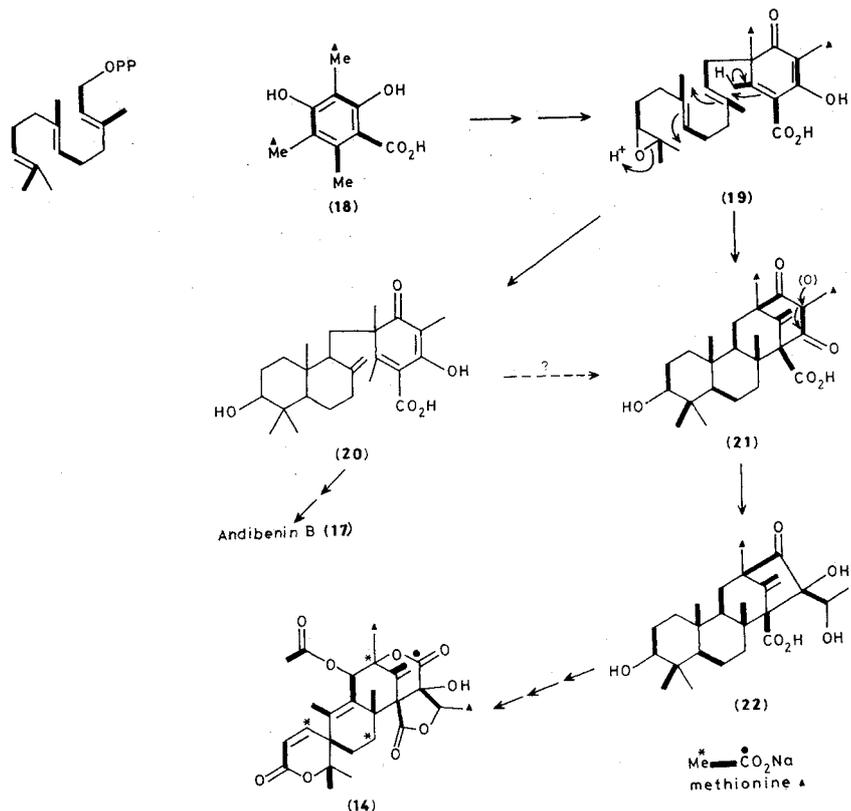
PAI 1-6 und PAI 1-8: Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, konnten zu Beginn der Strukturaufklärung von PAI 1-6 und PAI 1-8 in der Literatur keine vergleichbaren Substanzen gefunden werden. Nach erfolgter Strukturaufklärung wurde schnell klar, dass es sich bei PAI 1-6 und 1-8 um neue Naturstoffe handelte, allerdings konnten nun auch einige verwandte Substanzen gefunden werden. Darunter das bereits erwähnte Paraherquinon aus *Penicillium paraherquei* [Okuyama *et al.*, 1983] und das ebenfalls schon genannte Dehydroaustinol (ED-1) [Maebayshi *et al.*, 1982]. Weitere verwandte Substanzen konnten mit Austin aus *Apergillus ustus* [Stork und Kraus, 1976], Terretonin aus *Aspergillus terreus* [Springer *et al.*, 1979] und Andibenin aus *Aspergillus* sp. [Dunn *et al.*, 1976] isoliert werden. Bis auf das Paraherquinon

besaßen alle in der Literatur gefundenen Verbindungen im Gegensatz zu PAI 1-6 und 1-8 keinen Heptanring. Ansonsten sind sich die genannten Strukturen mit Abstrichen auf den ersten Blick beim Andibenin recht ähnlich wie **Abb. D10** zu entnehmen ist.



**Abb. D10:** Strukturell verwandte Verbindungen von PAI 1-6 und PAI 1-8

Die Biosynthese der verwandten Naturstoffe Austin und Terretinin konnte auch schon aufgeklärt werden [Ahmed *et al.*, 1989; McIntyre und Simpson, 1981]. Das Schema zur Biosynthese von Austin ist **Abb. D11** zu entnehmen.



Wie das Schema zeigt, wird im Falle von Austin ein Polyketidbaustein mit einem Derivat der Orsellinsäure (18) verknüpft. Die beiden Bausteine reagieren zu einem Intermediat (19), das zu einer Verbindung zyklisieren kann (20) aus der sich das erwähnte Adibenin ableitet. Über eine Zyklisierung (21) und Oxidation wird schließlich das Austin gebildet (14)

Das Schema macht deutlich, dass sowohl Bausteine aus dem Terpenstoffwechsel als auch aus dem Polyketidstoffwechsel in die Synthese eingehen. Bei dem Baustein aus dem Polyketidstoffwechsel handelt es sich um ein Derivat der Orsellinsäure nämlich die Dimethylorsellinsäure. Der publizierte Biosyntheseweg unterstreicht auch nochmal die Verwandtschaft zum Andibenin, das sich aus einer Zwischenstufe ableiten lässt.

Die Strukturen von PAI 1-6 und PAI 1-8 leiten sich wahrscheinlich auf einem ähnlichen Biosyntheseweg her. PAI 1-8 könnte sich vom Zwischenprodukt 21 ableiten lassen. D.h. es wurde kein Ring nachträglich geöffnet, wie es im Ergebnisteil kurz diskutiert wurde, er wurde gar nicht geschlossen. PAI 1-6 könnte dem dargestellten Weg bis auf die Stufe des Austins folgen, allerdings muss noch erklärt werden wann und wie es zur Ausbildung des Heptanringes kommt. Weitere Untersuchungen im Falle von PAI 1-6 Und PAI 1-8 wären interessant, um mehr über die Biosynthese aussagen zu können, lässt sich doch vielleicht über die Orsellinsäure eine engere Verwandtschaft zu den bereits beschriebenen Strukturen (Vermistatin, Desoxyfunicon, Mitorubrin) herstellen, als sie an den Verbindungen selbst abzulesen ist. Auch ist noch völlig offen, wie es bei PAI 1-6 und 1-8 zum Heptanring anstelle eines Hexanringes kommt. Trotz dieser Unterschiede sind PAI 1-6 und 1-8 wie ihre verwandten Strukturen zu den Meroterpenoiden zu zählen, die sich aus einem Terpenbaustein und einem Orsellinsäurederivat zusammensetzen.

In den durchgeführten Biotests zeigte sich bei beiden Verbindungen nur eine moderate Aktivität gegenüber *Artemia salina*. Damit scheint die Aktivität ähnlich der ihrer verwandten Verbindungen zu sein, die als schwach toxisch angegeben wird.

Die diskutierten Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden konnten, zeigen deutlich die Vielfalt von Sekundärstoffen in marinen Pilzen an. Dabei kann aus diesen Pilzen nicht nur mit neuen Derivaten von bereits bekannten Strukturtypen gerechnet werden, sondern es ist auch mit neuen Strukturtypen und ungewöhnlichen Substituenten zu rechnen, wie das Hortein und das 10-Hydroxy-18-N-2-naphtyl-N-

phenylaminobetaenon deutlich machen. Marine Pilze stellen sicher eine wertvolle Quelle neuer Naturstoffe dar, von denen einige sicher auch pharmazeutisch einen Nutzen haben werden.

#### **4.5. Inhaltsstoffmuster mariner Pilze: Probleme und Chancen bei einer großen Variabilität**

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass Pilze marinen Ursprungs eine lohnende Quelle neuer Naturstoffe sind. Mit den entsprechenden Screeningverfahren wird es gelingen, verstärkt aktive Naturstoffe zu isolieren.

Der Vergleich von verschiedenen Stämmen der untersuchten Pilze *Cladosporium herbarum* und *Penicillium citreonigrum* hat auch gezeigt, dass die Produktion von Inhaltsstoffen sehr variabel ist. Das machen auch die Naturstoffe deutlich, die aus *Cladosporium herbarum* marinen Ursprungs isoliert wurden [Jadulco *et al.*, 2001] und die mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Substanzen nichts gemein haben.

Es ist schon länger bekannt, dass die Produktion von Inhaltsstoffen in Pilzkulturen durch verschiedene Kulturbedingungen beeinflusst wird. Bei den aus den Schwämmen isolierten Pilzstämmen konnte Jan Hiort zeigen, dass der Salzgehalt des Kulturmediums einen Einfluss auf die Bildung von Sekundärstoffen hatte. Aber nicht nur verschiedene Kulturbedingungen führen zu einer Änderung des Sekundärstoffpools, auch muss immer mit einer Mutation der angelegten Pilzkultur gerechnet werden, wie die Beispiele von *Microsphaeropsis* sp. und *Penicillium* sp. gezeigt haben. Die Variabilität der Pilze marinen Ursprungs bei der Synthese von Sekundärstoffen erschwert es, wichtige Inhaltsstoffe mehrmals aus einem Stamm zu isolieren, oder die Ausbeute zu kontrollieren.

Die hohe Variabilität bei der Produktion von Naturstoffen lässt sich Vorteilhaft nutzen, lassen sich z.B. doch durch Änderung der Kulturbedingungen aus einem Organismus eine Vielzahl an unterschiedlichen Stoffen gewinnen. Außerdem hat man so die Chance nach Bedingungen zu suchen, unter denen erwünschte Inhaltsstoffe besonders angereichert werden, ohne dass lange gezüchtet werden muss, wie es bei Pflanzen oft der Fall ist. Hat man einmal die Synthesewege eines Organismus verstanden und die Bedingungen erforscht, unter denen sie stattfinden, lassen sich

Kulturen so, dass sie diejenigen Substanzen produzieren, die erwünscht erwünscht sind.

Die Vorteile beim Arbeiten mit Pilzen aus marinen Habitaten überwiegen also, es muss nur noch mehr über sie gelernt werden, um sie noch sinnvoller nutzen zu können als es bis jetzt der Fall ist. Mit dem zunehmenden Wissen sind aus diesem Bereich so sicher noch viele Entdeckungen zu erwarten und es ist auch mit Substanzen zu rechnen, die pharmazeutisch relevant sein werden.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Suche nach neuen Naturstoffen hat der marine Lebensraum als Quelle neuer Substanzen in den letzten 20 Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Seit der Entdeckung des Penicillins 1928 sind insbesondere die Pilze hinsichtlich der Suche nach neuen Antibiotika und anderen pharmazeutisch relevanten Verbindungen immer wichtiger geworden. Pilze terrestrischer Habitate sind inzwischen bereits aus den unterschiedlichsten Lebensräumen untersucht worden. Bisher konnte aus ihnen eine große Vielfalt von Naturstoffen isoliert werden. Die Zahl an neuen Naturstoffen ist hier allerdings in den letzten Jahren rückläufig.

Inzwischen wird verstärkt nach neuen Naturstoffen in der Mikroflora der marinen Lebensräume gesucht, wobei insbesondere Pilze marinen Ursprungs an Bedeutung gewonnen haben.

Während Makroorganismen marinen Ursprungs schon länger intensiv untersucht werden, nahm das Interesse an marinen Mikroorganismen erst in den letzten zehn Jahren stark zu. Pilze im marinen Habitat wurden sehr spät beschrieben. Die ersten Funde wurden 1869 bekannt, doch erst in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde langsam klar, dass auch im marinen Lebensraum eine reichhaltige Pilzflora zu finden ist.

Inzwischen werden die marinen Pilze in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe intensiv untersucht. Vorteile beim Arbeiten mit marinen Organismen liegen u.a. in der guten Umweltverträglichkeit, da durch Fermentation ausreichend Substanz zu gewinnen ist, entfällt das Sammeln von Organismen in großen Mengen, was den natürlichen Lebensraum schont.

Es stellte sich zudem heraus, dass aus marinen Schwämmen eine Vielzahl an Pilzen isoliert werden kann. Aus den Pilzisolaten konnte bereits eine Reihe unterschiedlicher Strukturen isoliert werden, unter denen etliche neue Naturstoffe zu finden sind. Strukturell gab es Verbindungen, die denen terrestrischer Habitate glichen, aber auch solche mit ungewöhnlichen Strukturmerkmalen, die in Verbindungen terrestrischer Quellen nicht oder nur selten zu finden waren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inhaltsstoffe aus fünf verschiedenen Pilzen marinen Ursprungs untersucht. Vier der untersuchten Stämme wurden aus dem Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba* isoliert, ein Pilzstamm stammte aus dem Schwamm *Pseudoceratina purpurea*, der aus indonesischen Gewässern entnommen wurden war. Neben den untersuchten Stämmen konnte eine Vielzahl weiterer Stämme aus den genannten Schwämmen isoliert werden. Aus *Aplysina aerophoba* konnten bislang zwanzig Stämme isoliert werden, aus *Pseudoceratina purpurea* wurden sechs verschiedene Stämme isoliert. Bei der Identifizierung der isolierten Stämme zeigte sich, dass einige Arten mehrfach isoliert worden waren. Das Inhaltsstoffmuster der selben Arten wurde miteinander verglichen. Übereinstimmungen konnten aber bei den Stämmen nicht ausgemacht werden, was aber wegen der beschriebenen hohen Variabilität bei Pilzen nicht überraschend war.

Aus dem Pilz *Microsphaerosis* sp. konnten bereits während der Diplomarbeit sechs Verbindungen strukturell aufgeklärt werden. Vier davon waren Tetrahydroxyanthrachinone (**5**, **6**, **7**, **8**), das Rheoemodin (**8**) war bereits bekannt, bei den anderen Verbindungen handelte es sich um neue Naturstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch CD-Messungen die absolute Stereochemie von zwei isolierten Anthrachinonen (**5**, **6**) aufgeklärt werden. Weiter konnten die Betaenonderivate noch genauer untersucht werden, wobei sich herausstellte, dass im Falle vom Betaenonderivat **1** ein Gemisch von zwei Isomeren vorlag. Mittels NOE-Spektren wurden die beiden Isomere genauer untersucht.

Aus dem Pilz *Hortaea werneckii* konnte ein neuer Naturstoff, das Hortein (**9**), isoliert werden. Beim Hortein handelt es sich um einen Naturstoff, dessen Strukturmerkmale bislang sehr selten beschrieben worden sind. In Biotests zeigte Hortein eine leichte entzündungshemmende Wirkung.

