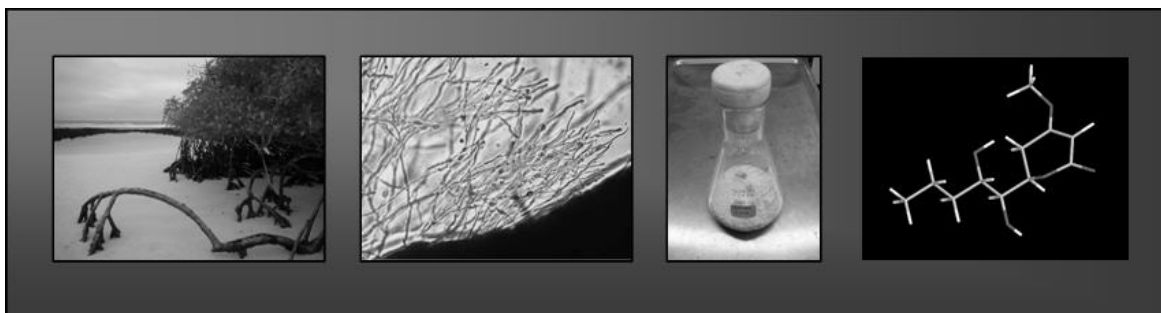


Neue Naturstoffe endophytischer Pilze aus Mangrovenpflanzen – Strukturaufklärung und Bioaktivität



Inaugural-Dissertation

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

David Rönsberg

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Mai 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2013

SCIO NON SCIO.

SOKRATES (~ 460 - 399 V. CHR.)

Inhalt

1	ABSTRACT	7
2	ZUSAMMENFASSUNG	9
3	EINLEITUNG	11
3.1	Arzneistoffe natürlicher Herkunft	11
3.2	Naturstoffe – Physiologie und Bedeutung.....	14
3.3	Naturstoffe als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe	16
3.4	Endophyten.....	18
3.5	Bioaktive Naturstoffe aus Pilzen.....	18
3.6	Quellen endophytischer Pilze.....	20
3.6.1	Mangrovenpflanzen als Quelle von Endophyten.....	20
3.7	Regulierung des Sekundärstoffwechsels endophytischer Pilze	21
3.8	Zielsetzung der Arbeit.....	23
4	PUBLIKATION 1: <i>PESTALOTIOPSIS VIRGATULA</i>	25
5	PUBLIKATION 2: <i>PHOMOPSIS LONGICOLLA</i> I.....	39
6	PUBLIKATION 3: <i>PHOMOPSIS LONGICOLLA</i> II	107
7	DISKUSSION	121
7.1	Isolierte Naturstoffe aus <i>Pestalotiopsis virgata</i>	121
7.1.1	α -Pyronderivate	121
7.1.2	5,6-Dihydro- α -pyrone.....	121
7.2	Isolierte Naturstoffe aus <i>Phomopsis longicolla</i>	123
7.2.1	Polyketide	123
7.2.1.1	Substanzen.....	123
7.2.1.1.1	Endocrocin	123
7.2.1.1.2	Benzophenone.....	123
7.2.1.1.3	Tetrahydroxanthenon-Verbindungen	124
7.2.1.1.4	Phomo-2,3-dihydro-chromon.....	125
7.2.1.1.5	Phomocyclinon.....	125
7.2.1.1.6	α -Pyrone.....	125
7.2.1.2	Biosynthese der Polyketide.....	125
7.2.2	Phenolsäuren.....	128
7.2.2.1	Benzoessäurederivate.....	128
7.2.2.2	4-Hydroxyphenylelessigsäure	128
7.2.2.3	Biosynthese einfacher Phenolsäuren.....	129
7.2.3	Steroide	129
7.2.4	2,3,5-Trihydroxypalmitinsäure	130

7.3	Semisynthetische Hydrolyseprodukte.....	131
7.3.1	Hydrolyseprodukt I, II und III	131
7.3.2	Hydrolyseprodukt IV.....	132
7.3.3	Deacetylphomoxanthon A.....	133
7.4	Struktur und Wirkung – Die Bedeutung des Tetrahydroxanthenon-Gerüsts für die Bioaktivität.....	134
7.5	Zytotoxizität und Immunstimulation als dualer Wirkansatz	135
8	LITERATURVERZEICHNIS	137
9	WISSENSCHAFTLICHE LEISTUNG	148
9.1	Publikationen.....	148
9.2	Poster.....	148
10	ABKÜRZUNGEN	149
11	DANKSAGUNG.....	151
12	ERKLÄRUNG.....	154

1 Abstract

Nowadays, the search for new drugs from natural sources is more efficient than ever, due to modern analytical methods and in-depth knowledge of physiological mechanisms. The increasing risk for rapid development of resistance towards established drugs and its consequences make this search essential particularly in the fields of antibiotics and anticancer therapy. During the last few decades, endophytic fungi evolved as a goldmine providing bioactive secondary metabolites with unique chemical scaffolds and potential pharmacological activities. Of particular interest are endophytic fungi from plants, which are able to survive in extreme conditions such as drought, salinity, heat or cold, and with a variety of competing organisms living in their natural habitats. Interestingly, endophytes take part in this competition by the biosynthesis of special natural products which defend their hosts against predators or competitors. These facts make endophytes from extreme environments, which include mangroves very interesting in the search for new bioactive compounds.

In this dissertation, different endophytic fungi were isolated from mangrove plants and cultured under defined conditions (temperature, light delivery, duration of growth, culture medium). These cultures were then extracted with organic solvents. Using modern chromatographic techniques, the extracts were fractionated and finally purified into their individual components. Then, the chemical structures, including absolute and relative configurations of the isolated pure substances were established on the basis of extensive spectroscopic analyses including 1D, 2D NMR, MS, CD, and OR. Overall, in this work 25 secondary metabolites were isolated, of which 11 are identified as new natural products. Additionally, five natural product derived compounds were gained. To determine the bioactivity, the isolated compounds were then subjected to various biological and chemical assays, examining their antibiotic, antitumor, immunostimulatory, insecticidal and/or radical scavenging activity(ies). In the present dissertation, results already published in scientific journals or submitted for publication, are presented in the form of the respective manuscripts:

Pestalotiopsis virgatula

The fungal strain *P. virgatula*, isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*, yielded eight substances, from which five are new natural products. All of the isolated substances belong to the class of pyrones and showed no remarkable activity in the conducted bioassays.

Phomopsis longicolla I

An EtOAc extract of the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* obtained from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris* and cultured on solid rice medium, was examined. The chromatographic separation of the extract yielded three new together with five known secondary metabolites. All compounds were tested for cytotoxic and immunomodulatory activity, among which the tetrahydroxanthene dimers were highly potent. The most bioactive natural product, phomoxanthone A, was subjected to chemical derivatization reactions, to establish preliminary structure-activity relationships based on the bioassay results of those derivatives. Furthermore, the absolute stereochemistry of the compound that has been published in 2005 could be revised by new studies.

Phomopsis longicolla II

In this manuscript, a chemical investigation of the EtOAc extracts of the endophytic fungal strain *Phomopsis longicolla*, was carried out affording a sum of ten compounds from both solid rice and solid bean culture media. Among the isolated compounds, three new natural products were identified; all of them were purified from the fungus when cultivated on solid rice medium. Preliminary bioactivity screenings with extracts and fractions showed that the compounds produced by the fungus grown on solid rice were more effective than those from the bean culture extracts, which was confirmed by detailed single component conducted bioassays, including cytotoxicity (MTT) assay, insecticidal and antimicrobial assays. Two natural products, one of which is a polyketide and the other one a steroid, showed strong cytotoxic activity.

2 Zusammenfassung

Die Suche nach neuen Arzneistoffen aus natürlichen Quellen gestaltet sich heutzutage aufgrund moderner analytischer Methoden sowie der umfassenden Kenntnis physiologischer Mechanismen effizienter als je zuvor. Die wachsende Gefahr der raschen Resistenzentwicklung gegenüber etablierten Arzneistoffen und ihr teilweise starkes Nebenwirkungspotential machen diese Suche besonders im Rahmen der Antibiotika- und der Antitumorthherapie unabdingbar. Bioaktive Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen bilden dabei einen Schwerpunkt der Naturstoffforschung. Von besonderem Interesse sind endophytische Pilze aus pflanzlichen Quellen, die in der Lage sind unter extremen Bedingungen wie Trockenheit, hoher Salinität, Hitze oder Kälte und mit einer Vielzahl an konkurrierenden Organismen, die ihren natürlichen Lebensraum miteinander teilen müssen, zu überleben. Insbesondere Endophyten nehmen an diesem Konkurrenzkampf durch die Biosynthese besonderer Naturstoffe teil. Diese Tatsachen machen Endophyten aus solchen Umgebungen, zu denen beispielsweise Mangrovenwälder gehören, bei der Suche nach neuen bioaktiven Verbindungen besonders interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene endophytische Pilze aus Teilen von Mangrovenpflanzen isoliert und unter festgelegten Bedingungen (Temperatur, Lichtzufuhr, Wachstumsdauer, Kulturmedium) kultiviert. Aus diesen Kulturen wurden anschließend mit organischen Lösungsmitteln Pilz-Extrakte hergestellt, die durch moderne chromatographische Verfahren in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt wurden. Die chemischen Strukturen der isolierten Reinsubstanzen konnten dann mittels ihrer gemessenen Spektraldaten (NMR, MS, CD, OR) aufgeklärt werden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 25 Sekundärstoffe isoliert, von denen 11 neue Naturstoffe darstellen. Darüber hinaus konnten neben einer bekannten Verbindung auch vier neue von Naturstoffen abgeleitete Substanzen gewonnen und isoliert werden. Zur Bestimmung der Bioaktivität wurden die Substanzen daraufhin verschiedenen biologischen und chemischen Testsystemen unterzogen und dabei auf ihre antibiotische, tumorhemmende, immunmodulatorische, insektizide und/oder radikalfangende Aktivität untersucht. In der vorliegenden Dissertation werden die in wissenschaftlichen Fachjournalen veröffentlichten oder zur Publikation eingereichten Ergebnisse in Form der jeweiligen Manuskripte dargestellt:

Pestalotiopsis virgatula

Pestalotiopsis virgatula aus der Mangrovenpflanze *Sonneratia caseolaris* lieferte acht Substanzen, von denen fünf neue Naturstoffe darstellen. Sämtliche aus diesem Pilz

isolierte Substanzen gehören der Substanzklasse der Pyrone an und zeigten in den durchgeführten Bioassays keine bemerkenswerte Aktivität.

Phomopsis longicolla I

Es wurde ein Extrakt des auf festem Reismedium kultivierten Pilzes *Phomopsis longicolla*, der aus der Mangrovenpflanze *Sonneratia caseolaris* isoliert wurde, untersucht. Die chromatographische Trennung des Extraktes lieferte drei neue Sekundärstoffe und fünf bekannte natürliche Verbindungen. Die isolierten Verbindungen wurden in verschiedenen Bioassays auf ihre Zytotoxizität und immunomodulatorische Aktivität untersucht, wobei die Substanzen, die durch ein Tetrahydroxanthenon-Grundgerüst charakterisiert sind, besonders wirksam waren. Der bekannte und besonders bioaktive Naturstoff Phomoxanthon A wurde zusätzlich chemischen Derivatisierungsreaktionen unterworfen, um nach Auswertung der Biotestergebnisse der Derivate erste Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen machen zu können. Des Weiteren konnte die bereits 2005 publizierte absolute Stereochemie der Verbindung durch neue Untersuchungen revidiert werden.

Phomopsis longicolla II

Die Extrakte des endophytischen Pilzstammes *Phomopsis longicolla* aus der Mangrovenpflanze *Sonneratia caseolaris*, lieferten insgesamt zehn Verbindungen. Der Pilz wurde dabei zur Untersuchung der Effekte verschiedener Nährböden auf das Spektrum an gebildeten Sekundärmetaboliten getrennt auf den beiden festen Medien Reis und Bohnen kultiviert. Unter den isolierten Verbindungen wurden drei neue Naturstoffe identifiziert, die alle aus dem Extrakt des auf Reis kultivierten Pilzes aufgereinigt werden konnten. Vorausgehende Bioaktivitäts-Screenings mit Extrakten und Fraktionen haben gezeigt, dass die Verbindungen der Extrakte des auf Reismedium kultivierten Pilzes wirksamer sind, als die der Bohnenkultur-Extrakte. Die Untersuchung der biologischen Aktivität umfasste Zytotoxizitätstests sowie die Untersuchung der antimikrobiellen und insektiziden Aktivität. Zwei der isolierten Naturstoffe – ein Polyketid sowie ein Steroid – zeigten starke zytotoxische Wirkungen.

3 Einleitung

3.1 Arzneistoffe natürlicher Herkunft

Zu jeder Zeit der kulturgeschichtlichen Entwicklung der Menschheit wurden natürliche Quellen – zumeist pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Ursprungs – verwendet um Heilmittel herzustellen. Erst waren es die Schamanen und Medizinmänner der frühen Naturvölker, dann die Ärzte der Antike und die Klostermönche im Mittelalter, die im Verlauf von Jahrhunderten der Naturbeobachtung mit der Zeit umfangreiche Erkenntnisse zum Gebrauch von pflanzlichen, tierischen und mineralischen „Stoffen“ sammelten und diese an folgende Generationen weitergaben. Fossilienfunde datieren die erste belegbare menschliche Nutzung von Pflanzen als Arzneimittel zurück bis in die mittlere Altsteinzeit vor etwa 60000 Jahren (Wolters, 1999). Die ältesten, schriftlichen und noch zumindest in Teilen erhaltenen Überlieferungen, in denen die Verwendung natürlicher Heilmittel Erwähnung findet, sind ägyptische Schriftrollen (Papyrus Ebers, um 1600 v. Chr.) und Tontafeln aus dem alten Orient (um 1500 v. Chr.) (Helmstädter, 2011). Ebenfalls aus dieser Epoche stammen Orakelknochen, in die die chinesischen Gelehrten aus der Zeit der Shang-Dynastie Listen natürlicher Arzneien einritzten (Keightley, 1978). Auch die heilige Schrift der Bibel enthält einen großen Teil an Vorschriften und Hinweisen zur Verwendung heilender Kräuter, Wurzeln und Harze (Allgeier, 1987).

Einige Jahrhunderte später griffen die griechischen Gelehrten der Antike dieses überlieferte Wissen wieder auf und schufen die Grundlagen der wissenschaftlichen Medizin und medizinischen Ethik. In der, nach dem wohl bekanntesten griechischen Arzt der Antike Hippokrates (um 460 bis 370 v. Chr.) benannten, Textsammlung *Corpus hippocraticum* finden sich neben medizinischen und diätetischen Vorschriften auch viele Beschreibungen zur Verwendung pflanzlicher Heilmittel bei diversen Krankheiten (Artelt, 1968). Das wohl erste umfassende Heilpflanzenkompendium *Materia medica* von Dioscurides (um 40 bis ca. 90 n. Chr.) beschreibt 1000 pflanzliche, tierische und mineralische Heilmittel (Dioscurides, 1996). Von ganz besonderer Bedeutung und prägend für die nächsten 14 Jahrhunderte der Pharmaziegeschichte sollte allerdings der griechische Leibarzt des römischen Kaisers Marcus Aurelius werden: Galenos von Pergamon (um 130 bis ca. 210 n. Chr.), ferner unter dem Namen Galen bekannt. Sein bis ins Spätmittelalter gültiges Werk *Methodi medendi* ist als erstes Arzneibuch anzusehen und basiert auf den antiken Grundvorstellungen der hippokratischen Viersäftelehre (Helmstädter, 2011).

Der Untergang des weströmischen Reiches sowie der damit verbundene Übergang von der Antike zum Mittelalter fielen mit der Entstehung des Christentums

zusammen. Krankheiten galten fortan als gottgewollt und wurden demnach als göttliche Strafe angesehen, in die der Mensch nicht eingreifen dürfe (Leven, 2008). Die Ausübung von Medizin wurde als Ketzerei verfolgt und bestraft (Amundsen, 1996). In einer Zeit der kulturellen, politischen und wissenschaftlichen Unruhen waren es die christlichen Klöster, die Enklaven der Wissenschaft und der Bildung blieben. Der als „Vater des abendländischen Mönchtums“ bekannte Benedikt von Nursia (um 480 bis 547) hatte in seinen Ordensregeln bestimmt, dass sich jeder Mönch auch dem Lesen und Schreiben zu widmen habe. In den Klöstern konnten unter anderem antike Werke über Heilpflanzen aufbewahrt, gelesen und sogar handschriftlich vervielfältigt werden, was die Klostermedizin erst ermöglichte. Dass medizinisches Handeln ganz in Sinne der christlichen Nächstenliebe sei, wird erstmals im Lorscher Arzneibuch (um 795) durch Bezugnahme auf Bibelstellen gerechtfertigt und somit die theologische Abkehr von der praktizierten Medizin überwunden (Stoll, 1992). Mit den von Gott gegebenen Heilmitteln und dem durch den Heiligen Geist vermittelten Wissen durften fortan Kranke behandelt werden. Dass nun im mittelalterlichen Abendland wieder Medizin betrieben werden durfte, hatte nicht nur positive Folgen für die Gesundheit der Bevölkerung. Zwar wuchs das anatomische und physiologische Wissen rasch an, doch Galen und die Viersäftelehre beherrschten immer noch das Denken und Handeln praktizierender Ärzte maßgeblich. So waren das Schröpfen und der Aderlass, Einleitungen sowie die Gabe starker Drastika oder Emetika übliche Therapeutika um die „schädlichen Säfte“ aus dem Körper zu leiten. Der schweizerische Arzt, Naturwissenschaftler und Philosoph Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493 bis 1541), genannt Paracelsus sorgte mit seinen Überlegungen und Thesen für einen Umbruch. Er war der Überzeugung, dass die Ursachen von Krankheiten nicht auf Störungen der Ausgewogenheit der vier Körpersäfte beruhen, sondern auf den Menschen umgebenden Einflüssen. Der von ihm geprägte Leitsatz „Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist“ und der Glaube an die Signaturenlehre bekräftigten ihn darin auch in hochgradig toxischen Substanzen wie Quecksilber, Arsen, Blei oder Antimon Heilmittel zu finden. So hat er zwar nach Jahrtausenden der Gültigkeit der Viersäftelehre ein Umdenken eingeleitet, jedoch auch irrtümlicher Weise Behandlungsmethoden vorangetrieben, die man aus heutiger Sicht als katastrophal und stark gesundheitsschädlich beschreiben muss. Im Spätmittelalter und bis in die Neuzeit hinein waren selbst große politische Persönlichkeiten und Künstler nicht sicher vor den zweifelhaften Therapien ihrer Leibärzte (Cheatham, 2008; Ludewig, 2006). Auch hier regte sich Widerstand, einer der Gegner der so genannten heroischen Medizin war der deutsche Arzt und Übersetzer Samuel Hahnemann (1755-1843). Da er die Gabe hoher Dosen giftiger Stoffe nicht billigen wollte, suchte er nach der jeweils geringsten noch wirksamen

Dosis verschiedenster pflanzlicher und tierischer Ausgangssubstanzen und begründete im Laufe des frühen 19. Jahrhunderts die Lehre der Homöopathie.

Im Laufe der wissenschaftlichen Weiterentwicklung dieses 19. Jahrhunderts konnten schon bald einzelne Inhaltsstoffe aus Pflanzen und anderen Organismen isoliert und untersucht werden. Die Entdeckung des Morphins durch den deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner gilt heute als Meilenstein und Beginn der Phytochemie (Hartmann, 2007). Die Tatsache, dass die Wirkung einer pflanzlichen Droge auf einen einzelnen Stoff zurückführbar ist, sorgte für großes Aufsehen und kurbelte die Naturstoffforschung an. Im Laufe der folgenden Jahre wurden weitere bis in die heutige Zeit arzneilich bedeutende Naturstoffe wie z.B. Atropin, Chinin, Kokain oder Digitoxin gewonnen. Mittlerweile setzt sich die wissenschaftliche Arbeit mit Naturstoffen aus vielen Disziplinen zusammen. Ausgehend von der Phytochemie erweiterte sich das Forschungsfeld der Naturstoffe zunächst um die organische Synthesechemie. Ein klassisches Beispiel ist die chemische Derivatisierung des natürlichen, aus der Weidenrinde gewonnenen Salicins zur Acetylsalicylsäure, die erstmals 1899 durch die Firma Bayer vermarktet wurde (Lafont, 2007). Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde es durch moderne mikrobiologische Verfahren wie die Fermentationstechnik, Biochemie, Molekularbiologie und Gentechnologie möglich große Fortschritte bei der Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneimittel der naturwissenschaftlich orientierten Medizin zu erzielen.

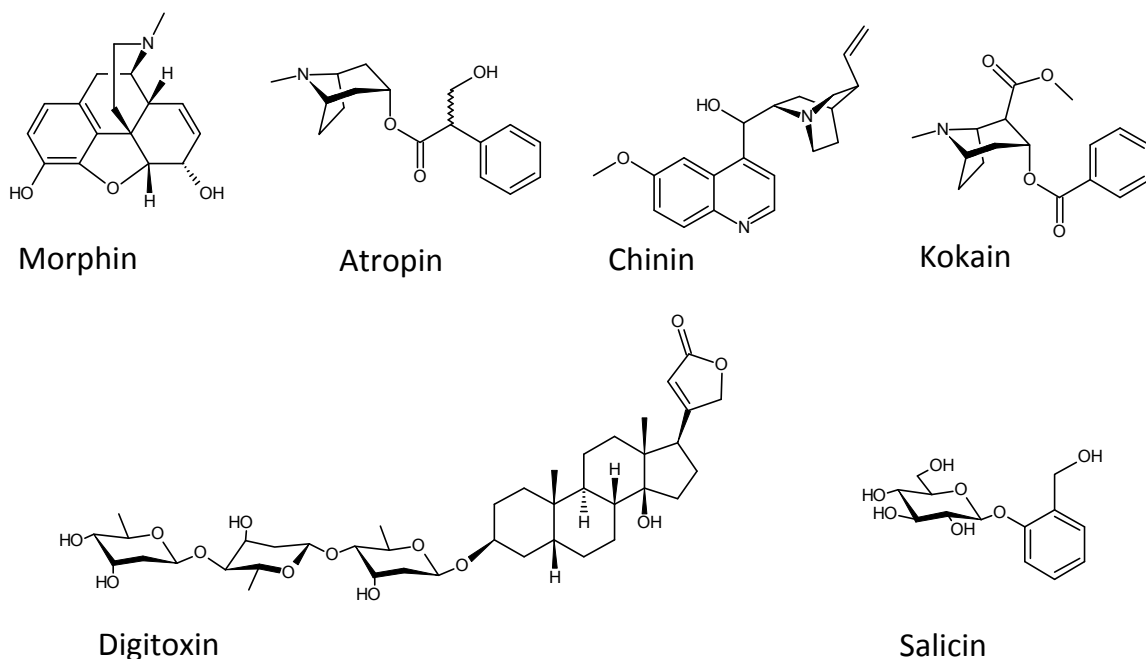


Abbildung 3.I: Strukturen bis heute wichtiger Pflanzeninhaltsstoffe der frühen Naturstoffforschung.

3.2 Naturstoffe – Physiologie und Bedeutung

Der Primär- oder Grundstoffwechsel ist in der Hauptsache bei allen Lebewesen gleich. In ihm werden für jede lebende Zelle unverzichtbare Substanzen wie Peptide, Kohlenhydrate, Fette und DNS-Bausteine umgesetzt. Im Gegensatz dazu bildet der mit dem Grundstoffwechsel stark verzahnte Sekundärstoffwechsel verschiedenste Strukturen, die keine direkte Funktion im Zellstoffwechsel haben und auch keine Rolle als Energiespeicher spielen (Libbert, 1993). Zum Teil sind solche sekundären Metabolite auch sehr beschränkt verbreitet und spezifisch für bestimmte Familien, Gattungen oder sogar Arten. Heutzutage sind über eine Million Naturstoffe bekannt, darunter etwa 500000 bis 600000 pflanzliche und über 50000 von Mikroorganismen produzierte Substanzen (Berdy, 2005). Sekundärstoffe zeichnen sich neben ihrer strukturellen Vielfalt auch durch ein hohes Maß an funktionellen ökologischen oder physiologischen Wirkungen aus. Zu diesen Funktionen zählen unter anderem die Schutzwirkung vor pathogenen Mikroorganismen oder Fraßfeinden, Schutz vor UV-Strahlung, Verdunstungsschutz, Insekten-Attraktion im Sinne der Bestäubung, mechanische Festigung als Zellwandbestandteil bzw. als Exogerüst und hormonelle Regulation innerhalb oder zwischen den Organismen (Nuhn, 2006; Schlee, 1982). So absorbieren Flavonoide bestimmte Bereiche der UV-Strahlung und schützen damit das empfindliche Erbgut und Proteine pflanzlicher Zellen. Cutin sorgt in Verbindung mit anderen Sekundärstoffen in der Cuticula für den Verdunstungsschutz der Pflanzen. Zellwachstum und Geschlechtsentwicklung werden durch bestimmte Phytohormone wie die Gibberelline gesteuert. Ein Beispiel für Organismen, die Sekundärstoffe zur chemischen Abwehr konkurrierender Lebewesen bilden, findet sich in der Meereswelt. Fouling ist in marinen Gewässern ein allgegenwärtiges Phänomen, das das Wachstum verschiedener Tiere und Pflanzen (z.B. Bakterien, Protozoen, Algen, Wirbellose) auf künstlichen oder natürlichen Oberflächen, so möglicherweise auch auf Schwämmen, beschreibt. Schwämme (Porifera, latein. *porus*=Öffnung, *ferre*=tragen) sind sessile Organismen, die ihre Nahrung durch Filtration des Meerwassers aufnehmen. Für sie wäre ein Überwuchern durch fremde Organismen lebensbedrohlich, da dadurch die feinen Poren und Kanäle verstopft würden. Bemerkenswerter Weise sind die Oberflächen gesunder Schwämme in der Regel frei von Fouling-Organismen, obgleich sie aufgrund ihrer Unbeweglichkeit und dadurch bedingter physischer Wehrlosigkeit optimale Wirte für Epibionten darstellen. Durch eine Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Schwämme Naturstoffe produzieren, die Fouling an ihren Oberflächen unterbinden sowie solche, die als Fraßschutz dienen (Fusetani, 2004; Paul *et al.*, 2011; Putz und Proksch, 2009).