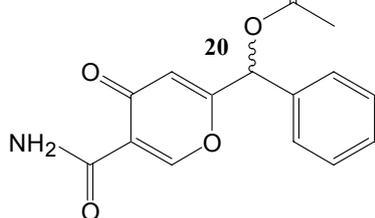
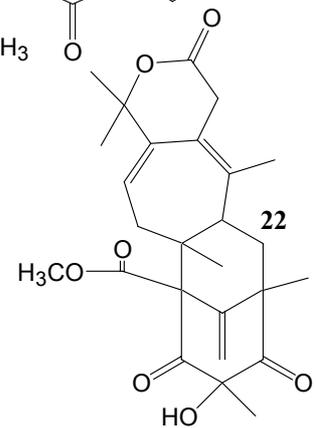
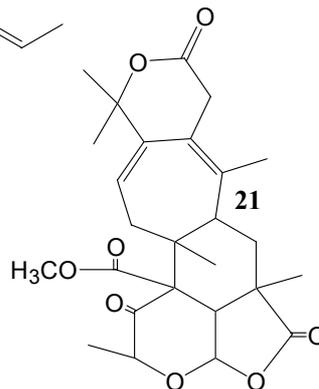
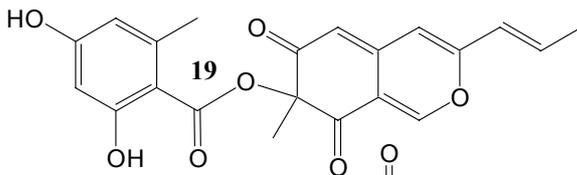
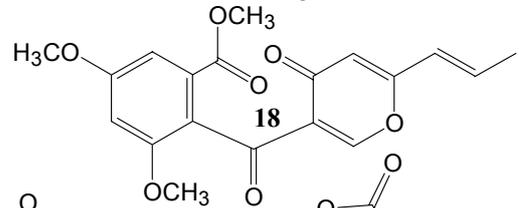
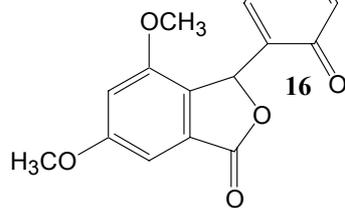
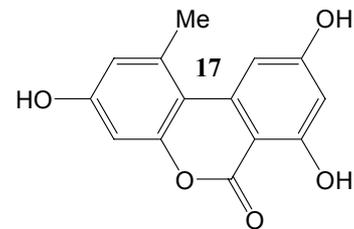
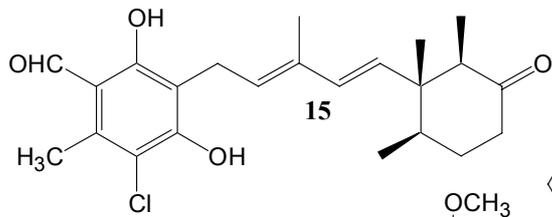
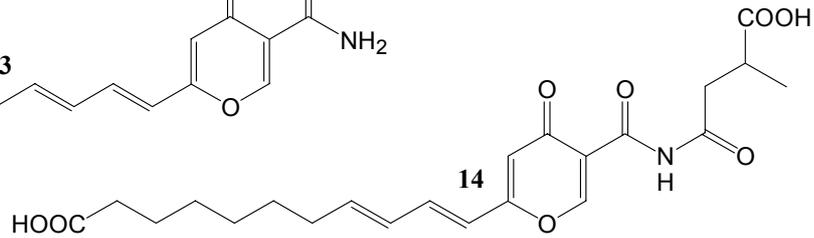
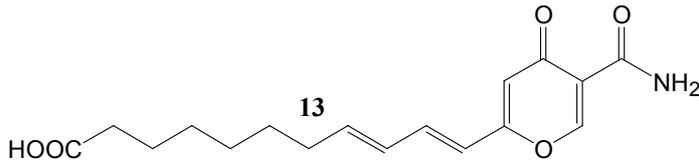
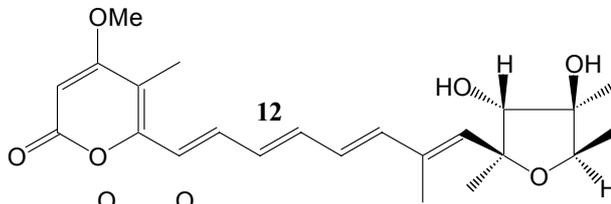
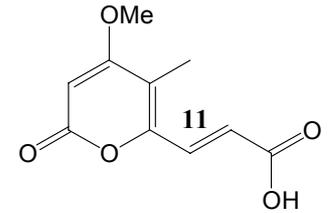
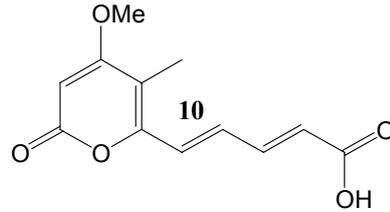
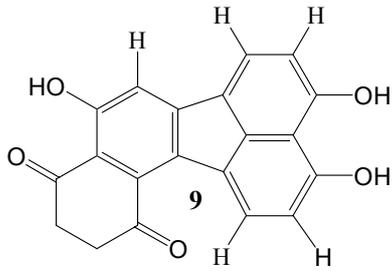
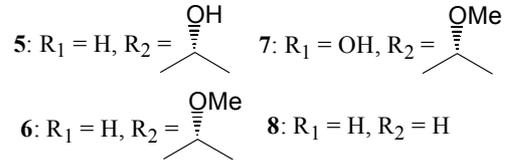
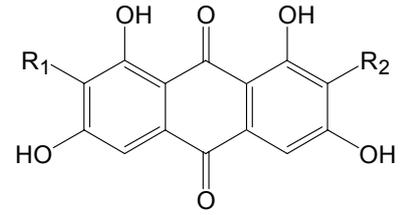
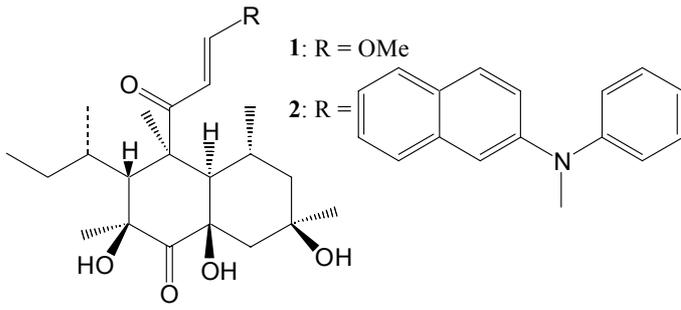
Ebenfalls aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* stammte der Pilzstamm *Cladosporium herbarum*. Aus ihm konnten insgesamt fünf verschiedene Verbindungen isoliert werden. Bei den beiden  $\alpha$ -Pyrone Herbarin A (**10**) und B (**11**) handelte es sich um neue Naturstoffe, während das Citreoviridin (**12**) bereits bekannt war. Neben den  $\alpha$ -Pyrone konnten auch zwei  $\gamma$ -Pyrone isoliert werden. Es handelte sich um die bereits vorgestellten Microsphaerone A (**14**) und B (**13**), die zum

erstmals aus *Cladosporium herbarum* beschrieben wurden. Bemerkenswert war, dass in einem Organismus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Pyrone nebeneinander nachgewiesen werden konnten. In Bioassays zeigten die Herbarine A und B eine leichte Aktivität gegenüber *Artemia salina*. Citreoviridin hemmte deutlich das Wachstum der Neonates des Falters *Spodoptera littoralis*. Die Microsphaerone A und B zeigten in keinem der durchgeführten Tests nennenswerte Ergebnisse.

Aus dem Pilz *Phomopsis* sp. konnten mehrere Verbindungen isoliert werden. Strukturell aufgeklärt wurde das Ascochlorin (**15**), das bereits aus einem Pilz der Gattung *Fusarium* beschrieben worden war. Für *Phomopsis* sp. war es das erste Mal, dass Ascochlorin beschrieben wurde. In den Biotests zeigte sich eine starke zytotoxische Aktivität, wie an *Artemia salina* abgelesen werden konnte. Der LC<sub>50</sub>-Wert konnte mit 25 $\mu$ g bestimmt werden.

Der Pilz *Penicillium citreonigrum* stammte nicht wie die anderen bearbeiteten Stämme aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba*, sondern aus dem Schwamm *Pseudoceratina purpurea*. Aus dem Pilz konnten sieben verschiedene Verbindungen isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt werden. Dabei stellten sich Vermistatin (**16**), Alternariol (**17**), Desoxyfunicon (**18**) und Mitorubrin (**19**) als bereits bekannte Verbindungen heraus, die aber zum ersten Mal aus *Penicillium citreonigrum* isoliert werden konnten. Die drei Verbindungen PAI 1-5, PAI 1-6 und PAI 1-8 (**20**, **21**, **22**) - darunter zwei Meroterpenoide - stellten sich als neue Naturstoffe heraus. Biotests dieser Verbindungen ergaben allerdings keine ausgeprägten Aktivitäten in den eingesetzten Testsystemen.

Zusammenfassung



## 6. Literaturverzeichnis

Aldridge D. C., Borrow A., Foster R. G., Large M. S., Spencer H., Turner W. B. (1972) Metabolites of *Nectria coccinea*  
*J. Chem. Soc. Perkin 1*, 2136-2141

Ahmed S. A., Scott F. E., Stenzel D. J., Simpson T. J. (1989) Studies on the biosynthesis of the mycotoxin Austin, a meroterpenoid metabolite of *Aspergillus ustus*  
*J. Chem Soc. Perkin Trans. I*, 807-816

Barash I., Pupkin G., Netzer D., Kashman Y. (1982) A novel enolic  $\beta$ -ketoaldehyde phytotoxin produced by *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici*  
*Pl. Pysiol.* **69**, 23-27

Berger Y. (1980). 1,3,6,8-Tetrahydroxyanthrachinone from *Aspergillus versicolor*.  
*Phytochemistry* **19**, 2779-2780

Bergmann W., Feeney R. J., (1951) Contribution to the study of marine sponges  
*J. Org. Chem.* **16**, 981-987

Bertrand J. C. and Vacelet J. (1971) L'association entre éponges cornées et bactéries  
*C R Hebd. Séan.c Acad. Sci. Paris* **273**, 638-641

Bowling C. C. (1967) Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet  
*Ann. Ent. Soc. Am.* **60**, 1215-1216

Brauers G. (1998) Sekundäre Inhaltsstoffe schwamm-assoziiierter Pilze  
Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Brauers G., Edrada R. A., Ebel R., Proksch P., Wray V., Berg A., Gräfe U., Schächtele C., Totzke F., Finkenzeller G., Marme D., Kraus J., Münchbach M., Michel M., Bringmann G., Schaumann K. (2000) Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: Novel Inhibitors of Protein Kinases  
*J. Nat. Prod.* **63**(6), 739-745

Brown E. S. and Dewhorst C. F. (1975) The genus *Spodoptera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Africa and the near east  
*Bull. Ent. Res.* **65**, 221-262

Büchi G., White J. D., Wogan G. N. (1965) The structures of mitorubrin and mitorubrinol  
*J. A. C. S.* **87**, 3484-3489

Cardellina J. H. and Grode S. H. (1984) Sesquiterpenes from the sponges *Dysidea etheria* and the nudibranch *Hypselodoris zebra*,  
*J. Nat. Prod.* **47**, 76-83

Chapman and Hall /CRC (2003) DNP – Dictionary of Natural Products on CD-ROM  
Hampden Data Services, Boca Raton, USA

Cheng X. C., Voroglu M., Abrell L., Crews P., Lobkovsky E. (1994) Chloriolins A-C, chlorinated sesquiterpenes produced by fungal cultures separated from a *Jaspis* marine sponge  
*J. Org. Chem.* **59**, 6344-6348

Cimino G., Sodano G., Spinella A., (1987) New propionate derived metabolites from *Aglaja depectica* and from its prey *Bulla striata* (Ophistobranch molluscs)  
*J. Org. Chem.* **52**, 5326-5331

Cohen P., Holmes C. F. B. and Tsukitani Y. (1990)  
Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation  
*TIBS* **15**, 98-102

Commonwealth Institut of Entomology (1967)

*Spodoptera littoralis* (Boisd.)

Distribution maps insects pests, 232

Cragg G. M., Newman D. J., and Snader K. M. (1997) Natural products in drug discovery and development

*J. Nat. Prod.* **60**, 52-60

De Hoog G. S. and Gerrits-van-den-Ende A. H. G. (1992) Nutritional pattern and ecophysiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra

*Antonie Leeuwenhoek* **62**, 321-329

De Siva E. D. and Scheuer P. J. (1980) Manoalide, an antibiotic sesterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*

*Tetrahedron Lett.* **21**, 1611-1614

De Stefano S., Nicoletti R., Milone A., Zambardino S. (1999) 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*

*Phytochemistry* **52**, 1399-1401

Dimetry N. Z. (1970) A successful technique for mass rearing of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. on an artificial diet

*J. Appl. Entomol.* **66**, 408-411

Domsch K. H., Gams W., Anderson T.H. (1980) Compendium of soil fungi

Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco

Dunn a. W., Johnstone R. a. W., Sklarz B. (1976) Isolation of C<sub>25</sub> polyisoprenoids from *Aspergillus* sp.: Crystal structure of Andibenin

Ebel R. (1998) Wundinduzierte Biotransformation bromierter Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina*: Biochemische Charakterisierung und ökologische Bedeutung  
Byerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Eder C. and Proksch P. (1997) Pharmakologisch aktive Naturstoffe aus marinen Organismen – Leitstrukturen für neue Arzneimittel?  
*Drogen Report* Nr. 18, Jahrgang **10**

Ellestad G. A., Evans R. H., Kunstmann M. P. (1969) Some new terpenoid metabolites from an unidentified *Fusarium* species  
*Tetrahedron* **25**, 1323-1334

El-Gamal A. A., Takeya K., Itokawa H., Halim A. F., Amer M. M., Saad H. A., Awad S. A. (1995) Anthraquinones from *Galium sinaicum*  
*Phytochemistry* **40**, 245-251

Fujii Y., Fukuda A., Hamasaki T., Ichimoto I., Nakajima H. (1995) Twelve-Membered lactones produced by *Cladospodium tenuissimum* and the plant growth retardant activity of Cladospolide B.  
*Phytochemistry* **40**, 1443-1446

Funabashi Y., Horiguchi T., Linuma S., Tanida S., Harada S. (1994) TAN-1496 A, C and E, Diketopiperazine antibiotics with inhibitory activity against mammalian topoisomerase I  
*J. Antibiot.* 1203-1219

Fusaka J., Nemeč P., Kuhr I. (1972) Vermiculine, a new antiprotozoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum*  
*J. Antibiot.* **25**, 208-211

Fusaka J., Fuskova A., Nemeč P. (1979) Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects, produced from *Penicillium vermiculatum*  
*Biologia* **34**, 735-739

Fusaka J., Uhrin D., Proska B., Voticky Z., Ruppeltdt J. (1986) The structure of vermistatin a new metabolite from *Penicillium vermiculatum*  
*J. Antibiot.* **39**, 1605-1608

Garson M. J. (1994) The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why it is important. In : van Soest R. W. M., van Kempen T. M. G., Braekman J. C., *Sponges in Time and Space*, 427-440  
A. A. Balkema, Rotterdam

Hayashi M., Kim Y.P., Hiroko H., Natori M., Takamatsu S., Kawakubo T., Masuma R., Komiyami K., Omura S. (1995). Macrophelide, a novel inhibitor of cell-cell adhesion molecule I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities  
*J. Antibiot.*, 1435-1439

Hirota A., Isogai A., Sakai, H. (1980) Structure of cladospolide A, a novel macrolide from *Cladosporium fulvum*  
*Agric. Biol. Chem.* **45** (3), 799-800

Hunter R., Mellows G. (1978) Detection of deuteride shifts in the biosynthesis of the fungal triprenylphenol, Ascochlorin, by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy following incorporation of [3-<sup>13</sup>C, 4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-mevalonic acid  
*Tetrahedron Lett.* **50**, 5051-5054

Ichihara A., Oikawa H., Hayashi K., Sakamura S. (1983) Structures of betaenones A and B phytotoxins from *Phoma betae* Fr.  
*J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2907-2908

Ichihara A., Oikawa H., Hashimoto M., Sakamura S., Haraguchi T. & Nagano H. (1983). A Phytotoxin, betaenone C, and its related metabolites of *Phoma betae* Fr  
*Agric. Biol. Chem.* **47** (12), 2965-2967

Ichihara A., Miki S., Kawagishi H., Sakamura S. (1989) Total synthesis of (-)-Betaenone C

*Tetrahedron Lett.* **30**(34), 4551-4554

Itabshi T., Nozawa K., Miyaji M., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K. (1992) Falconensins A, B, C and D, new compounds related to azaphilone from *Emericella falconensis*

*Chem. Pharm. Bull.* **40**(12), 3142-3144

Jacyno J. M., Harwood J. S., Cutler H. G., Lee M.K. (1993) Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporoides*.

*J. Nat. Prod.* **56**, 1397-1401

Jadulco R., Brauers G., Edrada R. A., Ebel R., Wray V., Sudarsono, Proksch P. (2001) New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*

*J. Nat. Prod.* **65**, 730-733

Kimura Y., Yoshinari T., Shimada A., Hamasaki T. (1995) Isofunicone, a pollen growth inhibitor produced by the fungus, *Penicillium* sp.

*Phytochemistry* **40**, 629-631

Kobayashi E., Ando K., Nakano H., Tamaoki T. (1989) UCN-1028A, A novel and specific inhibitor of protein Kinase C, from *Cladosporium*.

*J. Antibiot.* 153-155

Kohlmeyer J. and Kohlmeyer E. (1979): Definition of marine fungi, In: Marine mycology – the higher fungi, Academic Press, New York, 1-3

Lam Y. K. T., Hensens O. D., Ransom R., Giacobbe R. A., Polishook J., Zink D. (1996) L-7555,807, a new non-peptide bradykinin binding inhibitor from an endophytic *Microsphaeropsis* sp.

*Tetrahedron* **52**, 1481-1486

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

Linett P. E., Mitchell A. D., Osselton M. D., Mulheirn L. J., Beechey R. B. (1978) Cutreoviridin a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine trisphosphatase  
*Biochem. J.* **170**, 503-510

Maebayshi Y., Okuyama E., Yamazaki M., Katsube Y. (1982) Structure of ED-1 isolated from *Emericella dendata*  
*Chem. Pharm. Bull.* **30**(5), 1911-1912

Manulis S., Netzer D., Barash, I. (1986) Structure –Activity relationships as inferred from comparative phytotoxicity of stemphyloxins and betaenones  
*J. Phytopathology* **115**,283-287

McIntyre C. R., Simpson T. J. (1981) Biosynthesis of terretonin, a polyketide-terpenoid metabolite of *Aspergillus terreus*  
*J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1043-1045

Merlini L., Nasini G., Selva A. (1970) The structure of funicone a new metabolite from *Penicillium funiculosum* Thom  
*Tetrahedron* **26**, 2739-2749

Miki S., Sato Y., Tabuchi H., Oikawa H., Ichihara A., Sakamura S. (1990) Synthesis of (-)-probetaenone I: Structural confirmation of biosynthetic precursor of betaenone B  
*J. Chem. Soc. Perkin trans. 1* 1228-1229

Mori K., Fujioka T., Synthesis of (+), (-)-ascochlorin, (+), (-)-ascofuranone and LL-Z1272 $\alpha$   
*Tetrahedron* **40**(14), 2711-2720

Murtaza N., Husain S. A., Sarfaraz T. B., Sultana N., Faizi S. (1997) Isolation and identification of vermistatin, ergosterol, stearic acid and mannitol, metabolic products of *Penicillium verruculosum*

*Planta Med.* **63**, 191

Müller H., Brackhagen O., Brunne R., Henkel T., and Reichel F. (2000) Natural products in drug discovery, in: Ernst Schering research foundation workshop 32: The role of natural products in drug discovery, *Springer-Verlag*, Germany, 205-216

Namboori K., Pereira L., Merchant J. R. (1980) Fungal transformation of pregnenolone and progesterone with the marine fungus *Cladosporium herbarum*. *Indian J. Biochem. Biophys.* **17**(2), 149-152

Nishiyama S., Shizuri Y., Yamamura S. (1985) Total synthesis and the absolute configuration of citreoviral and citreoviridin

*Tetrahedron letters* **26**(2), 231-234

Niwa M., Endo T., Ogiso S., Furukawa H., Yamura S. (1981) Two new pyrones, metabolites of *Penicillium citreo-viride* biourge

*Chem. Lett.* 1285-1288

Nozawa K., Nakajima S., Kawai K., Udagawa S. (1992) A  $\gamma$ -pyrone derivative, rapicone from *Ramichloridium apiculatum*

*Phytochem.* **31**(12), 4177-4179

Nozawa K., Saito R., Udagawa S., Nakajima S., Kawai K. (1995) An azaphilone from *Talaromyces tardifaciens*

*Biochemistry* **39**(3), 719-721

Oikawa H., Ichihara A., Sakamura S., (1984) Biosynthesis of betaenone B, phytotoxin of *Phomopsis betae* Fr.

*J. Chem. Chem. Soc. Chem. Commun*, 814-815

Oikawa H., Ichihara A., Sakamura S. (1988) Biosynthetic study of betaenone B: origin of the oxygen atoms and accumulation of a deoxygenated intermediate using P-450 inhibitor

*J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 600-602

Okuyama E., Yamazaki M. (1983) Paraherquonin, a new meroterpenoid from *Penicillium paraherquei*

*Tetrahedron Lett.* **24**(30), 3113-3114

Pathirana C., Jensen P. M., Fenical W. (1992) Marinone and Debromomarinone: Antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium

*Tetrahedron Lett.* **33**, 7663-7666

Pettit G. R., Herald C. R., Doubek D. L. and Herald D. L. (1982) Isolation and structure of bryostatin 1

*J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6846-6848

Pittet J. L., Bouillant M. L., Bernillon J., Arpin N., Favre-Bonvin J. (1983) The presence of reduced-glutamine mycosporines, new molecules, in several Deuteromycetes.

*Tetrahedron Lett.* **24**(1), 65-68

Proksch P. (1991) Pflanzliche Sekundärstoffe als chemischer Fraßschutz gegen herbivore Insekten

*Pharmazie in unserer Zeit* **5**, 217-224

Raistrick H., Stickings C. E., Thomas R. (1953) Alternariol, a new pyran from the fungus *Alternaria* sp.

*Biochem. J.* **55**, 421-423

Rinehart K. L., Gloer J. B., Cook J. C., Mizesak S. A. and Scahill T. A. (1981), Structures of the didemnins; antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1857-1859

Rösler H. J. (1987) Lehrbuch der Mineralogie

VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig

Sakabe N., Goto T., Hirata Y. (1964) The structure of citreoviridin , a toxic compound produced by *P. citreoviridemolded* on rice

*Tetrahedron Lett.* **27**, 1825-1830

Salama H. S., Dimetry N. Z. and Salem S. A. (1971) On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd.

*J. Appl. Entomol.* **67**, 261-266

Sara M. (1971) Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae)

*Mar. Biol.* **11**, 214-221

Sassa T., Nukina M., Suzuki Y. (1991) Deoxyfunicone, a new  $\gamma$ -pyrone metabolite from a resorcyliide- producing fungus (*Penicillium* sp.)

*Agric. Biol. Chem.* **55**, 2415-2416

Schmitz F. J. (1994) Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna.

In: van Soest R. W. M., van Kempen T. M. G. and Braekman J. C., *Sponges in Time and Space*, 485-496, A. A. Balkema, Rotterdam

Schneider U., Schwenk H. U. and Bornkamm G. (1977) Characterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lym Phomopsis,

*Int. J. Cancer* **19**, 621-626

Schulze E. (1879) Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien.

Sechste Mitteilung. Die Gattung *Spongelia*

*Zeitschr. F. wissenschaft. Tool.* **32**, 117-157

Seeliger P. R., Heymer T. (1981) Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt

Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Shrey H. H. and Hale R. L. (1965) Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium

*J. Econ. Entomol.* **58**, 522-524

Solis P. N., Ravelo A. G., Gonzalez A. G., Gupta M. P. Phillipson J. D. (1995) Bioactive anthraquinone glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. *Fessonia*,

*Phytochemistry* **38**, 477-480

Springer J. P. (1979) Terretonin, a toxic compound from *Aspergillus terreus*

*J. Am. Chem. Soc.* 812-815

Steglich W., Klaar M., Furtner W. (1974) (+)-Mitorubrin Derivatives from *Hypoxyton fragiforme*

*Phytochemistry* **13**, 2874-2875

Steube K. G., Meyer D., Proksch P., Supriyono W., Sumryono W. and Dexler H. G. (1998) A new calyculin derivative from the sponge *Theonella swinhoei* is a novel and potent inhibitor of tumor cell proliferation

*Anticanc. Res.* **18**, 129-138

Steyn P. S., Vleggaar R., Wessels P. L., Woudenberg M. (1982) Biosynthesis of citreoviridin. A carbon-13 N. M. R. study

*J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2175-2178

Stinson E. E., Wise W. B., Moreau R. A., Jurewicz J., Pfeiffer P. E. (1986) Alternariol : Evidence for biosynthesis via norlichexanthone

*Can. J. Chem.* **64**, 1590-1594

Stork G., Kraus G. (1976) Austin. A novel polyisoprenoid mycotoxin from *Aspergillus ustus*

*J. Am. Chem. Soc.*, 6748-6750

Sundstrom C. and Nilsson K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma *Phomopsis* cell line (U-937)

*Int. J. Cancer* **17**, 565-577

Suzuki S., Hosoe T., Nozawa K., Yaguchi T., Udagawa S., Kawai K. Mitorubrin derivatives on Ascomata of some *Talaromyces* species of Ascomycetous fungi

*J. Nat. Prod.* **62**, 1328-1329

Takamatsu S., Rho M-C., Masuma R., Hayashi M., Komiyama K., Tanaka H., Omura S. (1994) A novel testosterone 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, 8',9'-Dehydroascochlorin produced by *Verticillium* sp. FO-2787

*Chem. Pharm. Bull.* **42**(4), 953-956

Thomson R. H. (1997) Anthraquinones, In: Naturally occurring quinones IV, recent advances: Chapman and Hall, New York, 307-483

Tsuchiya S. Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T. and Tada K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* **26**, 171-176

Uijthof J. M. J., De Cock A. W. A. M., De Hoog G. S., Quint W. G. V., Van Belkum A. (1994) Polymerase chain reaction mediated genotyping of *Hortaea werneckii* causative agent of tinea nigra

*Mycoses* **37**, 307-312

Vacalet (1971) Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida)

*J. Micros.* **12**, 363-380

Van Wageningen B. C., Larsen R., Cardellina J. H., Randazzo D., Lindert Z. C. and Swithenbank C. (1993) Ulosantoin, a potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*, *J. Org. Chem.* **58**, 335-337

Varoglu M., Corbett Z. H., Crews P. (1997) Asperazine a selective cytotoxic alkaloid from a sponge derived culture of *Aspergillus niger*  
*J. Org. Chem.* **62**, 7078-7079

Wang C. Y., Wang B. G., Brauers G., Proksch P., Ebel R. (2002) Microsphaerones A and B, two novel  $\gamma$ -pyrone derivatives from the sponge-derived fungus *Microsphaeropsis* sp.  
*J. Nat. Prod.* **65**, 772- 775

Wartenberg A. (1979) Systematik der niederen Pflanzen.  
2. überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag. Stuttgart

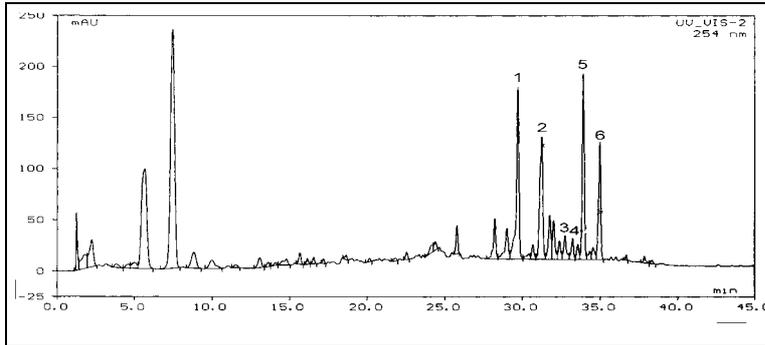
Weinheimer A. J. and Spraggins R. L. (1969) The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA<sub>2</sub> and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. Chemistry of Coelenterates  
*Tetrahedron Lett.* **15**, 5185-5188