Toxine, die der chemischen Abwehr gegen andere Organismen dienen, können auch für die Produzenten selbst toxisch sein, so dass in der Natur verschiedene Mechanismen vorkommen, um den jeweiligen Organismus vor einer Selbstvergiftung zu schützen. Zum einen besteht die Möglichkeit solche Stoffe in speziellen Geweben oder Zellen anzureichern, so dass eine Freisetzung erst bei Gewebeerstörung erfolgt. Ein Beispiel hierfür sind die lysigenen Ölbehälter in der Schale von Zitrusfrüchten. Das ätherische Öl schreckt Vögel und andere Tiere ab die Schale zu verletzen um an das Innere der Früchte zu gelangen.

Die Biosynthese nicht zwingend benötigter Substanzen ist für jeden Organismus jedoch mit energetischem und substantiellem Aufwand verbunden. Daher verlaufen auch viele chemische Abwehrmechanismen hochdynamisch. In solchen Fällen kann eine Stressinduktion (z.B. durch Gewebeerstörung oder mikrobiellen Befall) die Umwandlung konstitutiv vorhandener Vorstufen (Protoxine) zu Toxinen hervorrufen (Alves *et al.*, 2007; Bezemer *et al.*, 2004; Marak *et al.*, 2002; Mraja *et al.*, 2011; Putz und Proksch, 2009). Auch die *de-novo*-Biosynthese von Abwehrsubstanzen (sog. Phytoalexinen) als Reaktion auf eindringende Mikroorganismen ist in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben (Heil und Bostock, 2002; Reichling, 2009; Thaler *et al.*, 2012). Substanzen, die einen solchen Stressreiz und die damit verbundene Freisetzung bestimmter Sekundärstoffe auslösen, bezeichnet man als Elicitoren (Reichling, 2009). Da sich bei jedem der genannten Systeme Vorteile (z.B. sofortige Verfügbarkeit, Energieersparnis) aber auch Nachteile (z.B. hoher Energieaufwand, verzögerte biochemische Antwort) ergeben, liegen bei den entsprechenden Organismen meist mehrere Mechanismen gleichzeitig vor.

Organismen nutzen das Potential der Naturstoffe jedoch nicht nur um sich vor physikalisch-chemischen Einflüssen oder anderen Lebewesen zu schützen, sondern auch um andere Lebewesen zu jagen bzw. zu befallen. Die ichthyophagen Kegelschnecken der Gattung *Conus* sind giftige Raubtiere. Sie besitzen einen ausgefeilten Giftapparat in Form eines harpunenähnlichen Giftzahns, mit dem sie kurzkettige Peptide, sog. Conotoxine, in ihre Beute injizieren und diese damit lähmen. Es ist bekannt, dass die meisten Kegelschnecken ihre Gifte zum Beutefang als auch zur Verteidigung nutzen (Olivera, 1997).

Ein weiteres Beispiel für Sekundärstoffe als Mittel zur Attacke anderer Lebewesen sind die sog. Statine, die in Schlauchpilzen (z.B. *Penicillium citrinum* (Endo *et al.*, 1976)) aber auch in Ständerpilzen (z.B. Austernpilz (Schneider *et al.*, 2011)) vorkommen. Statine hemmen kompetitiv das Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase und damit die Biosynthese von Saponinen in der Wirtspflanze (Yang *et al.*, 2010). Aufgrund des Fehlens der antimikrobiellen Saponine ist die Pflanze damit anfällig für einen Befall durch die Pilze.

3.3 Naturstoffe als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe

Seit dem Durchbruch in der Naturstoffforschung mit der Isolierung des Morphins aus Opium durch Sertürner sind isolierte Reinsubstanzen bei der Entwicklung moderner Arzneimittel nicht mehr wegzudenken. Naturstoffe stellen nach wie vor eine große Basis für neue Arzneistoffe dar und das immer noch große Interesse der Medizin und Naturwissenschaften an bioaktiven Stoffen aus der Natur zur Entwicklung neuer Arzneimittel zeigt, dass dieses Gebiet noch längst nicht erschöpfend erforscht ist (vgl. u.a.: (Butler, 2008; Demain und Vaishnav, 2011; Gerwick und Moore, 2012; Knight *et al.*, 2003; Mann, 2002; Mishra und Tiwari, 2011; Newman und Cragg, 2007, 2009, 2009; Pettit, 2009)). Dies erklärt sich unter anderem durch die Art und Weise wie Naturstoffe produziert werden. Im Vergleich zu den Möglichkeiten der organischen Synthesechemie steht der Natur eine Fülle an Enzymen zur Verfügung, die hochspezifische Reaktionen katalysieren (Firn und Jones, 2003). Da die zum Teil hochkomplexen, natürlichen Wirkstoffe nur schwer vollsynthetisch in stereochemisch reiner Form herzustellen sind und sich die Bioaktivität zweier Stereoisomere sehr stark unterscheiden kann, ist die Wahrscheinlichkeit den wirksameren Bestandteil in Reinform ohne vorherige Kenntnis seiner genauen Struktur „im Reagenzglas“ herstellen zu können sehr gering. Dass Naturstoffe von solch großer Bedeutung sind, hängt auch mit dem Phänomen der Biodiversität, in dem sich die Wechselwirkungen zwischen Organismen und ihrer belebten und unbelebten Umwelt ausdrücken, zusammen. Durch die Fähigkeit bestimmte Naturstoffe produzieren zu können, brachte der Evolutionsprozess den jeweiligen Organismen Vorteile und erhöhte ihre Wettbewerbsfähigkeit im Kampf um ihr Überleben (Gray *et al.*, 2012; Mishra und Tiwari, 2011). So sind bestimmte Naturstoffe durch zum Teil sehr spezifische Bioaktivitäten gekennzeichnet. Butler teilt die Substanzen grundsätzlich in drei Kategorien ein: Naturstoffe (NS), partialsynthetische Naturstoffe und von Naturstoffen abgeleitete Substanzen (Butler, 2008). Diese Klassifizierung zeigt, dass Naturstoffe in der Arzneistoffentwicklung auch als strukturelle Ideengeber dienen. Mit modernen Methoden weiterer naturwissenschaftlicher Disziplinen wie Gentechnik, Biopharming, organischer Synthesechemie und computergestützter Wirkstoffentwicklung ist man in der Lage natürliche Sekundärstoffe chemisch zu modellieren, um so beispielsweise die Effektivität zu steigern oder das Nebenwirkungspotential zu senken (Gray *et al.*, 2012; San Feliciano *et al.*, 2012).

Zwischen 2005 und 2010 wurden weltweit 19 auf Naturstoffen basierende Arzneistoffe zugelassen, von denen sieben als Naturstoffe, zehn als partialsynthetische Naturstoffe und zwei als von Naturstoffen abgeleitete

Arzneistoffe klassifiziert werden können. Tabelle 3.I führt die in diesem Zeitraum auf dem europäischen, US-amerikanischen und/oder japanischen Markt neu zugelassenen Arzneimittel auf (Mishra und Tiwari, 2011).

Tabelle 3.I: Auf Naturstoffen basierende Arzneimittel zwischen 2005 und 2010; Leitstruktur, Klassifikation und Krankheitsbild. (modifiziert, nach Mishra und Tiwari, 2011)

Jahr	Handelsname	Leitstruktur	Klassifikation	Krankheitsbild
2005	Sativex®	Dronabinol/Cannabinol	NS	Analgesie
2005	Flisint®	Fumagillin	NS	Microsporidiose
2005	Finibax®/Doribax™	Thienamycin	NS abgeleitet	Antibiotikum
2005	Tygacil®	Tetrazykline	partialsynth. NS	Antibiotikum
2005	Prialt®	Ziconotid	NS	Analgesie
2005	Endeavor™	Sirolimus	partialsynth. NS	Immunsuppressivum bei med. Herzimplantaten
2006	Eraxis™/Ecalta™	Echinocandin	partialsynth. NS	Antimykotikum
2006	Byetta®	Exenatid	NS	Diabetes
2007	Vyvanse™	Amphetamine	NS abgeleitet	ADHS
2007	Altabax™/Altargo™	Pleuromutilin	partialsynth. NS	Antibiotikum
2007	Torisel™	Sirolimus	partialsynth. NS	Onkologie
2007	Yondelis™	Trabectedin	NS	Onkologie
2007	Ixempra™	Epothilon	partialsynth. NS	Onkologie
2008	Relistor®	Naltrexon	partialsynth. NS	Analgesie
2009	Afinitor®	Sirolimus	partialsynth. NS	Onkologie
2009	Vibativ™	Vancomycin	partialsynth. NS	Antibiotikum
2009	Istodax®	Romidepsin	NS	Onkologie
2009	Qutenza®	Capsaicin	NS	Analgesie
2010	Cayston™	Aztreonam	partialsynth. NS	Antibiotikum

Das erste aus *Cannabis sativa* L. gewonnene und nach modernen Standards zugelassene Fertigarzneimittel ist 2005 unter dem Handelsnamen Sativex® zur Therapie chronischer Schmerzen auf den US-amerikanischen Markt gekommen (Mishra und Tiwari, 2011). Die Erstzulassung in Deutschland konnte Sativex® dagegen erst im Mai 2011 nach einer Änderung des Betäubungsmittelgesetzes erhalten (Bundestag, 2011). Die wirksamen Bestandteile (Cannabinoide) wirken als partielle Agonisten am menschlichen Endocannabinoid-System und können damit die Wirkung der Endocannabinoide nachahmen, wodurch beispielsweise die Wirkung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat reduziert werden kann. 2005 wurde auch das aus dem Schlauchpilz *Aspergillus fumigatus* isolierte Fumagillin unter dem Handelsnamen Flisint® in Frankreich zur Therapie der Mikrosporidiose, einer Parasiteninfektion (*Enterocytozoon bieneusi*), zugelassen. Die Kegelschnecke *Conus magus* liefert den zur Therapie starker, chronischer Schmerzen in Europa seit Februar 2005 zugelassenen Wirkstoff Ziconotid. Eine weitere erfolgreiche, wenn auch langwierige Erfolgsgeschichte vom Naturstoff zum Arzneimittel ist die des Trabectedins. In den 1960er Jahren entdeckten Wissenschaftler im Rahmen eines groß angelegten Forschungsprogramms des National Cancer Institutes (USA) die Wirksamkeit von Extrakten der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* auf Krebszellen (Lichter *et al.*, 1972). Erst einige Jahre später konnte man durch modernere Trenn- und Analysenmethoden die Reinsubstanzen der Extrakte auftrennen und strukturell erfassen (Rinehart, 2000). Im Jahre 2007 schließlich wurde Trabectedin unter dem Handelsnamen Yondelis™ als Arzneimittel für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Weichteilsarkom von der Europäischen Arzneimittel-Agentur

zugelassen. Im März 2011 erteilte die Europäische Kommission die Genehmigung für das Inverkehrbringen des Arzneistoffes Eribulin (Halaven®). Eribulin ist ein strukturell vereinfachtes, synthetisches Analogon des natürlichen Sekundärmetaboliten Halichondrin B, welches aus dem marinen Schwamm *Halichondria okadai* isoliert wurde. Eribulin gehört innerhalb der Zytostatika zu den nicht taxan-abgeleiteten Wirkstoffen und hemmt die Ausbildung des Mikrotubuliapparates schnell wachsender Krebszellen (Pean *et al.*, 2012).