Wheeler L. A., Sachs G., Goodrum D., Amdahl L., Horowitz N. and de Vries W. (1988) Importance of marine natural products in the study of inflammation and calcium channels In: Fautin, D. G., Biomedical Importance of Marine Organisms Memoirs of the California Academy of Sciences, Number **13**, 125-132  
California Academy of Sciences, San Francisco

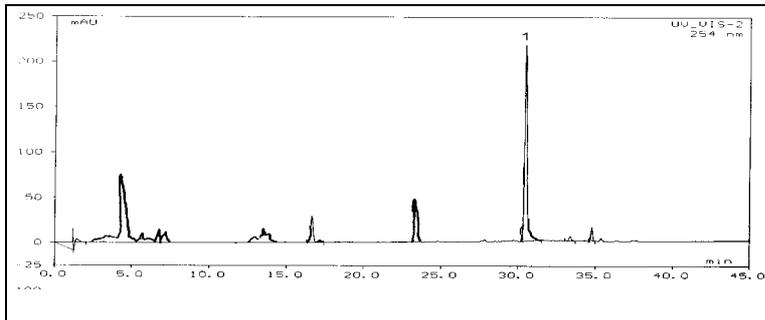
Yu C. M., Curtis J. M., Wright J. L., Ayer S. W., Fathi-Afshar Z. R. (1996) An unusual fatty acid and its glyceride from the marine fungus *Microsphaeropsis olivacea*.  
*Can. J. Chem.* **74**, 730-735

Ziegler-Heitbrock H. W., Thiel E., Nagao T. and Lee K. (1988) Establishment of a human cell line (Mono-Mac-6) with characteristics of mature monocytes  
*Int. J. Cancer* **41**, 456-461

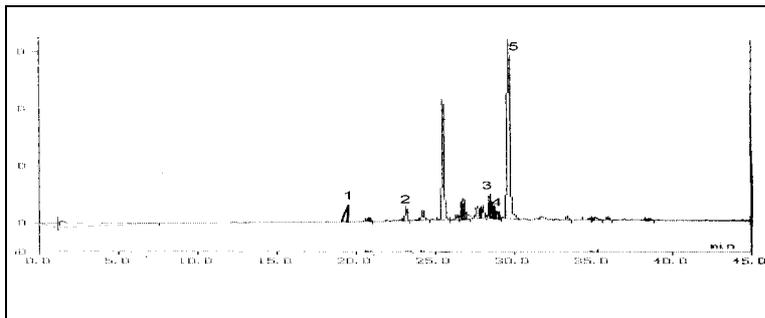
## 6. Anhang



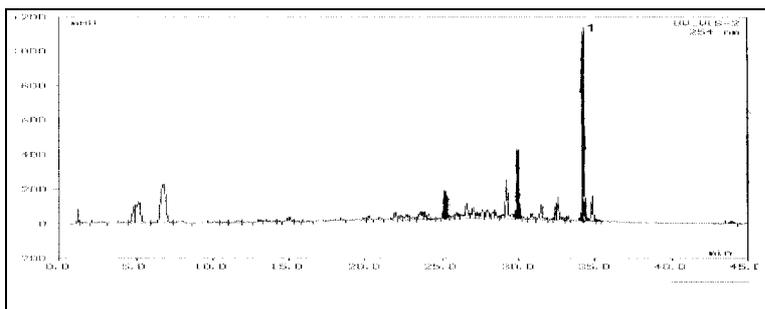
HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Microsphaeropsis* sp.  
 1 = Betaenonderivat (1)  
 2 = Anthrachinin (5)  
 3 = Anthrachinin (7)  
 4 = Anthrachinin (6)  
 5 = Rheoemodin (8)  
 6 = Betaenonderivat (2)



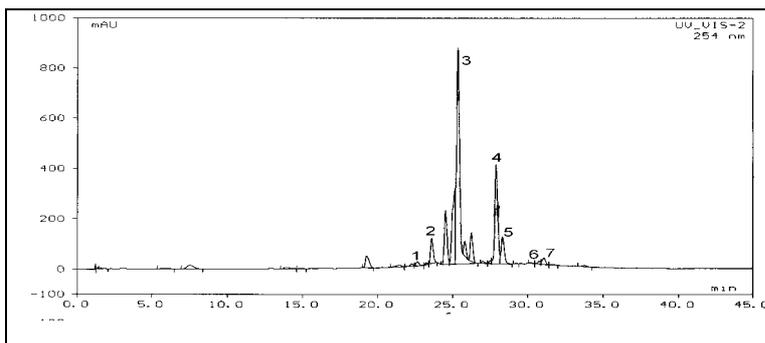
HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Hortaea werneckii*  
 1 = Hortein (9)



HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Cladosporium herbarum*  
 1 = Herbarin B (11)  
 2 = Herbarin A (10)  
 3 = Microsphaeron B (13)  
 4 = Microsphaeron A (14)  
 5 = Citreoviridin (12)

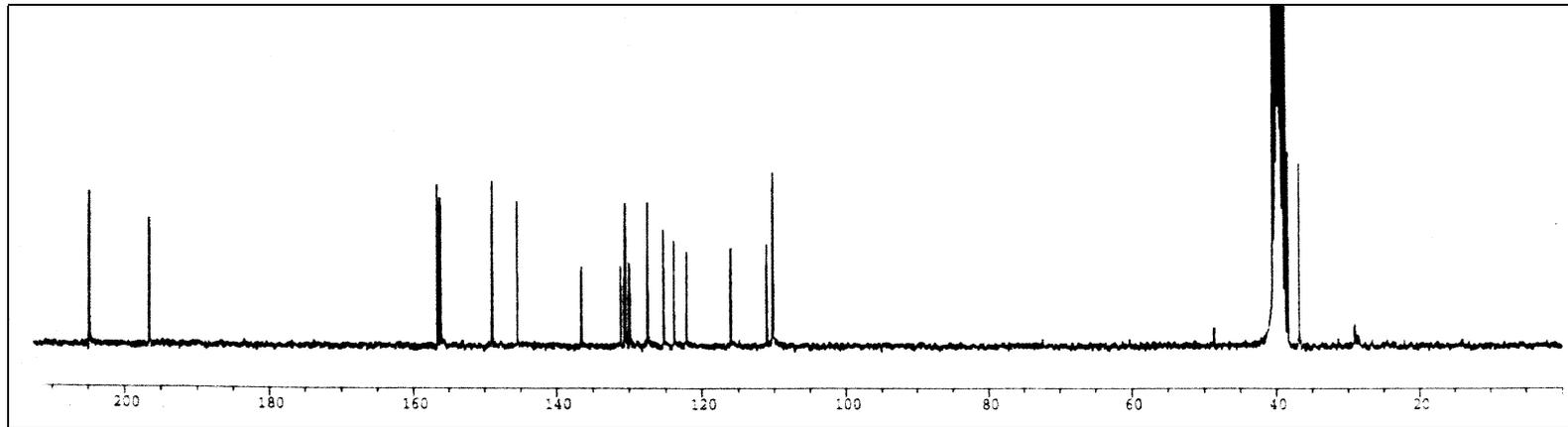


HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Phomopsis* sp.  
 1 = Ascochlorin (15)

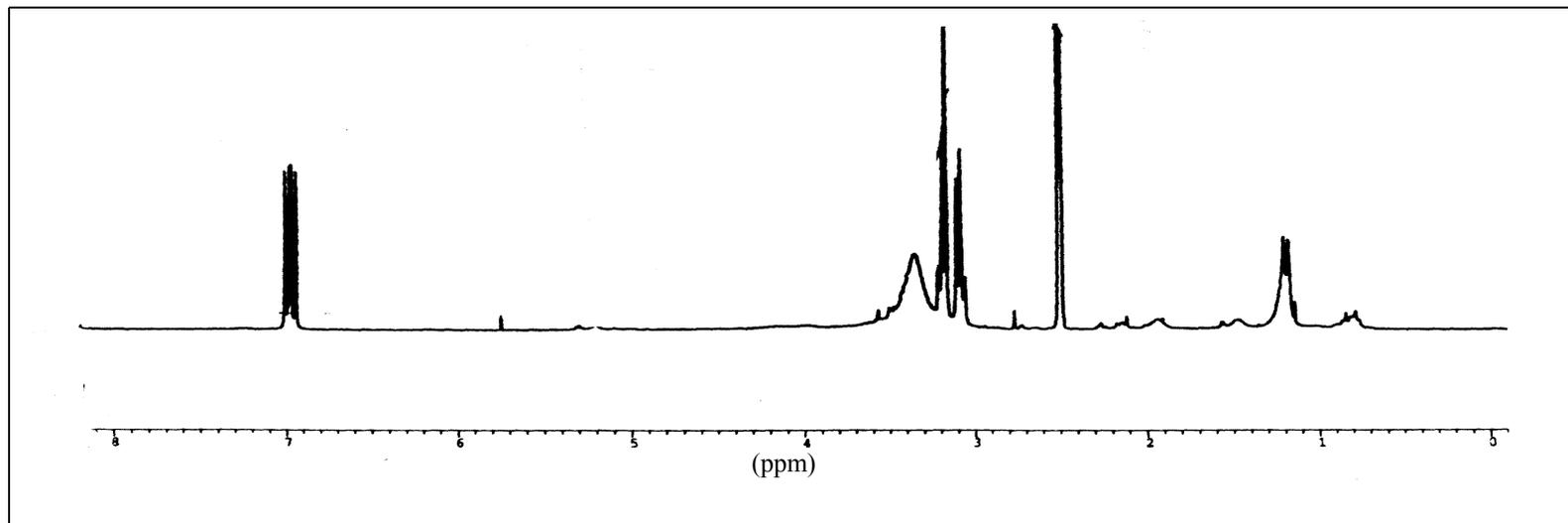


HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Penicillium citreonigrum*  
 1 = PAI 1-5 (20)  
 2 = PAI 1-8 (22)  
 3 = Vermistatin (16)  
 4 = PAI 1-6 (21)  
 5 = Desoxyfunicon (18)  
 6 = Alternariol (17)  
 7 = (-)-Mitorubrin (19)

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Hortein in  $\text{DMSO-}d_6$

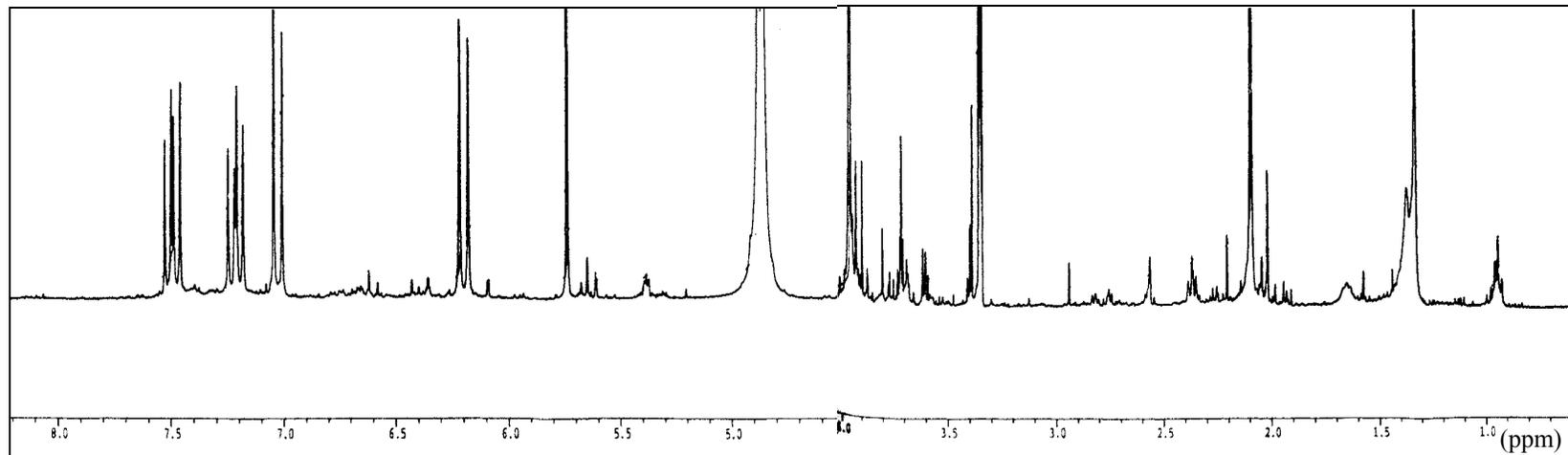
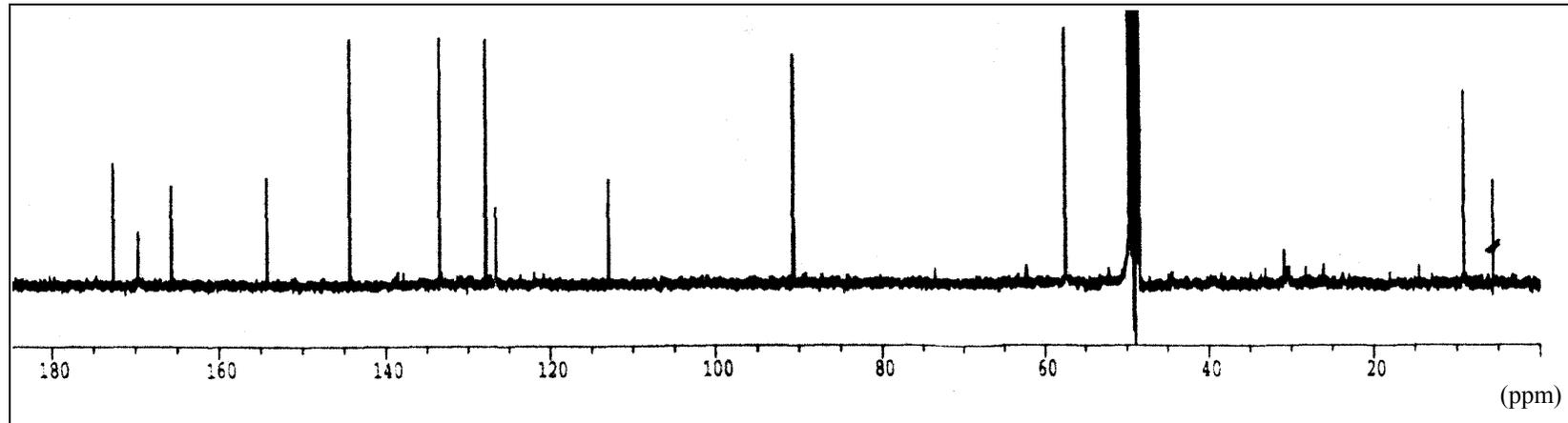


(ppm)

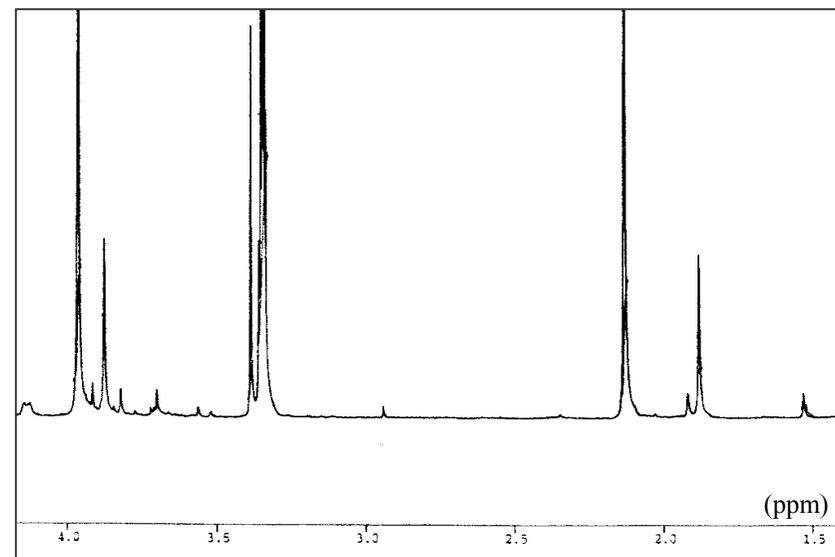
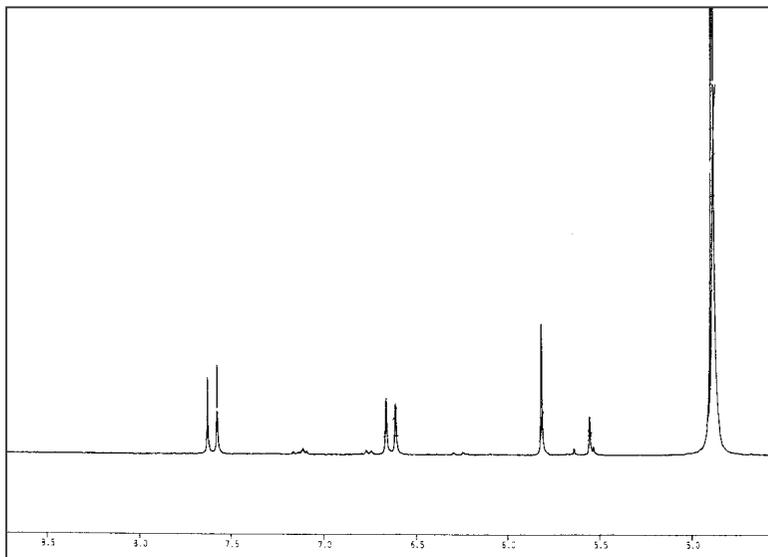
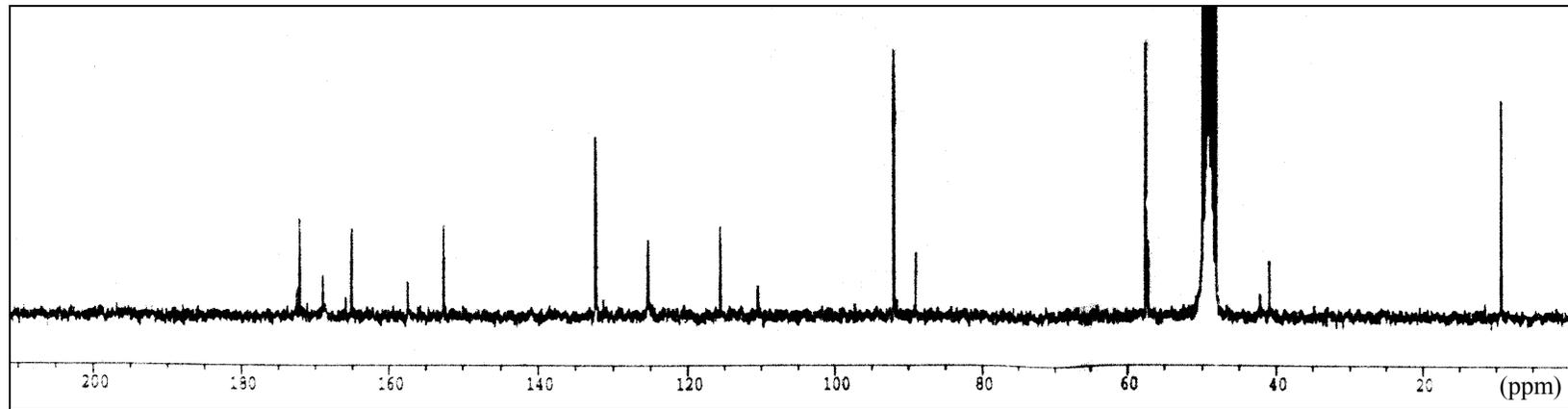


(ppm)

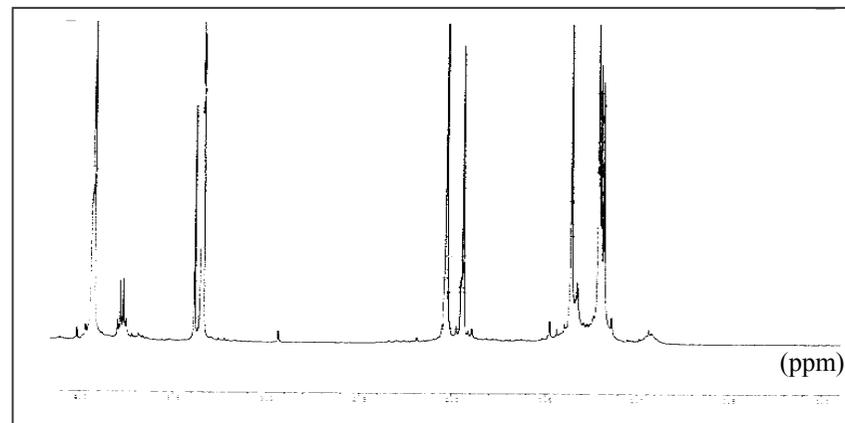
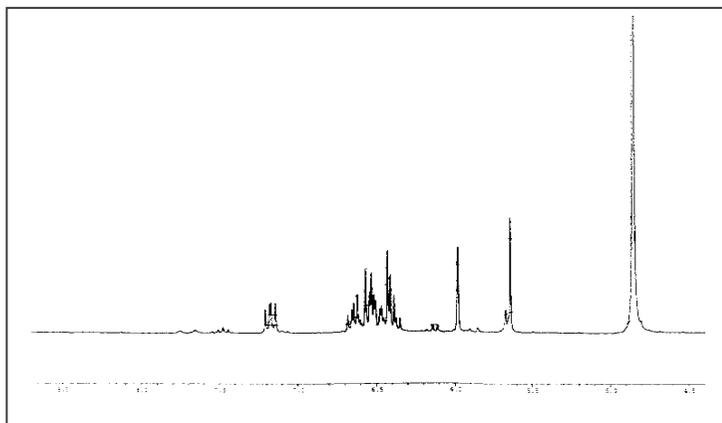
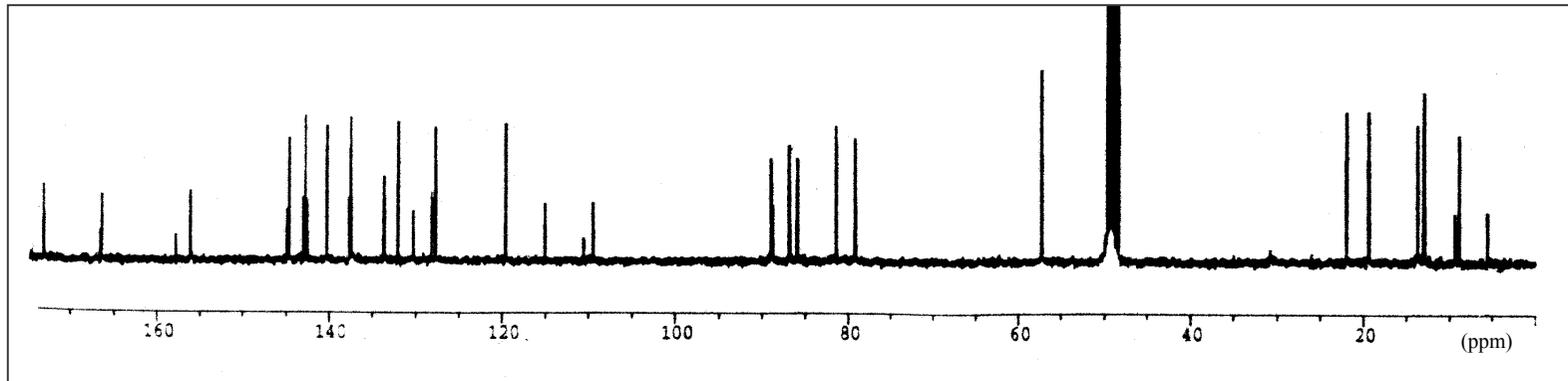
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Herbarin A in  $\text{CD}_3\text{OD}$**



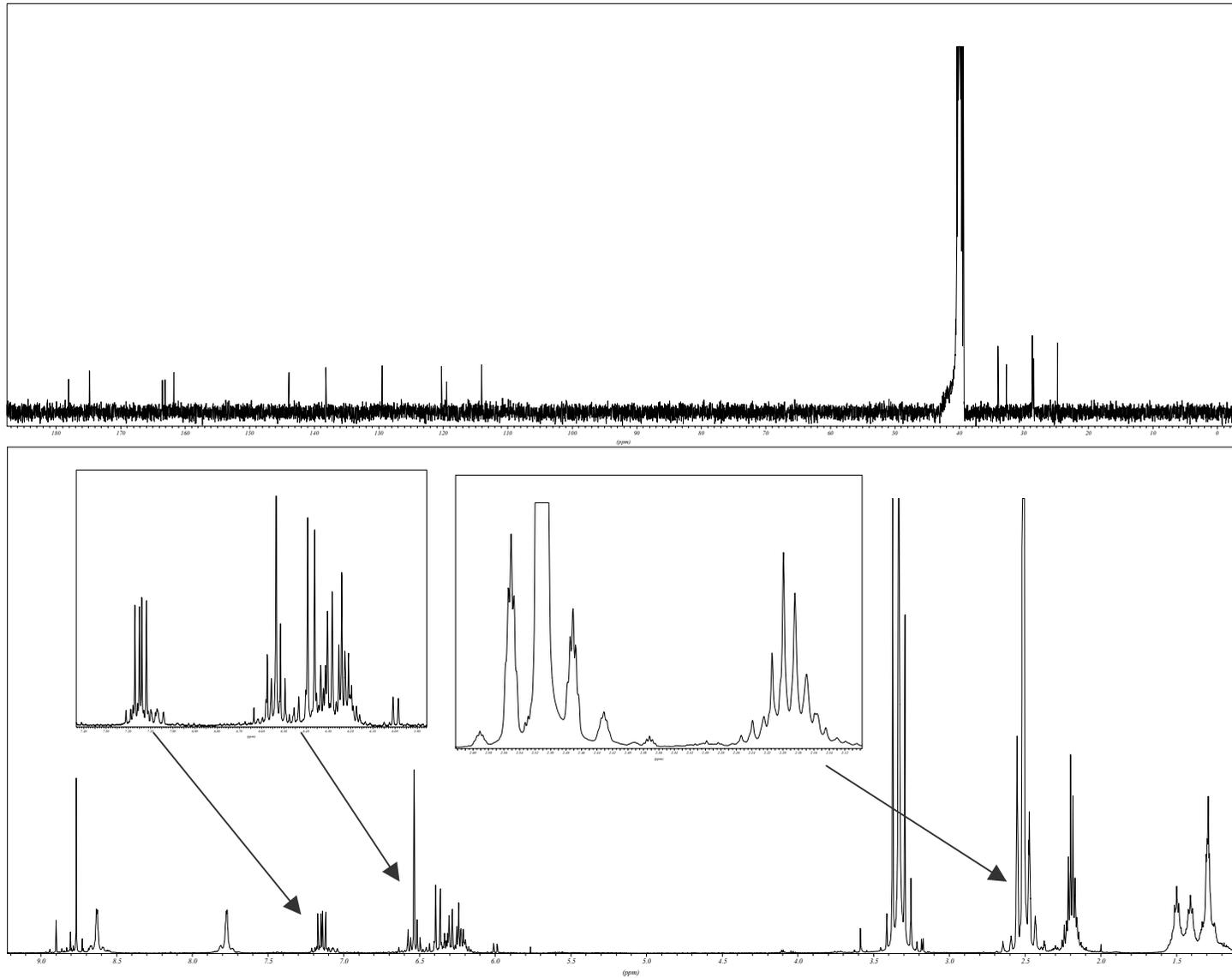
$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Herbarin B in  $\text{CD}_3\text{OD}$