3.4 Endophyten

Das Kompositum „Endophyt“ setzt sich aus den griechischen Worten *endon* (=innen) und *phyton* (=Pflanze) zusammen. Die Namensgebung dieser Lebewesen lässt schon auf ihr natürliches Habitat schließen: das Innere pflanzlicher Vegetationskörper. Mit der Verwendung des Begriffes „Endophyt“ bezeichnet man heutzutage allgemein Kleinstlebewesen, die in der Lage sind gesundes Pflanzengewebe zu besiedeln, ohne dabei Krankheitssymptome zu verursachen (Chanway, 1996; Porras-Alfaro und Bayman, 2011). Endophyten kommen in der Natur ubiquitär vor und besiedeln terrestrische und marine Pflanzen, auch in bestimmten tierischen Lebewesen können endophytische Mikroorganismen gefunden werden (Stone *et al.*, 2000). Von besonderer Bedeutung für dieses kommensale Zusammenleben mit den Wirtsorganismen ist die aus der Definition hervorgehende Tatsache, dass Endophyten dabei in aller Regel bei ihrem Wirt keine Krankheitssymptome verursachen, so wie es etwa bei Infektionen der Fall ist. Wird die Wirtspflanze jedoch geschwächt, oder gerät das Gleichgewicht dieser Lebensgemeinschaft anderweitig aus den Fugen, so können auch Endophyten als Pathogene in Erscheinung treten (Aly *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 1995). Noch sind die genauen Signal- und Transduktionswege, die die Wechselbeziehungen zwischen endophytischen Mikroorganismen und ihren Wirten steuern, nicht vollständig bekannt (Porras-Alfaro und Bayman, 2011). Sicher ist jedoch, dass diese Form der Koexistenz zwischen Pathogenität und Symbiose einzuordnen ist (Aly *et al.*, 2011; Chanway, 1996; Strobel *et al.*, 2004; Taylor und Taylor, 2000).

3.5 Bioaktive Naturstoffe aus Pilzen

Pilze sind biosynthetisch hochtalentiert Mikroorganismen, die über die eigens produzierten Naturstoffe mit ihrer Umgebung kommunizieren und sich durch die Wirkung solcher Biomoleküle gegen konkurrierende Lebewesen und Umwelteinflüsse zur Wehr setzen können.

Dementsprechend besitzen viele Sekundärstoffe toxische oder hemmende Wirkungen auf andere Organismen. Aufgrund dieser bioaktiven Eigenschaften werden viele aus Pilzen gewonnene Naturstoffe arzneilich genutzt. Die Anwendungsgebiete sind dabei so vielfältig wie die Substanzen selbst; sie finden beispielsweise Verwendung als Arzneimittel bei Infektionen, Hypercholesterinämie, malignen Tumorkrankheiten oder zur Immunsuppression nach Organtransplantationen.

Ein ganz besonders erwähnenswertes Beispiel ist das der Substanz Penicillin G, auch Benzylpenicillin genannt. 1929 beschrieb Alexander Fleming erstmals die Entdeckung einer Substanz, die ihm bei seinen Arbeiten mit *Staphylococcus*-Kolonien durch bakterizide und bakteriolytische Eigenschaften auffiel. Diese Substanz isolierte er aus den Hemmhöfen, die sich um, mit dem Schlauchpilz *Penicillium notatum*, kontaminierte Bereiche seiner Bakterienkolonien bildeten (Fleming, 1929). Heute haben Antibiotika in der Medizin sowie Mikroorganismen zur Herstellung biotechnologisch hergestellter Arzneimittel enorme Bedeutung. Neben den verschiedenen Penicillinen sind die β -Lactam-Antibiotika der Gruppe der Cephalosporine weitere Beispiele für antibiotisch wirksame Sekundärmetabolite aus Pilzen (*Acremonium*-Arten) (Patterson *et al.*, 1964).

Das erstmals aus *Aspergillus terreus* gewonnene Lovastatin wird medizinisch verwendet um Patienten mit einer Hypercholesterinämie zu behandeln, da es die endogene Cholesterinbiosynthese reduziert (Hemmung der (HMGCoA)-Reduktase).

Als besonders viel versprechend bei der Suche nach neuen bioaktiven Naturstoffen haben sich endophytische Pilze herausgestellt, die in ihrem natürlichen Habitat extremen Lebensbedingungen ausgesetzt sind. Diese besonderen Umstände haben im Laufe der Evolution morphologische, physiologische sowie metabolische Anpassungen des jeweiligen Organismus nach sich gezogen (Taylor und Taylor, 2000).

Die Bedeutung von Mikroorganismen in Medizin und Pharmazie hängt nicht nur mit der Fülle an neuen interessanten Naturstoffen, die man seit Anfang des vergangenen Jahrhunderts bis heute aus ihnen isoliert hat, zusammen. Vielmehr konnte vielfach gezeigt werden, dass bestimmte aus Makroorganismen isolierte Sekundärstoffe tatsächlich auch von assoziierten Mikroorganismen gebildet werden (Amna *et al.*, 2006; Eyberger *et al.*, 2006; Gerwick und Moore, 2012; Gray *et al.*, 2012; Kusari *et al.*, 2009; Kusari *et al.*, 2008; Markert *et al.*, 2008; Piel, 2009; Strobel *et al.*, 1996).

Bislang kann dieses Potential jedoch nicht in wünschenswertem Umfang zur Herstellung biotechnologisch gewonnener Arzneimittel genutzt werden. Die größten Probleme, vor denen Wissenschaftler dabei stehen, sind zum einen die geringen Produktionsraten bei der künstlichen Kultivierung der Pilze und zum anderen die

Tatsache, dass sich überhaupt nur ein sehr kleiner Teil (<1%) der in der Natur vorkommenden Endophyten in solchen künstlichen Medien kultivieren lassen (Cragg *et al.*, 2012).

3.6 Quellen endophytischer Pilze

Bei der Arbeit mit endophytischen Pilzen mit dem Ziel der Erforschung neuer bioaktiver Naturstoffe ist die Auswahl des pflanzlichen Wirtes von herausragender Relevanz. Strobel begründet diese Bedeutung vor dem Hintergrund der gezielten Anpassung der Endophyten an die jeweilige ökologische Nische, mit der Tatsache, dass bestimmte mikrobielle Sekundärstoffe charakteristisch für bestimmte Biotope sind (Strobel *et al.*, 2004).

Demnach obliegt es dem jeweiligen Wissenschaftler die biologischen Quellen der Forschungsobjekte sorgfältig zu studieren und auszuwählen, anstatt wahllos bei der Selektion der Wirtsorganismen vorzugehen.

Dabei haben sich Pflanzen, die selbst als Arzneipflanzen verwendet werden, oder die als Ausgangsmaterial zur Extraktion und Gewinnung von modernen Arzneistoffen dienen, als besonders interessant erwiesen. Weiterhin scheinen Makrophyten, die extremen Lebensbedingungen wie Hitze, Kälte, Salinität oder Trockenheit ausgesetzt sind günstige Quellen potentiell interessanter Endophyten zu sein (Strobel *et al.*, 2004; Taylor und Taylor, 2000). Auch Biotope mit einem hohen Maß an Konkurrenz durch dicht miteinander vergesellschaftete Organismen sind Orte, an denen sich die Bewohner aneinander anpassen mussten. Es wird davon ausgegangen, dass sich das Endophyten-Wirt-Verhältnis als eben solch ein Konkurrenzkampf zweier oder mehrerer Organismen in einem ausgewogenen Gleichgewicht befindet. Dabei spielen von allen beteiligten Organismen produzierte Sekundärstoffe als Signal- und Botenstoffe eine besondere Rolle (Aly *et al.*, 2011).

3.6.1 Mangrovenpflanzen als Quelle von Endophyten

Das Wort „Mangrove“ bezeichnet einerseits die Gewächse, die Bestandteil tropischer und subtropischer Gezeitenwälder sind, und andererseits eben dieses Ökosystem als solches. In dieser Arbeit wird der Begriff „Mangrove“ für das Ökosystem verwendet. Mangrovenpflanzen sind Bäume und Sträucher, ihre Ausprägungsformen sind jedoch vielseitig und hängen stark mit ihrem besonderen Lebensraum zusammen. Auffällig ist die Vielzahl an Mikrohabitaten, die die Mangrove anderen Organismen bietet. So können sich verschiedenste Lebewesen an die jeweiligen Bedingungen in Baumkronen, im oder auf dem schlammigen Erdreich, Wassertümpeln und allen anderen denkbaren ökologischen Nischen angepasst haben (Tomlinson, 1986), wobei

die biotischen und abiotischen Lebensräume größtenteils zusätzlich noch von Mikroorganismen bevölkert werden.

Entlang tropischer und subtropischer Küsten sind Mangrovenbäume den Belastungen von Ebbe und Flut ausgesetzt. Sie spielen in diesem Ökosystem eine tragende Rolle und schützen die belebten Bereiche der Mangrove vor Erosion (Mendes *et al.*, 2012). Die hohe Salztoleranz der Mangrovenpflanzen (fakultative Halophyten) von bis zu 500 mM NaCl ist dabei ein lebenswichtiges Charakteristikum, das mitunter auf eigene physiologische Vorgänge, wie der Salz-Akkumulation in bestimmten Geweben oder der Ausscheidung von Salz über spezielle Drüsen zurückzuführen ist (Kjer, 2009; Ravindran *et al.*, 2012). Auch von Endophyten ist bekannt, dass sie durch ihre Fähigkeit zur Biosynthese bestimmter Sekundärmetabolite einen wichtigen Beitrag zur Stresstoleranz der Wirtspflanzen in der Mangrove leisten und damit die Besiedlung dieser küstennahen Biotope ermöglichen (Baltruschat *et al.*, 2008; Clay und Holah, 1999). Die komplexe Biodiversität des Ökosystems Mangrove und die hohe Produktivität ihrer Bewohner interessiert Forscher schon seit langer Zeit. Erst seit den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts jedoch wurden Wissenschaftler auf die durchaus interessanten endophytischen Pilze speziell aus Mangroven aufmerksam (Hyde und Lee, 1995), so dass diese auch nach etwa 20 Jahren noch spannende Forschungsobjekte darstellen. Xu gibt im Jahre 2011 einen systematischen Überblick über bis dahin bekannte, bioaktive Naturstoffe Mangroven-assoziierter Bakterien und Schlauchpilze mit besonderem Augenmerk auf ihre potentielle pharmazeutische Verwendbarkeit (Xu, 2011).

3.7 Regulierung des Sekundärstoffwechsels endophytischer Pilze

Pilze sind dafür bekannt, eine breite Palette physiologisch interessanter Substanzen zu produzieren. Bedauerlicherweise sind die Biosynthesewege zur Bildung dieser Sekundärstoffe nicht permanent aktiv. Mikroorganismen sind in der Lage den energie- und substanzaufwändigen Prozess der Sekundärstoffsynthese unter bestimmten Voraussetzungen auszusetzen, so zum Teil auch unter standardisierten Laborbedingungen (Williams *et al.*, 2008). Bereits seit dem Beginn der Mikrobiologie experimentieren Naturwissenschaftler mit chemisch definierten Kulturmedien um das Wachstum von Mikroorganismen in ihren Laboratorien zu ermöglichen und zu verbessern (Schlegel, 1999). Der nächste Schritt war es die Medien so zusammenzustellen, dass die Produktion bestimmter Sekundärstoffe gezielt optimiert werden konnte.

Um das vollständige biochemische Potential von Pilzen nutzen zu können, wurde die Wirkung der physiologischen Wachstumsbedingungen daraufhin lange untersucht. Dennoch sind die genauen Zusammenhänge auch heute noch nicht im Einzelnen

erforscht. Man hat aber feststellen können, dass optimale Bedingungen für die Biosynthese bestimmter Sekundärmetabolite nicht unbedingt identisch mit denen für das Kulturwachstum sind und zwischen verschiedenen Mikroorganismen und Stoffwechselwegen variieren (Knight *et al.*, 2003).