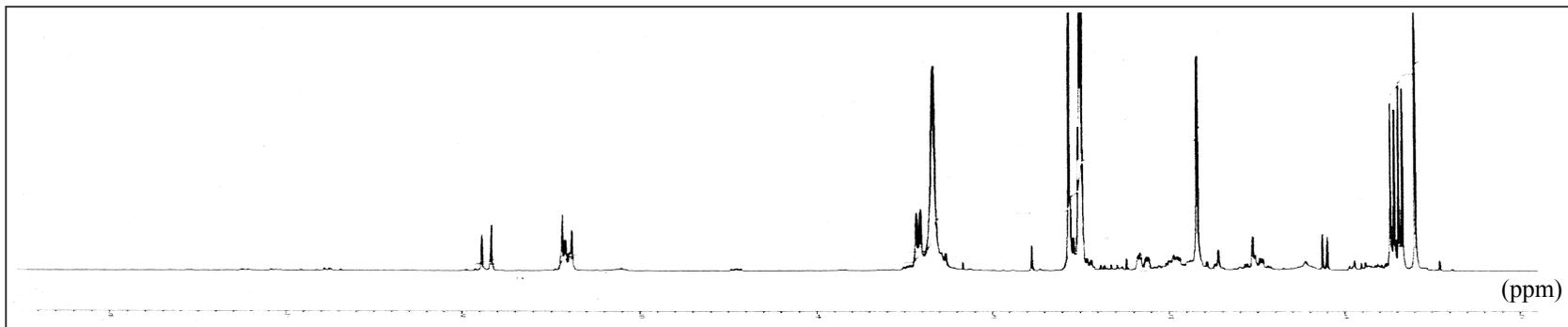
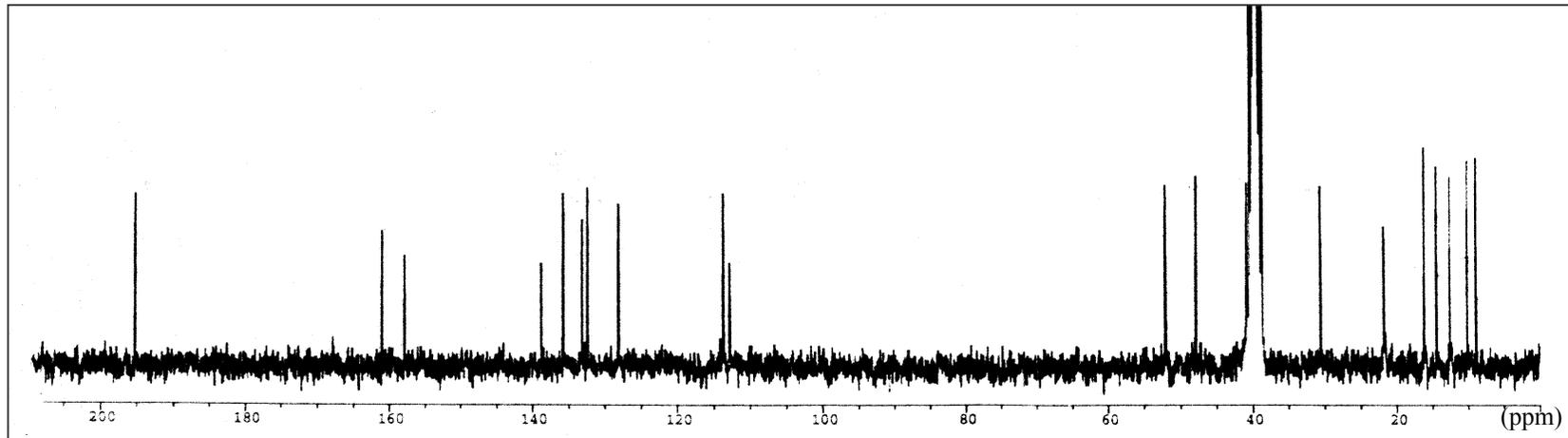
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Citreoviridin in  $\text{CD}_3\text{OD}$**



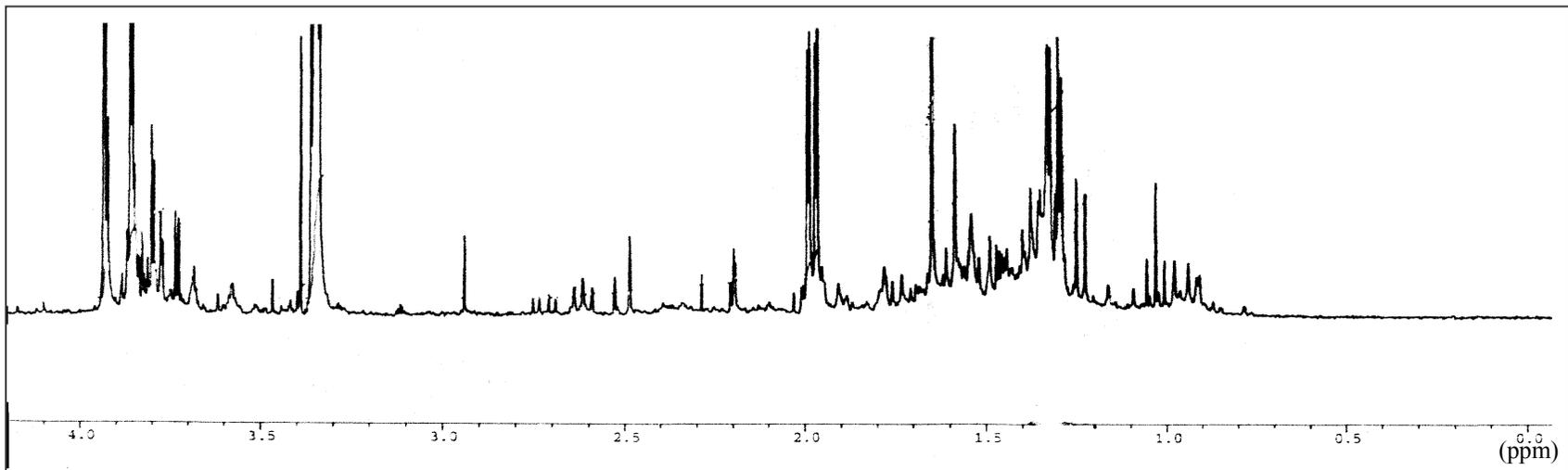
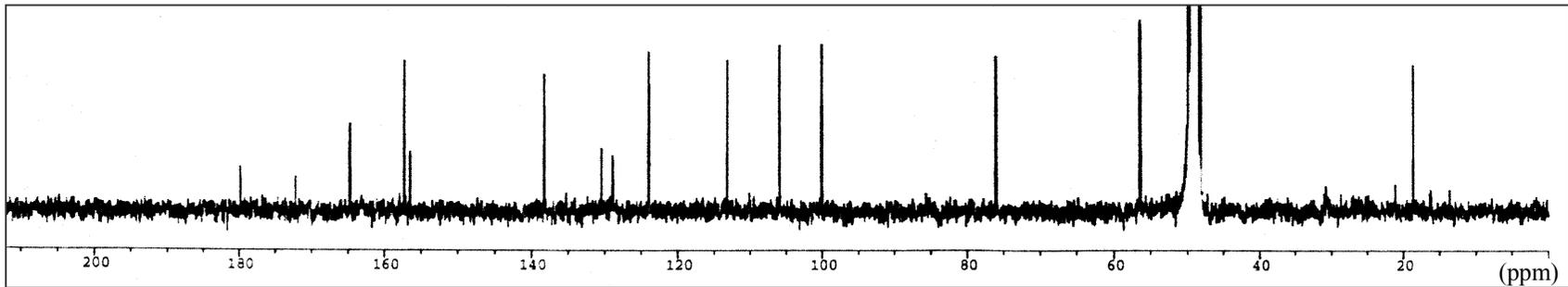
### $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR von Microsphaeron B in $\text{CD}_3\text{OD}$



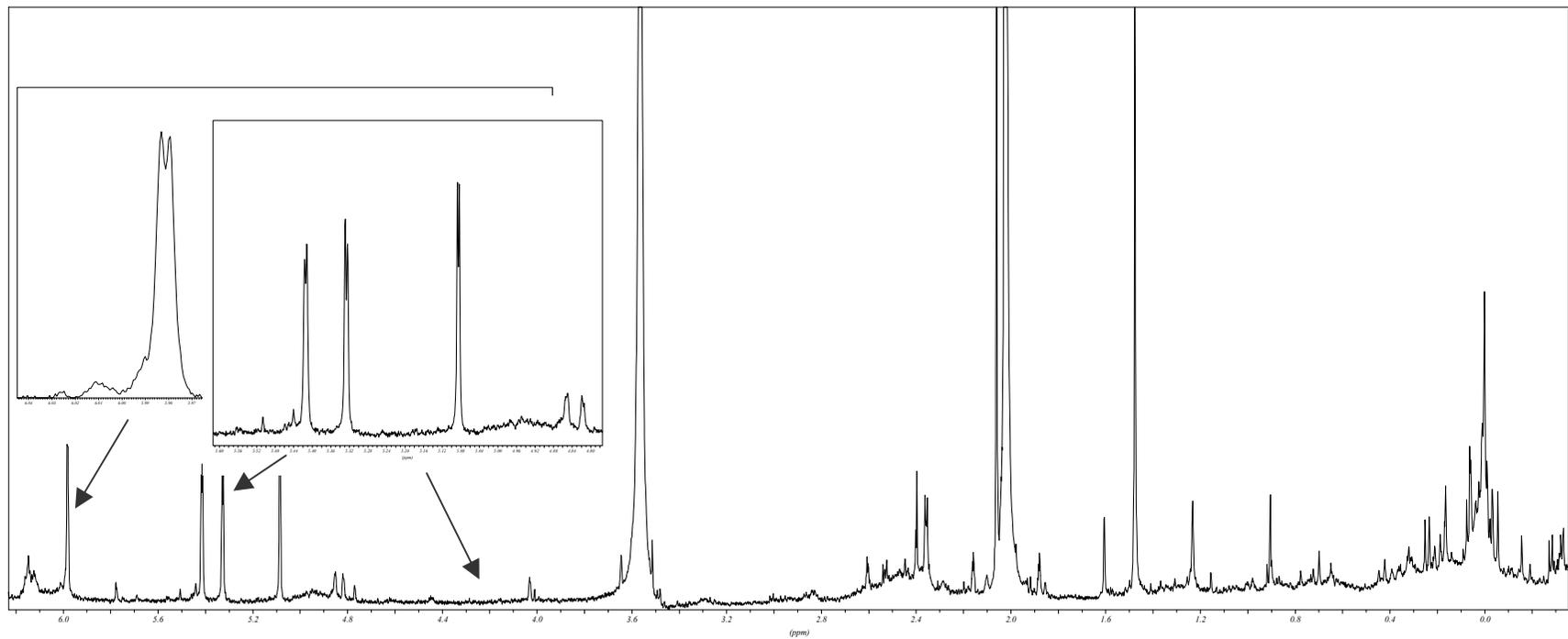
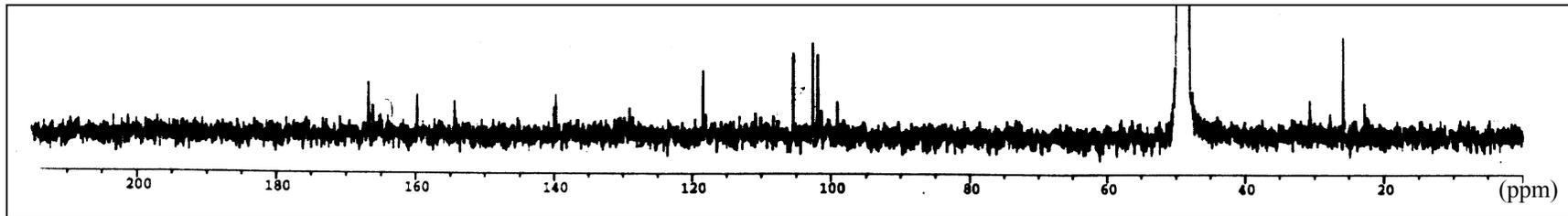
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Ascochlorin in  $\text{DMSO-}d_6$**



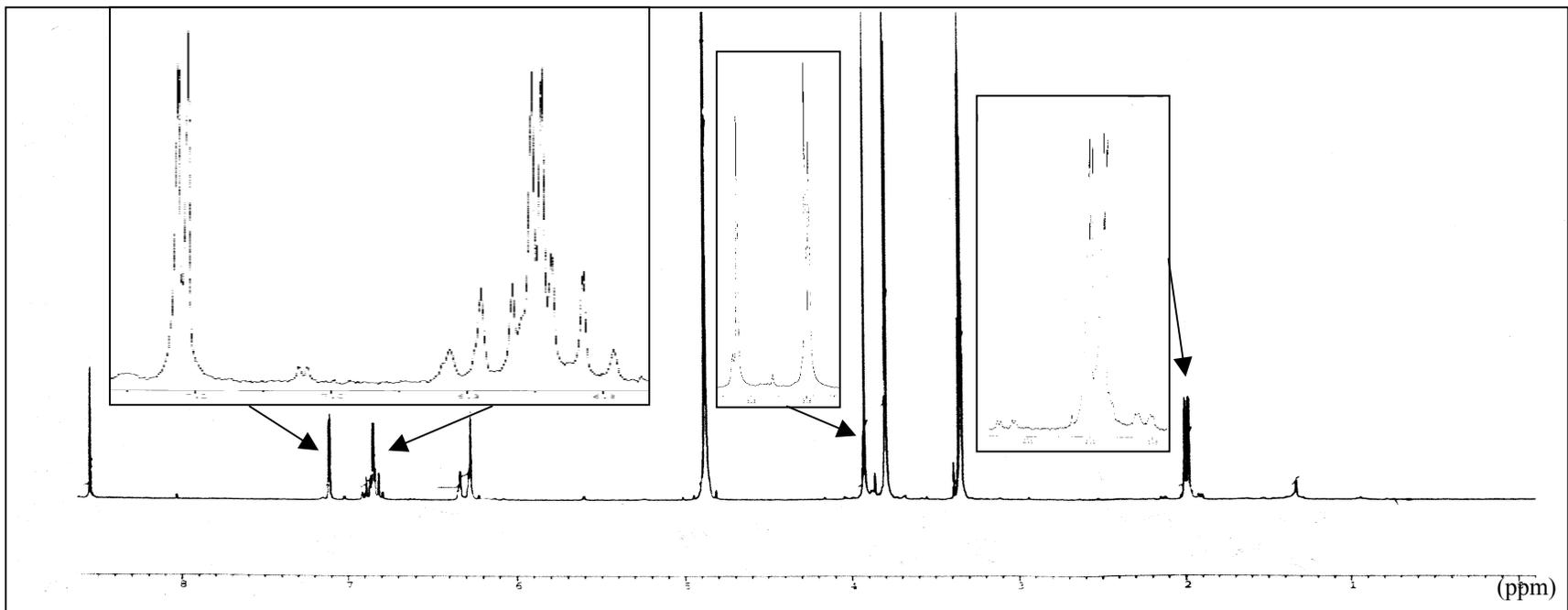
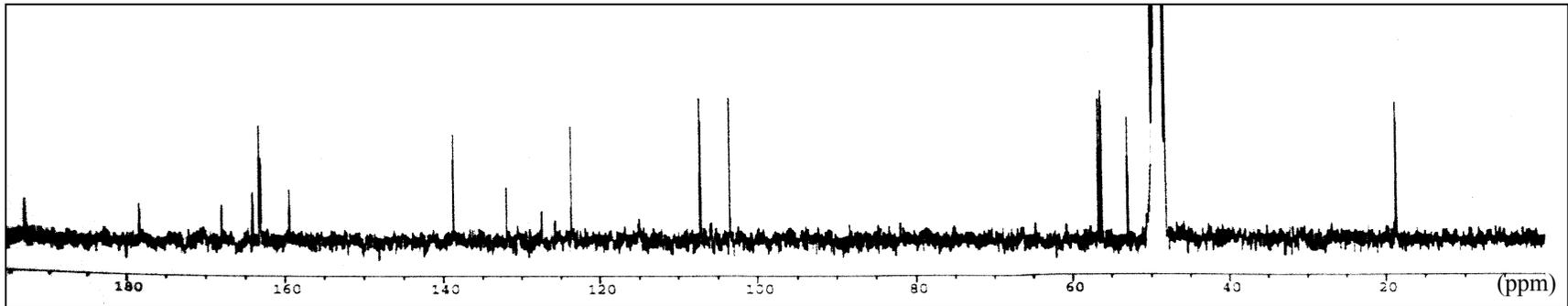
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Vermistatin in  $\text{CD}_3\text{OD}$**



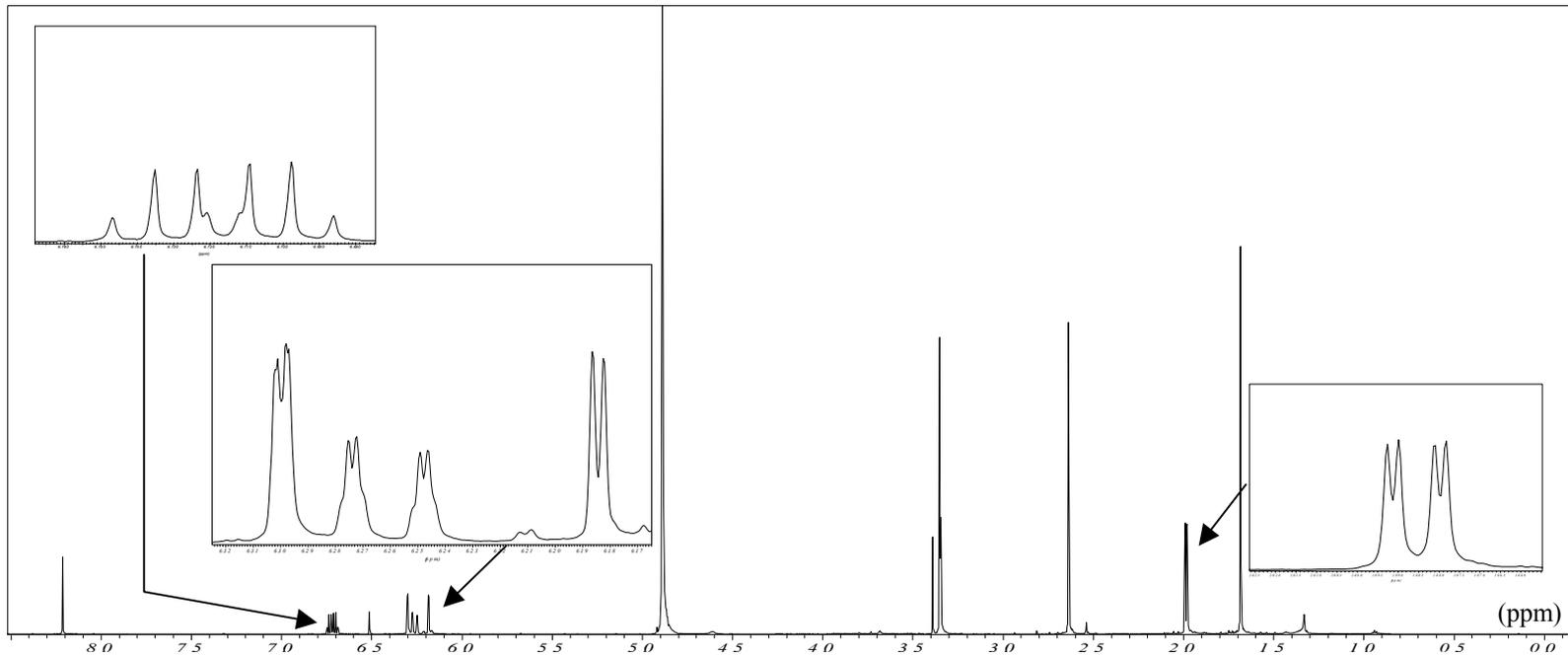
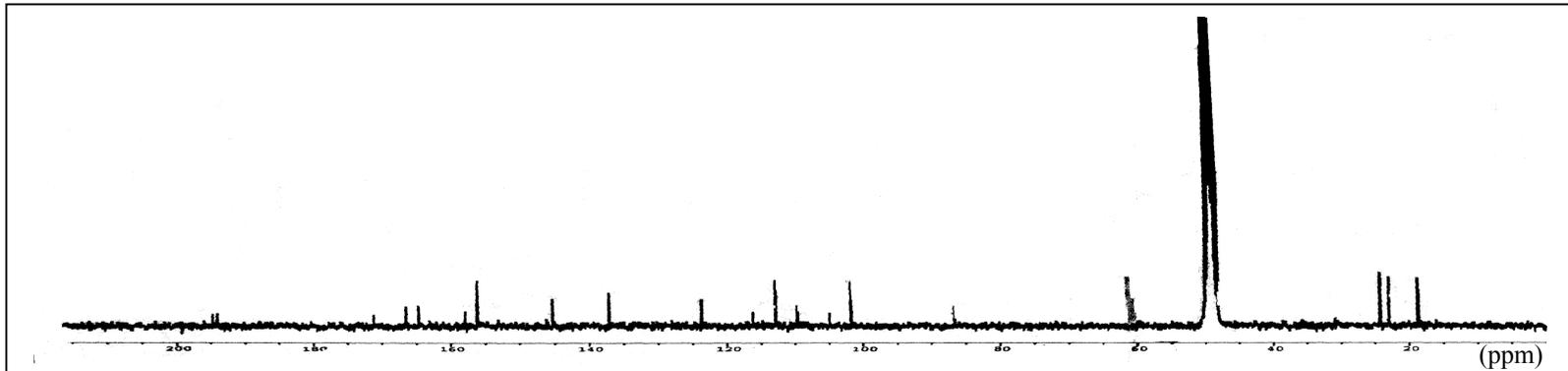
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Alternariol in  $\text{CD}_3\text{OD}$**



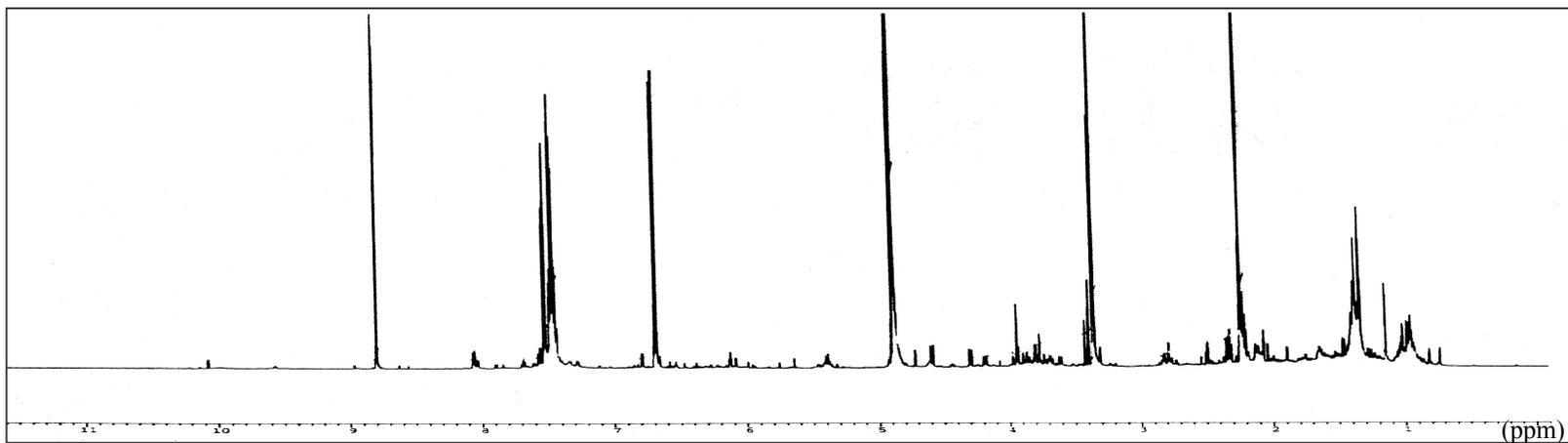
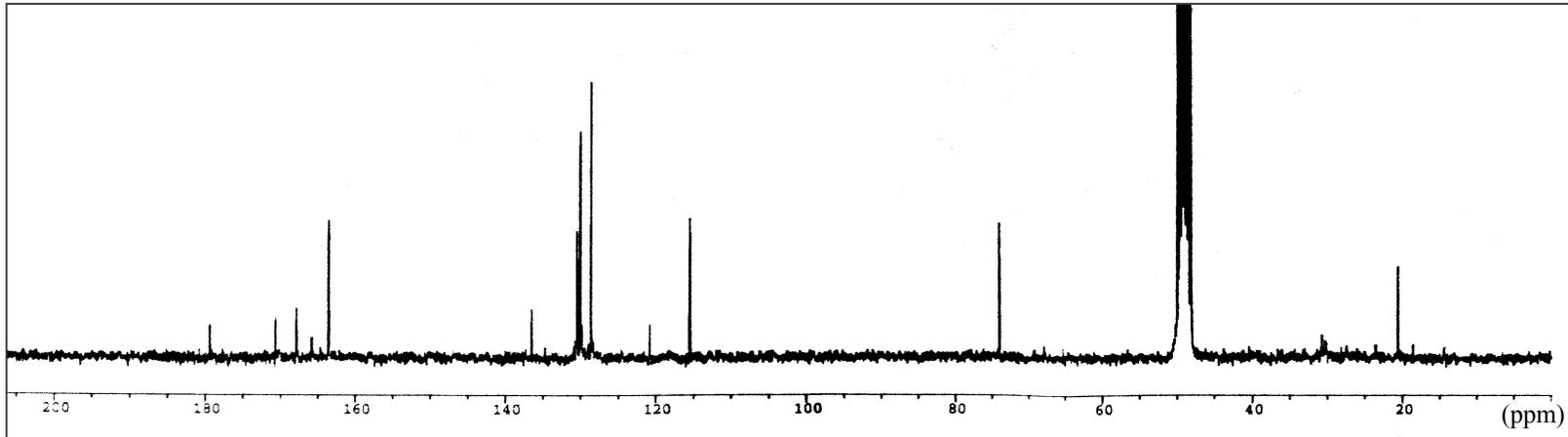
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von Desoxyfunicon in  $\text{CD}_3\text{OD}$**



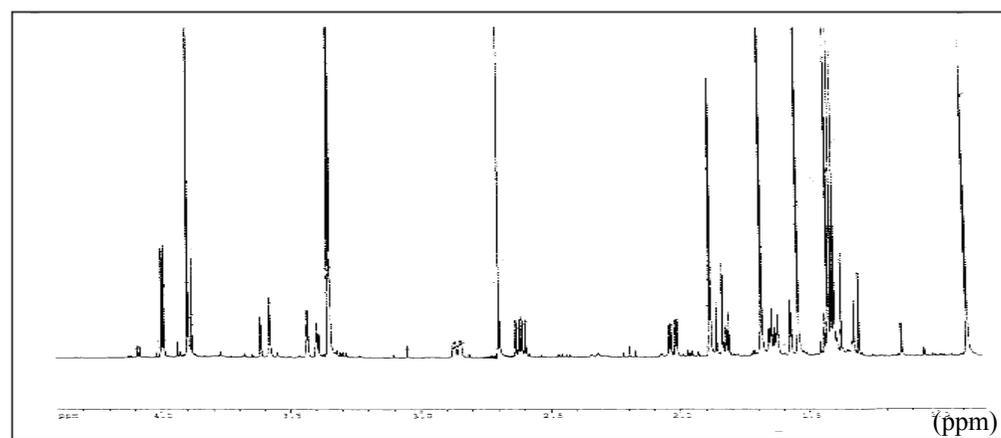
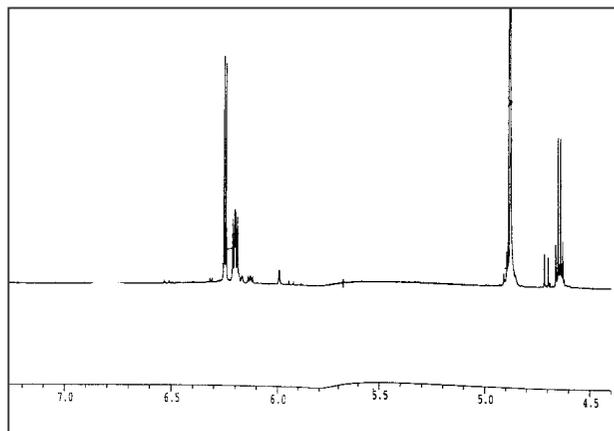
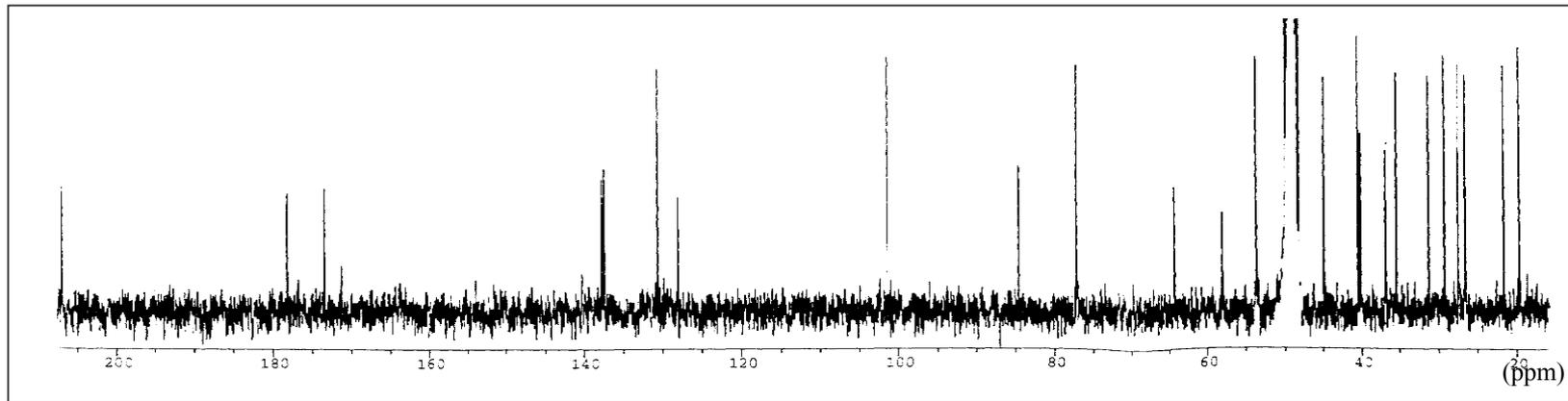
$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von (-) Mitorubrin in  $\text{CD}_3\text{OD}$