Die Regulierungsprozesse der Gene der Endophyten, die für die Biosynthese bestimmter Sekundärstoffe codieren, sind im Vergleich zu bereits bekannten und aus wissenschaftlicher Sicht weitestgehend verstandenen Modellen der Genregulation einmalig in der Art und Anzahl der auf sie Einfluss nehmenden Faktoren. Die betreffenden Gene zur Biosynthese eines bestimmten Naturstoffes liegen dabei in den Chromosomen oftmals dicht beieinander. Die lokale Bündelung solcher Gene nennt man Clustering. In der Mehrzahl der untersuchten *Ascomycota* hat man diese Cluster gefunden, wobei man bisher noch nicht verstanden hat, weshalb die Pilze dieses Clustering aufrechterhalten. Möglicherweise liegt der Vorteil in einer erhöhten Effektivität der Genregulierung (Shwab und Keller, 2008).

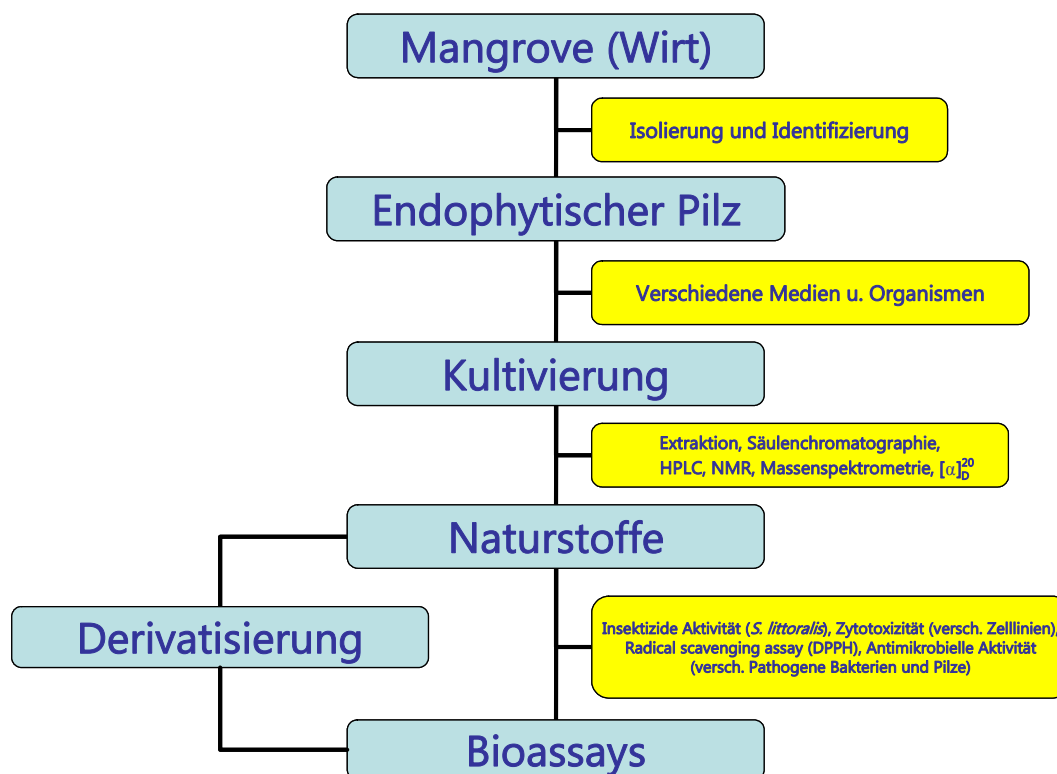
Die Genexpression wird durch verschiedene Mechanismen wie nukleare Transkriptionsfaktoren (multifunktionale Signalstoffe) gesteuert. Weitere Faktoren, die die Gene beeinflussen können, finden sich auch in der Umwelt der Organismen, wie z.B. Temperatur, Lichtzufuhr oder pH-Wert. Des Weiteren spielt das Entwicklungsstadium des Pilzes eine wichtige Rolle, da es für den Pilz vorteilhaft ist, bestimmte Naturstoffe nur zu bestimmten Phasen seiner Entwicklung zu bilden. Jeder Mikroorganismus hat demnach die Möglichkeit, mit seiner Umgebung über bestimmte (offensichtlich größtenteils bisher unbekannte) Mechanismen zu interagieren. Die unterschiedliche Expression und Transkription bestimmter Gene ist dabei über viele äußere Faktoren beeinflussbar (Bode *et al.*, 2002). Xue und Sherman konnten zeigen, dass durch die unterschiedliche Expression des gleichen Gens bei alternativen Kultivierungsbedingungen einer *Streptomyces*-Art verschiedene Polyketide gebildet werden (Xue und Sherman, 2000). Dass die Bildung der Phytotoxine Isoflavipucin und Dihydroisoflavipucin nur in der Gegenwart bestimmter Aminosäuren aktiviert, bei alkalischem pH-Wert stimuliert, aber in Gegenwart von Glucose unterdrückt wird, entdeckten Gressler *et al.* bei der Untersuchung des Schlauchpilzes *Aspergillus terreus* (Gressler *et al.*, 2011). Aber nicht nur der Einfluss anorganischer und organischer Substanzzusätze zum Kulturmedium wurde weit reichend überprüft. Eine Strategie um die natürliche Umgebung eines Mikroorganismus zu imitieren, ist es diesen mit einem oder mehreren weiteren Organismenstämmen im selben Kulturansatz zu vergesellschaften. Der Konkurrenzkampf unter den verschiedenen Pilzen und/oder Bakterien innerhalb eines Ansatzes kann zur Anreicherung bestimmter Naturstoffe führen. Pettit beschreibt das Prinzip der gemischten Fermentation noch als „Forschungsfeld im

Kindheitsstadium“ und begründet dies mit Schwierigkeiten in der Ergebnis-Reproduzierbarkeit (Pettit, 2009). Nichts desto trotz wird auch dieses Prinzip weiterhin von Wissenschaftlern mit substantiellem Erfolg durchgeführt (Li *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2011). Bode *et al.* haben zur Aufdeckung der chemischen Diversität von Mikroorganismen im Jahre 2002 eine Herangehensweise entwickelt, die sie „OSMAC approach“ (**O**ne **S**train – **M**any **C**ompounds) nennen. So lassen sich durch systematische Änderungen der Kulturbedingungen in Fermentern oder festen Medien stille Sekundärstoffwechselwege der Organismen induzieren und so neue Erkenntnisse auf empirischem Wege gewinnen. Da wir bisher die Regulierung der komplexen Biosynthesewege und genetischen Zusammenhänge der Sekundärstoffwechsel von Endophyten nicht vollständig verstehen, gilt laut Bode die Devise „Probieren geht über Studieren“ um die Produktion bisher unbekannter Naturstoffe durch Mikroorganismen anzukurbeln (Bode *et al.*, 2002).

3.8 Zielsetzung der Arbeit

Mangrovenpflanzen sind als fakultative Halophyten aufgrund ihrer Adaptionsprozesse an marine Extremstandorte hochspezialisierte Lebewesen und beherbergen innerlich so wie auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl an Mikro- und Makroorganismen. Dieses nach außen hin friedlich wirkende Zusammenleben verschiedenster Lebewesen ist jedoch größtenteils als ausgewogener Konkurrenzkampf anzusehen. Die kleinsten Bewohner der Mangrove – die Bakterien und Pilze – nehmen an diesem Konkurrenzkampf mit ihren besonderen Sekundärstoffen teil. Ziele dieser Arbeit waren die Aufdeckung neuer Naturstoffe aus Mangroven-assoziierten endophytischen Pilzen und die Ermittlung ihrer Bioaktivität in verschiedenen Testsystemen (Bioassays) zur Überprüfung der insektiziden, antibiotischen, antimykotischen, tumorhemmenden und radikalfangenden Eigenschaften. Endophyten wurden dabei standardmäßig auf festem Reismedium kultiviert (**Publikation: 1, 2**). Um unter diesen Standardbedingungen inaktive, stille Biosynthesewege der bearbeiteten Endophyten zu induzieren und somit weitere potentiell neue Naturstoffe finden zu können, wurden verschiedene Kultivierungsexperimente auf unterschiedlichen Medien und unter Kokultivierung verschiedener Mikroorganismen durchgeführt (**Publikation: 3**). Bei den Arbeiten mit dem endophytischen Pilz *Phomopsis longicolla* wurde u.a. die Substanz Phomoxanthon A, eine dimere Tetrahydroxanthanon-Verbindung, isoliert. Die Konstitution der Verbindung ist seit 2001 bekannt. Die 2005 ermittelte absolute Konfiguration (Stereochemie) konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse revidiert werden. Phomoxanthon A ist bekannt für seine weit reichende Bioaktivität in verschiedenen Testsystemen. In der vorliegenden Arbeit wurden

chemische Derivatisierungsreaktionen mit dieser potenten Substanz durchgeführt, um mit den gebildeten Derivaten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (engl. structure activity relationship oder abgekürzt SAR) aufstellen zu können (**Publikation: 2**). Schema 3.I gibt einen Überblick über die mikrobiologische und naturstoffchemische Vorgehensweise.



Schema 3.II: Schematischer Überblick über wichtige Schritte bei der Isolierung von Endophyten aus ihren Wirtspflanzen und der Isolierung und Strukturaufklärung ihrer Sekundärstoffe.

4 Publikation 1: *Pestalotiopsis virgatula*

Veröffentlicht in: „Tetrahedron letters“,

Impact factor: 2.683,

Eigener Anteil an der Arbeit: 80 %, Erstautor, Durchführung der Experimente (Ausnahmen s. Erklärung), Schreiben des Manuskriptes

"Reprinted from Tetrahedron Letters, 54 (25), 'Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*' Copyright (2013), with permission from Elsevier."

Author's personal copy

Tetrahedron Letters 54 (2013) 3256–3259



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*

David Rönsberg^a, Abdessamad Debbab^a, Attila Mándi^b, Victor Wray^c, Haofu Dai^d, Tibor Kurtán^b, Peter Proksch^a, Amal H. Aly^{a,*}

^aInstitut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^bDepartment of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen, Hungary

^cHelmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

^dInstitute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2013

Revised 4 April 2013

Accepted 8 April 2013

Available online 15 April 2013

Keywords:

Sonneratia caseolaris

Endophytic fungi

Pestalotiopsis virgatula

α -Pyrone

ABSTRACT

Chromatographic analysis of an ethyl acetate extract of *Pestalotiopsis virgatula* rice cultures yielded four new α -pyrone derivatives, pestalotiopyrones 1–4, and the new (6S,1'S,2'S)-hydroxypestalotin, in addition to three known compounds. The planar structures of the new compounds were elucidated on the basis of extensive NMR spectroscopic and mass spectrometric analyses. The absolute configurations of the new compounds were determined on the basis of biosynthetic considerations, coupling constants, and for pestalotiopyrone 1 by TDDFT ECD calculations of solution conformers.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The search for new drugs from natural sources is nowadays becoming more indispensable than ever, due to a comprehensive knowledge on the mode of action in terms of specificity and efficiency, possible side effects, and the growing risk of developing resistance. Accordingly, natural products and drugs derived from natural sources increasingly represent a significant proportion among newly developed drugs.^{1–3}

Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi, isolated from higher plants, are a major focus of natural product research. Of particular interest are plant sources of endophytic fungi, which are able to survive in extreme conditions such as drought, salinity, heat or cold, and with a variety of competing organisms, which live in their natural environments. Examples of such natural habitats where all organisms have to adapt morphologically and physiologically to withstand the existing evolutionary pressure are mangrove forests. Chemical variations are required, inter alia, for these organisms to obtain evolutionary benefits. These facts make endophytes from such environments very promising targets in the search for new bioactive secondary metabolites.^{4–8}

Members of the genus *Pestalotiopsis* have attracted considerable attention in recent years. Many important secondary metabolites

that are potential leads for the treatment of human diseases and control of plant diseases have been identified from this genus.^{9,10} A prominent example is the discovery of paclitaxel as an endophytic secondary metabolite from the fungal strain *Pestalotiopsis microspora*.⁹ The genus is characterized by its extensive distribution and the wide genetic and biological variability of its members, which make it a vast reservoir of bioactive natural products still to be explored.¹¹

In this study four new α -pyrone derivatives, pestalotiopyrones 1–4, a new hydroxypestalotin diastereomer (5), as well as three known compounds, hydroxypestalotin, pestalotin, and pestalopyrone, were isolated from the mangrove-derived endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* by chromatographic methods. The structure elucidation of the new compounds (1–5) (Fig. 1) is described in detail.

Results and discussion

The ethyl acetate extract was fractionated by column chromatography initially using silica gel and then Sephadex LH-20 or Diaion HP20 as stationary phases. Each substance was purified by subsequent semi-preparative HPLC.