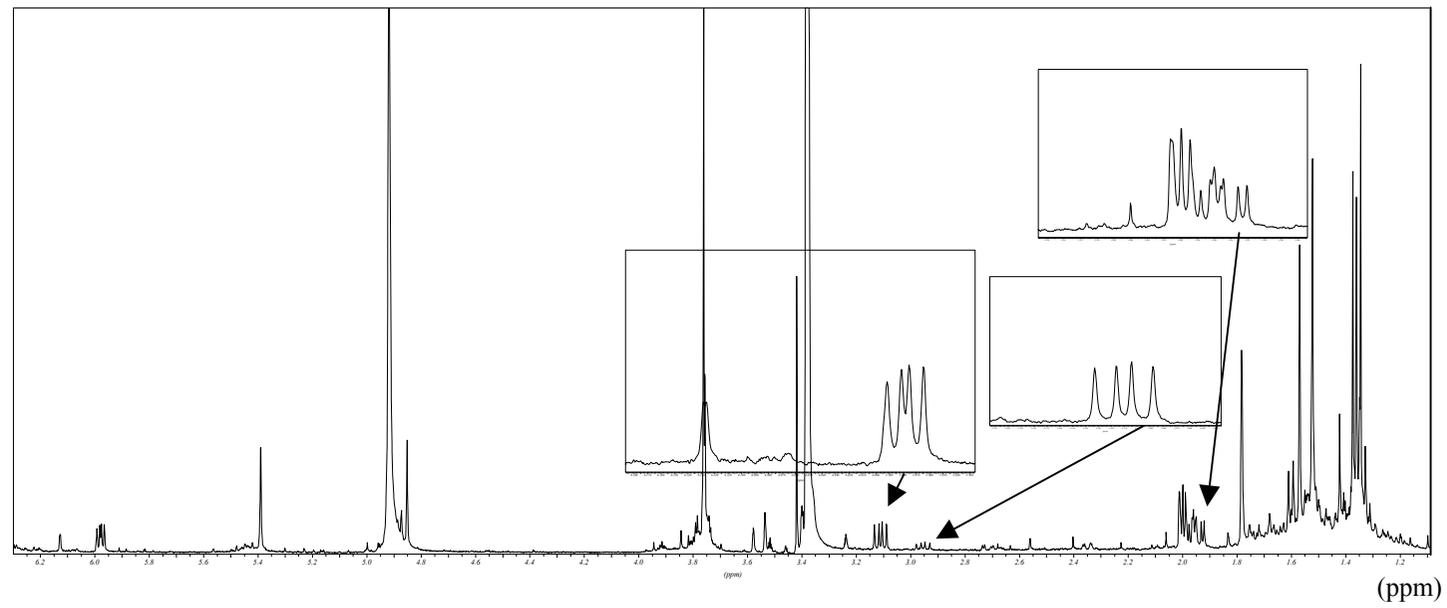
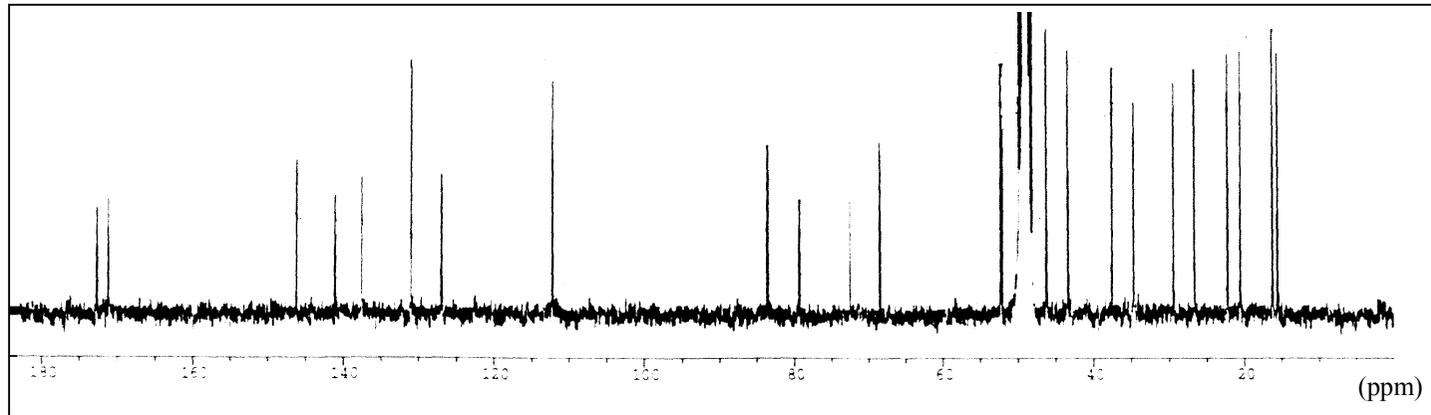
**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von PAI 1-5  $\text{CD}_3\text{OD}$**



**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von PAI 1-6  $\text{CD}_3\text{OD}$**



**$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von PAI 1-8  $\text{CD}_3\text{OD}$**



## 8. Abkürzungen

Aceton- d<sub>6</sub> deuteriertes Aceton

Abb	Abbildung
b	breites NMR- Signal
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
CDCl <sub>3</sub>	deuteriertes Chloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy (i.d.R. ist H,H-COSY gemeint)
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EGMME	Ethylen-glykol-monomethyl-ether
EI	Electron Impact Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt
Fa.	Firma
FAB	Fast Atom Bombardment
FG	Frischgewicht
h	Stunde
g	Gramm

## Abkürzungen

GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
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	Inhibitory Concentration
IR	Infrarot
l	Liter
LC	lethal concentration
LC-MS	HPLC mit Massendetektor
Lsg	Lösung
m	Multiplett
M	Molar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
m/z	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid

## Abkürzungen

NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor of $\kappa$ B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ml	milliliter
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
pH	Wasserstoffionen-Exponent
ppm	part per million
q	Quartett
rel. int.	relative intensity
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase
SC	Säulenchromatographie
s	Singulett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
Vgl.	Vergleich
VLC	Vakuumflüssigkeitschromatographie
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol

## Publikationsliste

Edrada R. A., Wray V., Berg A., Gräfe U., Sudarsono, Brauers G., Proksch P. (2000) Novel spiciferone derivatives from the fungus *Drechslera hawaiiensis* isolated from the marine sponge *Callispongia aerizusa*  
*Z. Naturforsch.* **55c**, 218-221

Brauers G., Edrada R. A., Ebel R., Proksch P., Wray V., Berg A., Gräfe U., Schächtele C., Totzke F., Finkenzeller G., Marme D., Kraus J., Münchbach M., Michel M., Bringmann G., Schaumann K. (2000) Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* Sp.: Novel inhibitors of protein kinases  
*J. Nat. Prod.* **63**, 739- 745

Brauers G., Ebel R., Edrada R. A., Wray V., Berg A., Gräfe U., Proksch P. (2001) Hortein, a new natural product from the fungus *Hortaea werneckii* associated with the sponge *Aplysina aerophoba*  
*J. Nat. Prod.* **64**, 651-655

Wang C. Y., Wang B. G., Brauers G., Proksch P., Ebel R. (2002) *Microsphaerones* A and B, two novel  $\gamma$ -pyrone derivatives from the sponge- derived fungus *Microsphaeropsis* sp.  
*J. Nat. Prod.* **65**, 772-775

Jadulco R., Brauers G., Edrada R. A., Ebel R., Wray V., Sudarsono., Proksch P. (2002) New metabolites from sponge- derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*  
*J. Nat. Prod.* **65**, 730-733

Edrada R. A., Heubes M., Brauers G., Wray V., Berg A., Graefe U., Wohlfarth M., Muehlbacher J., Schaumann K., Sudarsono., Bringmann G., Proksch P. (2002) Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium* cf. *montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*.  
*J. Nat. Prod.* **65**, 1598-1604.

Lin W, Brauers G., Wray V., Berg A., Sudarsono., Proksch P. (2003) Novel chromone derivatives from the fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the marine Sponge *Xestospongia exigua*  
*J. Nat. Prod.* **66**, 57-61

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allerherzlichst bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit quasi irgendwie beigetragen haben.

Allen meinen Kollegen in Würzburg, Düsseldorf, Beijing und sonst wo auf der Welt möchte ich für die gute Zusammenarbeit, interessanter Diskussionen, die zum Glück nicht immer nur mit der Arbeit zu tun hatten, für viele gelungene Feiern und interessante Exkursionen danken.

Besonderer Dank geht an meine Laborleidensgenossen Bärbel, Haofu und Sofia. Danke, dass Ihr mich immer im Labor ertragen habt, und euch nie beschwert habt, wenn meine Unterlagen sich mal wieder sehr weit ausbreiteten. Mögen alle eure Geräte da bleiben wo sie hingehören.

Allerherzlichsten Dank auch an das Team Ru An Edrada und Rainer Ebel. Herzlichen Dank für alle Motivationshilfen, NMR-Knobeleyen, fruchtende Diskussionen, erfolgreiche Wetten, gute Stimmung, Pilzexkursionen und vieles vieles mehr.

Danke auch, dass die Eibe verschont blieb und somit der Welt kein fähiger Wissenschaftler verloren ging.

Jedenfalls mögen für euch die Pilze auch weiterhin sprießen und der Nachwuchs zahlreich sein.

Herzlichen Dank auch an meinen lieben Kollegen Jan, mit dem das Umziehen nach Düsseldorf und alles was danach kam viel viel einfacher für mich wurde. Danke für all die schönen Labortage und die gewonnenen Wetten.

Möge Frankfurt für seinen besten heimlichen Fan wieder guten Fussball spielen.

Großen Dank auch an Franka Teuscher, die sich erfolgreich bemühte, meine Fitness auch während der Arbeit zu erhalten und zu verbessern. Danke auch für die Aufbauarbeit in schwierigen Stunden und für die Fortführung gewisser Schreibtischtraditionen (hoffe ich doch).

Möge er weiter wachsen.

Danke auch an Gero Eck für die beste OFF-ROAD-Kackenkopf (Erst)Besteigung aller Zeiten und für so viele andere gemeinsame Aktivitäten, die einen mal wieder auf andere Gedanken brachten. Dank auch für alle guten Laborratschläge.

Mögen noch viele erfolgreiche Besteigungen folgen

Desweiteren möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Unseren TA's u.a. für den Lösungsmittelservice und all die anderen Arbeiten, die sie immer erledigen und, die es erst ermöglichen produktiv, zu arbeiten.

Ute Hentschel und Anja Friedrich, ohne die unsere wachsende Pilzsammlung vor dem Umzug in Würzburg keine Heimat gefunden hätte.

Albrecht Berg für seine glückliche Hand bei der Kultivierung der untersuchten Pilze in Jena, für seine NMR- und MS-Messungen, die so oft erst zum Durchbruch verhelfen.

Prof. Lin an der Peking University für zwei Monate pures Erlebnis in China. Für bestes Essen, unvorstellbare Gastfreundschaft und für die Hilfe bei allen NMR Fragen, die anfielen.

Außerdem gilt mein Dank:

Prof. van Soest an der Universität in Amsterdam für die Identifizierung der Schwämme

Dr. V. Wray von der GBF in Braunschweig für die Messung vieler NMR-Spektren und für deren Interpretation. Vielen Dank für die Geduld und die vielen, vielen Messungen bei meinen Problemfällen, was eigentlich fast bei jeder Verbindung der Fall war.

Dr. K. Steube von der DSMZ in Braunschweig für die Durchführung der Zytotoxizitätstests bei einigen Reinsubstanzen.

Den Mitarbeitern des NMR-Services am Institut für Anorganische und Strukturchemie der Uni Düsseldorf für die Aufnahme meiner zahlreichen NMR-Spektren.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meinen Eltern bedanken, die stets zu mir gestanden haben und mir diese Arbeit erst ermöglichten. Danke auch für all den Einsatz bei meinen Umzügen, während des Studiums und vor allem für den Einsatz, diese Arbeit ohne Unterbrechungen durchführen zu können. Danke auch meinem Schwesterlein, das mich durch seine Besuche stets auch mal auf andere Gedanken gebracht hat.

Nicht zu vergessen mein Schatz, der mich tagtäglich aufs Neue motiviert und mir immer gekonnt den Kopf zurechtrückt.

## Lebenslauf

Name	Gernot Brauers
Geburtsdatum	13.01.73
Geburtsort	Viersen
Adresse	Am Langen Weiher 8, 40589 Düsseldorf
Schule	
1979-1983	Kath. Grundschule Wetten
1983-1992	Kardinal-von-Galen-Gymnasium, Kevelaer, Abitur
Berufsausbildung	
1993-1998	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius Maximilians Universität in Würzburg, Diplom
1998-1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Julius Maximilians Universität, Würzburg
2000-2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Nov – Dez 2001	Foschungsaufenthalt im National Key Laboratory for Biomimetic and Natural Drugs, Peking University

## Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Isolierung und Strukturaufklärung von neuen Naturstoffen aus schwamm-assoziierten Pilzen" selbst angefertigt habe. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in abgewandelter Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben habe, noch dies versucht habe.

Düsseldorf den 11.12.03

Gernot Brauers