Compound 1 was found to have the molecular formula $C_{13}H_{16}O_7$ based on the prominent signal at m/z 285.0968 $[M+H]^+$ in the HRESIMS. The 1H NMR spectrum (Table 1) indicated the presence of one olefinic methyl group at $\delta(H)$ 2.42 ppm ($1'-CH_3$),

* Corresponding author. Tel.: +49 211 81 14173; fax: +49 211 81 11923.
E-mail address: amal.hassan@uni-duesseldorf.de (A.H. Aly).

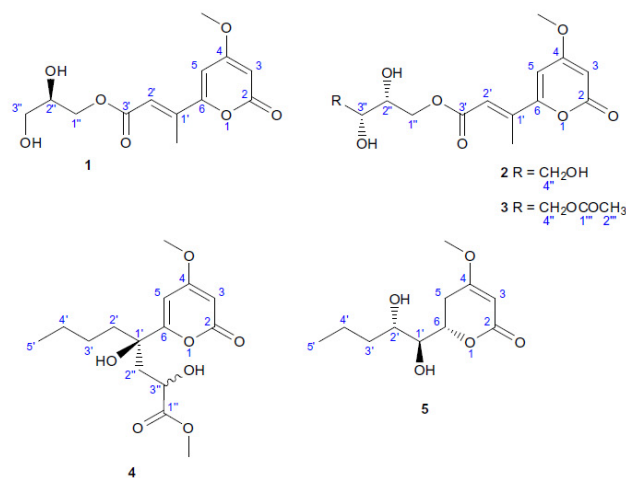


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–5.

one methoxy group at δ (H) 3.94 ppm (4-OCH₃), two oxygenated methylene groups at δ (H) 3.63 (CH₂-3'') and 4.21/4.30 ppm (CH₂-1''), an oxygenated aliphatic proton at δ (H) 3.92 ppm (H-2''), two *meta*-coupled aromatic protons at δ (H) 5.78 (H-3) and 6.6 ppm (H-5), and one olefinic proton singlet at δ (H) 6.74 ppm (H-2'). In total, 13 signals were detected in the ¹³C NMR spectrum (Table 1) including signals for two ester carbonyl groups, six olefinic, and three oxygenated aliphatic carbons, one methoxy, and one methyl group. The unsaturated δ -lactone part found in **1** was confirmed by the HMBC correlations of H-3 to C-4 and C-5, and of H-5 to C-3, C-4, and C-6 (Table S1). The position of the methoxy function was proven by its correlation with C-4. Through two-dimensional NMR

analyses, it was furthermore shown that the α -pyrone core structure of **1** was attached to a side chain at C-6, which consists of isocrotonic acid esterified with glycerol. The presence of the glycerol moiety was indicated by the COSY correlations establishing the downfield shifted spin system CH₂(1'')CH(2'')CH₂(3''). HMBC correlations of CH₂-1'' to C-2'', of H-2'' to C-1'' and C-3'', and of CH₂-3'' to C-2'' offered further evidence (Table S1). The isocrotonic acid moiety was confirmed by the HMBC correlations of H-2' to C-1', 1'-CH₃ and C-6, and of 1'-CH₃ to C-1', C-2', and C-6 (Table S1). The HMBC correlation of H-5 to the sp² carbon C-1' of the side chain confirmed the linkage of C-6 to the β -position of the carboxylic acid. Moreover, esterification with the glyceryl moiety was shown by

Table 1
¹H and ¹³C NMR data of 1–3 (MeOH-*d*₄, δ in ppm, *J* in Hz)

Nr.	1		2		3	
	δ_H^a	δ_C^b	δ_H^c	δ_C^d	δ_H^a	δ_C^b
2		165.5		165.7		165.6
3	5.78, d (1.9)	91.3	5.73, d (2.0)	91.4	5.78, d (2.0)	91.3
4		172.9		173.1		173.0
5	6.6, d (1.9)	104.0	6.55, d (2.0)	104.2	6.6, d (2.1)	104.0
6		160.2		160.3		160.2
1'		144.1		144.1		144.1
2'	6.74, br s	121.0	6.70, d (1.1)	121.3	6.76, d (1.2)	121.1
3'		167.3		167.6		167.4
4'		—		—		—
5'		—		—		—
1''	4.30, dd (4.3, 11.5)	66.7	4.40, dd (2.8, 11.6)	67.5	4.46, dd (2.4, 11.4)	67.1
2''	4.21, dd (6.3, 11.5)		4.22, dd (6.5, 11.6)		4.28, dd (5.5, 11.5)	
3''	3.92, m	71.1	3.79, m	71.3	3.82, m	71.0
4''	3.63, dd (1.7, 5.4)	64.1	3.60, m	73.6	3.82, m	71.0
	—	—	3.59, dd (6.0, 14.4)	64.7	4.37, dd (2.8, 11.6)	67.1
			3.76, dd (3.4, 14.4)		4.20, dd (5.5, 11.5)	
1'''	—	—	—	—	—	172.9
2'''	—	—	—	—	2.12, s	20.8
1'-CH ₃	2.42, d (0.8)	13.7	2.37, d (1.2)	13.8	2.43, d (1.2)	13.7
1'-OCH ₃	—	—	—	—	—	—
4-OCH ₃	3.94, s	57.2	3.89, s	57.4	3.94, s	57.2

^a 600 MHz.

^b 150 MHz.

^c 500 MHz.

^d 125 MHz.

the correlation of H-1'' to the carboxylate ester atom C-3'. The (E) geometry of the isocrotonic acid part was determined by the observed correlation from H-5 to H-2' in the ROESY spectrum. Thus, the structure of **1** was unambiguously determined as 2,3-dihydroxypropyl (2E)-3-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)but-2-enoate for which we suggest the name pestalotiopyrone **1**. Comparison of the $[\alpha]_D$ value of **1** (−13.1, MeOH) with reported values for structurally related compounds as (2S)-1-O-p-coumaroylglycerol (+12.8, MeOH),¹² (2R)-glycerol monoacetate (−9.2, pyridine), and (2R)-glycerol monobenzoate (−13.3, pyridine)¹³ suggested that the C-2'' chirality center of **1** may have (R) absolute configuration.

Compound **2** had the molecular formula $C_{14}H_{18}O_8$ as indicated by the HRESIMS signal at m/z 315.1072 $[M+H]^+$. The 1H and ^{13}C NMR data of **2** (Table 1) resembled those of **1**, except for the existence of one additional hydroxy methine group resonating at $\delta(H)$ 3.60 ppm ($\delta(C)$ 73.6 ppm, CH-3''), which was in accordance with the increase in molecular weight of **2** by 30 amu compared to **1**. Further confirmation was achieved by the observed COSY correlations of CH₂-1'' to H-2'', of H-2'' to H-3'', and of H-3'' to CH₂-4'' (Table S1). Accordingly, the side chain of **2** is composed of isocrotonic acid esterified with a butane-1,2,3,4-tetrol unit. Thus, **2** was identified as the new natural product 2,3,4-trihydroxybutyl (2E)-3-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)but-2-enoate and given the name pestalotiopyrone **2**.

The HRESIMS of **3** exhibited a prominent peak at m/z 357.1180 $[M+H]^+$ which is in accordance with the molecular formula $C_{16}H_{20}O_9$. The NMR spectra of **3** showed the same signals detected for **2** as well as signals corresponding to an additional acetyl group (Table 1). The methyl group of the latter was detected at $\delta(H)$ 2.12 ppm ($\delta(C)$ 20.8 ppm, CH₃-2'') and the ester carbonyl carbon at $\delta(C)$ 172.9 ppm (C-1''). This was further confirmed by the downfield chemical shift of CH₂-4'' ($\delta(H)$ 4.20/4.37 and $\delta(C)$ 67.1 ppm) and the HMBC correlation observed for CH₂-4'' to the carboxylate ester carbon C-1''. Compound **3** was thus identified as the new natural product pestalotiopyrone **3** (4-(acetyloxy)-2,3-dihydroxybutyl (2E)-3-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)but-2-enoate).

In order to determine the relative configuration in combination with the NMR data, conformational analysis of the diastereomeric (R,R)- and (R,S)-**2** was carried out. Their initial MMFF search provided 700 and 806 conformers, respectively, which were optimized at B3LYP/6-31G(d) with PCM solvent model for chloroform to produce 11 and 18 conformers, respectively (Figs. S1 and S2). Since the tetrol moiety showed large conformational flexibility for both diastereomers with versatile dihedral angles and hydrogen bondings, the correlation of the computed conformers with the $^3J_{H,H}$ data did not allow the determination of the relative configuration of **2**. However, biosynthetic considerations indicate that the butane-1,2,3,4-tetrol unit in **2** and **3** may arise from either one of the two natural tetrols, also known as sugar alcohols, threitol [(2R,3R)-butane-1,2,3,4-tetrol] and erythritol [(2R,3S)-butane-1,2,3,4-tetrol]. Erythritol is optically inactive due to the presence of a plane of symmetry in its structure (*meso* form), whereas threitol is optically active.^{14,15} The $[\alpha]_D$ values of **2** and **3**, measured in MeOH, were −22.5 and −20.1, respectively, suggesting threitol (−14.0 in EtOH)¹⁶ as the tetrol unit of **2** and **3** provided that the acylation of the tetrol unit did not involve an asymmetric desymmetrization. Although **2** showed a distinct ECD spectrum determined mainly by the C-2'' chirality center, ECD calculations were not successful as it was not possible to distinguish between the (2''R,3''R)- and (2''R,3''S)-epimers.

The molecular formula of pestalotiopyrone **4** (**4**) was determined to be $C_{15}H_{22}O_7$ by HRESIMS (m/z 315.1433, $[M+H]^+$). The 1H NMR data of **4** (Table 2) revealed the presence of two *meta*-coupled aromatic protons ($\delta(H)$ 5.59, $\delta(C)$ 88.2 ppm, H-3, and $\delta(H)$ 6.40, $\delta(C)$ 101.3 ppm, H-5), two methoxy groups ($\delta(H)$ 3.92, $\delta(C)$ 57.0 ppm, 4-OCH₃, and $\delta(H)$ 3.72, $\delta(C)$ 52.6 ppm, 1''-OCH₃), an

Table 2
 1H and ^{13}C NMR data of **4** and **5** at 600 (1H) and 150 (^{13}C) MHz (δ in ppm, J in Hz)

Nr.	4		5	
	δ_H^a	δ_C^b	δ_H^a	δ_C^b
2		167.0		n.d. ^c
3	5.59, d (2.3)	88.2	5.22, d (1.4)	89.7
4		173.7		173.8
5	6.40, d (2.3)	101.3	3.01, ddd (1.3, 13.3, 17.2)	35.9
6	—	169.5	2.28, dd (3.7, 17.2)	—
1'	—	76.5	4.81, ddd (1.1, 3.7, 13.5)	71.7
2'	1.77, dd (4.7, 11.9)	40.9	3.26, dd (1.1, 9.1)	75.5
	1.86, dd (4.6, 11.9)		3.80, dt (2.4, 9.1)	74.1
3'	1.09, m	26.3	1.85, m	29.6
			1.44, m	
4'	1.33, m	23.9	1.66, m	18.9
			1.44, m	
5'	0.92, t (7.5)	14.3	1.01, t (7.3)	14.0
1''	—	175.4	—	—
2''	4.21, dd (3.6, 9.1)	69.3	—	—
3''	2.02, dd (9.1, 14.5)	43.2	—	—
	2.39, dd (3.7, 14.5)			
1''-OCH ₃	3.72, s	52.6	—	—
4-OCH ₃	3.92, s	57.0	3.85, s	56.2

^a MeOH-*d*₄.

^b CHCl₃-*d*.

^c Not detected.

AMX system including a deshielded methine ($\delta(H)$ 4.21 ppm, H-2'') and two methylene protons ($\delta(H)$ 2.02/2.39 ppm, CH₂-3''), and a butyl group (CH₂-2'' to CH₃-5'). The above observations indicated an α -pyrone core structure for **4**. This was further confirmed by COSY correlations between H-3 and H-5, and HMBC correlations of H-3 to C-2, C-4, and C-5, and of H-5 to C-3, C-4, and C-6 (Table S1). The position of the methoxy group at C-4 was confirmed by its HMBC correlation to C-4 ($\delta(C)$ 173.7 ppm) and its ROESY correlations to H-3 and H-5. The 1-hydroxypentyl (C-1' to CH₃-5') side chain was disclosed by COSY correlations establishing the butyl spin system CH₂(2')CH₂(3')CH₂(4')CH₃(5'), which was confirmed by HMBC correlations of the respective protons, and correlations of CH₂-2' to the deshielded quaternary C-1' ($\delta(C)$ 76.5 ppm) (Table S1). HMBC correlations of 1''-OCH₃, H-2'', and CH₂-3'' to the ester carbonyl C-1'' ($\delta(C)$ 175.4 ppm) established the 2-hydroxypropanoic acid methyl ester moiety, and those of H-2'' and CH₂-3'' to C-1' confirmed its attachment to the side chain at C-1'. This was further corroborated by the correlations observed for CH₂-2' and CH₂-3'' to C-3'' and C-2'', respectively (Table S1). Correlations of both CH₂-2' and CH₂-3'' to C-6 confirmed that the side chain was linked to the α -pyrone at this position. Comparison of the measured NMR data with values reported in the literature showed a close correlation with the known compound PC-2,¹⁷ which lacks the 2-hydroxypropanoic acid methyl ester moiety.

In contrast to **1–3**, the C-1' quaternary chirality center of **4** is adjacent to the 2-oxo-2H-pyran chromophore and thus the ECD spectra are governed by this chirality center. Conversely, the chiral center at C-3'' will have minor influence as it is separated by a further methylene unit. The ECD spectrum of **4** showed a positive Cotton effect (CE) at 278 nm and negative ones at 233, 205, and 195 nm. In order to determine the absolute configuration of C-1', the solution TDDFT-ECD calculation protocol was pursued. The DFT optimization of the 193 initial MMFF conformers of the arbitrarily chosen (1'S,2'S)-**4** afforded 11 conformers above 1% population, which differed mostly in the orientation of the butyl side chain (Fig. S3). In all the conformers, the oxygen of the 1'-OH was co-planar with the 2-oxo-2H-pyran ring and its hydrogen was bonded to the oxygen of the 2''-OH fixing the $\omega_{H-2'',C-2',C-3'',H-3''}$ and $\omega_{H-2',C-2'',C-3'',H-3''}$ dihedral angles. These dihedral angles were found around −175° and −58° in all the conformers, which

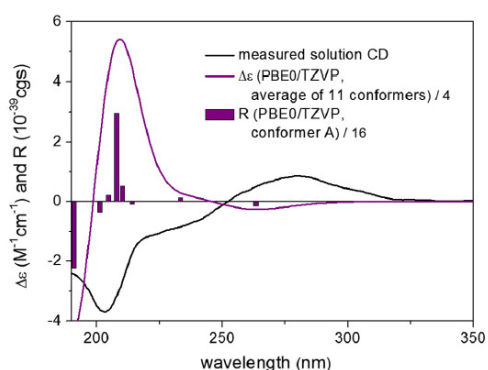


Figure 2. Experimental ECD spectrum of **4** in acetonitrile compared with the Boltzmann-weighted B3LYP/TZVP spectrum calculated for the conformers of (1'S,2'S)-**4** with PCM model for MeCN. Bars represent rotational strength values for the lowest-energy conformer.

are in accordance with the 9.1 and 3.6 Hz $^3J_{\text{H-2''H-3''}}$ coupling constants. The Boltzmann-averaged ECD spectrum of the conformers of (1'S,2'S)-**4** computed with B3LYP, BH&HLYP, and PBE0 functionals and TZVP basis set gave a mirror curve of the solution experimental spectrum (Fig. 2), which allowed unambiguous assignment of C-1' as (R). Thus, **4** was identified as the new natural product methyl 2,4-dihydroxy-4-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)octanoate and was named pestalotiopyrone L.

The HRESIMS data of **5** and hydroxypestalotin (m/z 231.1227 and 231.1228 [M+H] $^+$, respectively) indicated the same molecular formula of $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5$, with three degrees of unsaturation, for both compounds. Their UV spectra differed significantly from those recorded for **1–4**, which showed UV maxima characteristic for α -pyrones,¹⁸ thus indicating that **5** is not an α -pyrone derivative. NMR data, however, indicated the presence of a δ -lactone core structure (Table 2). Hydroxypestalotin [(6S,1'S,2'R)-LL-P880 β] was identified by comparison of NMR, ECD data, and $[\alpha]_D$ value with reported literature data.^{19,20} The ECD spectrum of **5** showed a negative CE at 248 nm and a positive one at 218 nm, similar to those of hydroxypestalotin,²⁰ which proved its (6S) absolute configuration. Comparison of the NMR data, including coupling constants, and the optical rotation value of **5** with literature data of (6S,1'S,2'R)-**19**, (6S,1'R,2'R)-**21**, (6R,1'S,2'R)-**22**, (6R,1'R,2'R)-**21**, (6R,1'R,2'S)-**23**, and (6S,1'R,2'S)-LL-P880 β ²³ showed that ^1H and ^{13}C NMR data of **5** were in accordance with those of (6R,1'R,2'R)-LL-P880 β , while their optical rotations had opposite signs with similar magnitudes. This led to the conclusion that **5** is the enantiomer of (6R,1'R,2'R)-LL-P880 β and it was thus assigned as the previously unreported (6S,1'S,2'S)-hydroxypestalotin.

The remaining compounds were identified on the basis of their NMR and mass spectrometric data as well as by comparison with published data as pestalotin^{24,25} and pestalopyrone.²⁶

All compounds were tested against a panel of selected multi-drug-resistant pathogens that included *Klebsiella pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas*

aeruginosa. However, none of the compounds showed activity against the tested microorganisms (MIC >125 $\mu\text{g/mL}$). Likewise no cytotoxic activity was detected against murine L5178Y lymphoma cells (cell growth inhibition <20% at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$). Furthermore, test samples were incorporated into artificial diet and offered to neonate larvae of the polyphagous insect *Spodoptera littoralis* in a nonchoice bioassay. None of the tested samples showed significant larval mortality.

Acknowledgments

Financial support by grants of BMBF to P.P. is gratefully acknowledged. T.K. and A.M. thank the Hungarian National Research Foundation (OTKA K105871) for financial support and the National Information Infrastructure Development Institute (NIIFI 10038) for CPU time.

Supplementary data

Supplementary data (figures of calculated low-energy conformers of **2** and **4**, COSY and HMBC data of **1–5**, experimental section and compound characterization) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.04.031>.

References and notes

- Demain, A. L.; Vaishnav, P. *Microbial Biotechnol.* **2011**, *4*, 687–699.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–477.
- Knight, V.; Sanglier, J. J.; DiTullio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 446–458.
- Aly, A.; Debbab, A.; Kjer, J.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2010**, *41*, 1–16.
- Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1829–1845.
- Lane, G. A.; Christensen, M. J.; Miles, C. O. In *Microbial Endophytes*; Bacon, C. W., White, J. F., Eds.; M. Dekker: New York, 2000; pp 341–388.
- Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2011**, *49*, 1–12.
- Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2012**, *57*, 45–83.
- Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R. S.; Hess, W. M. *Microbiology* **1996**, *142*, 435–440.
- Li, J. Y.; Strobel, G. A. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 261–265.
- Strobel, G. A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, *22*, 315–333.
- Shimomura, H.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; Iida, N. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 451–454.
- Breitgoff, D.; Laumen, K.; Schneider, M. P. *Chem. Commun.* **1986**, 1523–1524.
- Manaktala, S. K.; Neelakantan, S.; Seshadri, T. R. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 2373–2376.
- McNaught, A. D. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919–2008.
- Ingavat, N.; Dobreiner, J.; Wiyakrutta, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2049–2052.
- Kimura, Y.; McGahren, W. J.; Suzuki, A.; Tamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1625–1626.
- Scott, A. I. *The Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products*; Pergamon Press: Oxford, 1964.
- Venkatasubbaiah, P.; Van Dyke, C. G. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1471–1474.
- McGahren, W. J.; Ellestad, G. A.; Morton, G. O.; Kunstmann, M. P.; Mullen, P. J. *Org. Chem.* **1973**, *38*, 3542–3544.
- Kirihata, M.; Ohe, M.; Ichimoto, I.; Ueda, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1825–1828.
- Kirihata, M.; Ohta, K.; Ichimoto, I.; Ueda, H. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 2401–2405.
- Kirihata, M.; Kamihisa, Y.; Ichimoto, I.; Ueda, H. *Chem. Express* **1992**, *7*, 837–840.
- Ellestad, G. A.; McGahren, W. J.; Kunstmann, M. P. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2045–2047.
- Kimura, Y.; Suzuki, A.; Tamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 451–452.
- Xu, J.; Aly, A. H.; Wray, V.; Proksch, P. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 21–25.

Supporting Information

New Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis virgatula* Isolated from the Mangrove Plant *Sonneratia caseolaris*

David Rönsberg^a, Abdessamad Debbab^a, Attila Mándi^b, Victor Wray^c, Haofu Dai^d, Tibor Kurtán^b, Peter Proksch^a, Amal H. Aly^{a,*}

^aInstitut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^bDepartment of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen, Hungary

^cHelmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

^dInstitute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, P. R. China

Table of Contents

Figure S1. Low-energy conformers ($\geq 1\%$) of (2'' <i>R</i> ,3'' <i>R</i>)- 2 calculated at B3LYP/6-31G(d) with PCM solvent model for CHCl ₃ .	S2
Figure S2. Low-energy conformers ($\geq 1\%$) of (2'' <i>R</i> ,3'' <i>S</i>)- 2 calculated at B3LYP/6-31G(d) with PCM solvent model for CHCl ₃ .	S3
Figure S3. Low-energy conformers ($\geq 1\%$) of (1' <i>S</i> ,2'' <i>S</i>)- 4 calculated at B3LYP/TZVP with PCM solvent model for MeCN.	S4
Table S1. COSY and HMBC data of 1-5 (MeOH- <i>d</i> ₄ , δ in ppm, <i>J</i> in Hz)	S5
Experimental Section	S6
References	S9

Figure S1.

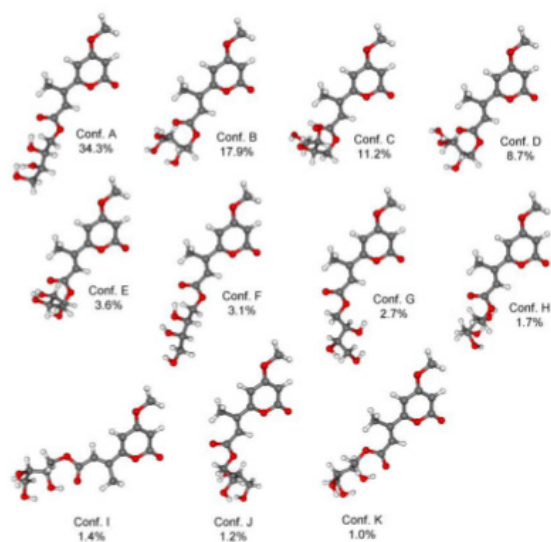


Figure S2.

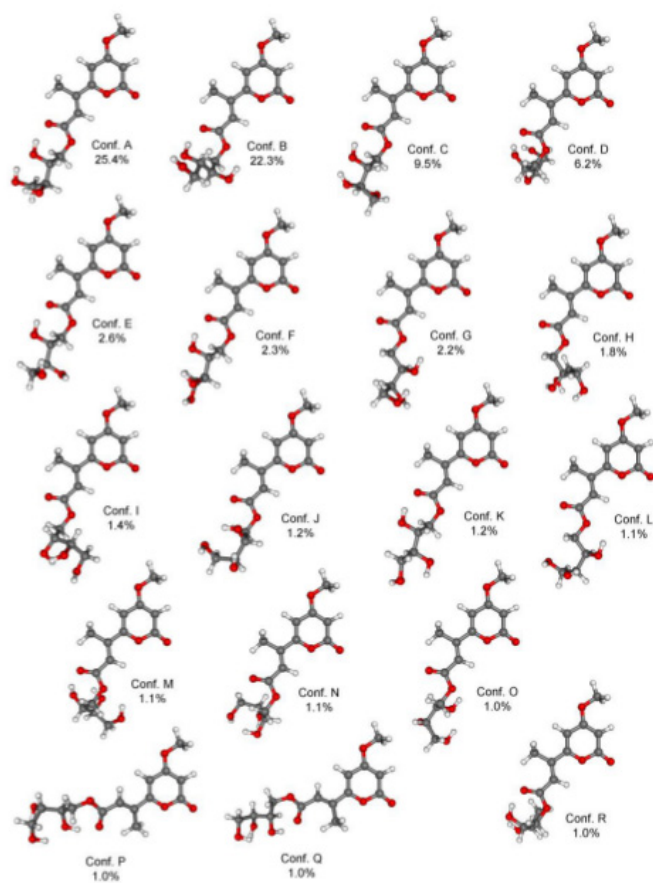


Figure S3.

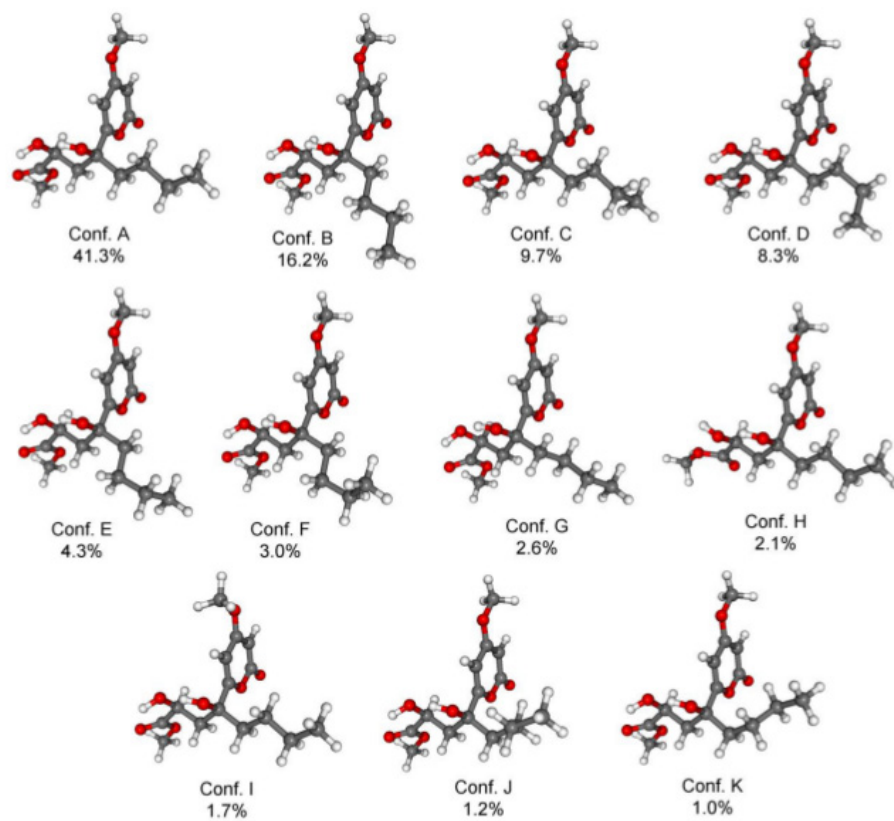


Table S1. COSY and HMBC data of **1-5** (MeOH- d_4 , δ in ppm, J in Hz)

Nr.	1		2		3		4		5	
	HMBC	COSY	HMBC	COSY	HMBC	COSY	HMBC	COSY	HMBC	COSY
3	4, 5	5	2, 4, 5	5	2, 4, 5	5	2, 4, 5	5	4	5
5	1', 3, 4, 6	3	1', 3, 4, 6	3	1', 3, 4, 6	3	3, 4, 6	3	1', 3, 4	3, 6
6										1', 5
1'									6	2', 6
2'	1', 6, 1'-CH ₃	1'-CH ₃	1', 5, 6	1'-CH ₃	1', 1'-CH ₃ , 6	1'-CH ₃	1', 3', 4', 6, 3"			1', 3'
3'							2', 4', 5'	2', 4'		2', 4'
4'							2', 3', 5', 3', 4'	3', 5'		3', 5'
5'								4'		4'
1"	3', 2", 3"	2"		2"	3', 3"	2"				
2"	1", 3"	1", 3"		1", 3"	3"	1", 3"	1', 1", 3"	3"		
3"	1", 2"	2"		2", 4"	2"	2", 4"	1', 2', 6, 2", 1"	2"		
4"				3"	2", 1"	3"				
2"				1"	1"	1"				
1'-CH ₃	1', 2', 6	2'	1', 2', 3', 6	2'	1', 2', 6	2'				
1"-OCH ₃							1"			
4-OCH ₃	4		4		4		4		4	

Experimental Section

General Experimental Procedures

HPLC analysis was performed with a Dionex system coupled to a photodiode array detector (Ultimate 3000). The detection was at 235, 254, 280 and 340 nm. The used column (125 x 4 mm, L x ID) was prefilled with Eurospher 100-C₁₈, (5 μ m, Knauer), and a linear gradient (0.02% H₃PO₄ in H₂O and MeOH) with a flow rate of 1.0 mL/min was used. HPLC separation was performed on a semi-preparative HPLC system of Merck-LaChrom (L-7100 pump and L-7400 UV detector), Clarity Lite V2.7 analysis software, DataApex, Eurospher 100-C₁₈ (5 μ m; 300 x 8 mm, L x ID) column (Knauer) with a flow rate of 5.0 mL/min. Optical rotations were determined on a Jasco P-2000 polarimeter. 1D and 2D NMR spectra were recorded in deuterio solvents on Bruker-ARX-500 or Avance-DMX-600 spectrometers. ESIMS spectra were conducted on a Finnigan-LCQ-Deca mass spectrometer, and HRESIMS spectra were obtained on an UHR-TOF maXis 4G (Bruker Daltonics) mass spectrometer.

Fungal Material and Cultivation

Fresh, healthy leaf material from the mangrove tree *Sonneratia caseolaris* (collected in October 2005 in Dong Zhai Gang-Mangrove Garden on Hainan Island, China) was treated for 2 min with ethanol 70% (V/V) to ensure a surface disinfection. In addition to eight other species the fungus *Pestalotiopsis virgatula* was isolated from the plant material and taxonomically identified under aseptic conditions according to previously described methods.^{1,2} The fungus was cultivated under static conditions (RT, exclusion of light) on solid rice medium as described previously.²

Extraction and Isolation

The solid rice culture of *P. virgatula* was extracted with EtOAc and the obtained extract was washed with dist. water and then dried under reduced pressure. The crude extract (35.0 g) was fractionated between 90% MeOH and *n*-hexane. The MeOH-fraction (5.2 g) was then subjected to VLC on silica gel 60 and eluted using a stepwise gradient system from 100% *n*-hexane to 100% EtOAc, and from 100% DCM to 100% MeOH. VLC fraction III (100% EtOAc, 0.7 g) was separated by column chromatography using Sephadex LH-20 (100% MeOH eluting solvent). VLC fraction V (50% DCM in MeOH) was separated by Diaion HP20 CC using stepwise gradient system from 100% H₂O to 100% MeOH, 50% Me₂CO in MeOH and 100% Me₂CO. Fractions were subjected to further chromatographic separation

using Sephadex LH-20 (100% MeOH or 50% DCM in MeOH) and purified by semi-preparative HPLC to yield **1** (2.0 mg), **2** (12.5 mg), **3** (1.0 mg), **4** (5.8 mg), **5** (2.5 mg), hydroxypestalotin (5.8 mg), pestalotin (2.1 mg) and pestalopyrone (1.8 mg).

3.3.1. Pestalotiopyrone I (1). White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -13.1$ (*c* 0.2, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 233, 318 nm; ^1H and ^{13}C NMR: Table 1; HRESIMS: m/z 285.0968 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_7$, 285.0969).

3.3.2. Pestalotiopyrone J (2). White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -22.5$ (*c* 0.1, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 233, 317 nm; ECD (MeCN, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 5.2×10^{-4}): 246 (−2.03), 226 (0.73). ^1H and ^{13}C NMR: Table 1; HRESIMS: m/z 315.1072 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_8$, 315.1074).

3.3.3. Pestalotiopyrone K (3). White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -20.1$ (*c* 0.1, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 234, 318 nm; ^1H and ^{13}C NMR: Table 1; HRESIMS: 357.1180 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_9$, 357.1180).

3.3.4. Pestalotiopyrone L (4). White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -20.3$ (*c* 0.5, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 207, 280 nm; ECD (MeCN, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 4.5×10^{-4}): 278 (0.79), 233sh (−0.89), 205 (−4.54), 195 (−2.89). ^1H and ^{13}C NMR: Table 2; HRESIMS: 315.1433 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_7$, 315.1438).

3.3.5. (6*S*,1'*S*,2'*S*)-hydroxypestalotin (5). White amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -29.0$ (*c* 0.25, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 240 nm; ECD (MeCN, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 9.7×10^{-4}): 248 (−2.38), 218 (1.25). ^1H and ^{13}C NMR: Table 2; HRESIMS: 231.1227 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_5$, 231.1227).

Determination of Minimal Inhibitory Concentration

Tests were carried out according to the EUCAST (<http://www.eucast.org>) criteria in a dilution assay against the following multidrug-resistant pathogens: Bacteria: *Escherichia coli* (EC 15), *Klebsiella pneumoniae* (KL 18), *Pseudomonas aeruginosa* (PS 22), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 3), *Streptococcus pneumoniae* (STR 7), and *Enterococcus faecalis* (EK 4). Fungi: *Aspergillus fumigatus* (45) and *Candida albicans*.

Cell Proliferation Assay

Cytotoxicity was tested against the L5178Y mouse lymphoma cell line using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide) assay as described previously.^{3,4}

Insecticidal Activity Assay

The laboratory colony was reared on artificial diet under controlled conditions at 26 °C as described previously.⁵ Feeding studies were carried out with neonate larvae of *Spodoptera littoralis* (n = 10 for each treatment). Neonate larvae were kept on diet treated with various concentrations of the analysed fractions at high concentrations (1500 and 5000 ppm). After 6 days survival and weight of the surviving larvae were recorded and compared with controls. Control diet was prepared with the carrier (EtOAc or MeOH) only.

Computational Section

Mixed torsional/low mode conformational searches were carried out by means of the MacroModel 9.9.223⁶ software using the Merck molecular force field (MMFF) with the implicit solvent model for chloroform. Geometry reoptimizations at B3LYP/6-31G(d) in vacuo, B3LYP/6-31G(d) with PCM solvent model for chloroform or B3LYP/TZVP with solvent model for acetonitrile followed by TDDFT calculations using various functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) and TZVP basis set were performed by the Gaussian 09 package.⁷ ECD spectra were generated as the sum of Gaussians with 2700 cm⁻¹ half-height widths (corresponding to ca. 12 nm at 210 nm) using dipole-velocity computed rotational strengths.⁸ Boltzmann distributions were estimated from the ZPVE corrected B3LYP/6-31G(d) energies in vacuo and from the B3LYP/6-31G(d) or B3LYP/TZVP energies in the solvent model calculations. The MOLEKEL software package was used for visualization of the results.⁹

References

1. Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Müller, W. E. G.; Kozytska, S.; Hentschel, U.; Proksch, P.; Ebel, R. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1716-1725.
2. Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479-490.
3. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936-42.
4. Ebrahim, W.; Kjer, J.; El Amrani, M.; Wray, V.; Lin, W.; Ebel, R.; Lai, D.; Proksch, P. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1081-1091.
5. Chaidir, Hiort, J.; Nugroho, B. W.; Bohnenstengel, F. I.; Wray, V.; Witte, L.; Hung, P. D.; Kiet, L. C.; Sumaryono, W.; Proksch, P. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 837-842.
6. MacroModel, Schrödinger LLC, **2012**.
<http://www.schrodinger.com/Products/macromodel.html>
7. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E. Jr.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision B.01, **2010**, Gaussian, Inc., Wallingford CT
8. Stephens, P. J.; Harada, N. *Chirality* **2010**, *22*, 229-33.
9. Varetto, U. MOLEKEL 5.4., **2009**, Swiss National Supercomputing Centre: Manno, Switzerland

5 Publikation 2: *Phomopsis longicolla* I

Zur Veröffentlichung eingereicht in: „Journal of Medicinal Chemistry“,

Impact factor: 5.248,

Eigener Anteil an der Arbeit: 70 %, Erstautor, Durchführung der Experimente (Ausnahmen s. Erklärung), Schreiben des Manuskriptes

"Reproduced with permission from Journal of Medicinal Chemistry, submitted for publication. Unpublished work copyright 2013 American Chemical Society."

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Pro-Apoptotic and Immunostimulatory Tetrahydroxanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla*

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rönsberg, David; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Pharmazeutische Biologie Debbab, Abdessamad; Institute for Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Mándi, Attila; Univeristy of Debrecen, Department of Organic Chemistry Vasylyeva, Vera; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie Böhrer, Philip; Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Institut für Molekulare Medizin Stork, Björn; Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Institut für Molekulare Medizin Engelke, Laura; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie Hamacher, Alexandra; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie Sawadogo, Richard; Laboratory of Molecular and Cellular Biology of Cancer, Diederich, Marc; Laboratory of Molecular and Cellular Biology of Cancer, Wray, Victor; Helmholtz Centre for Infection Research, Department of Structural Biology Lin, Wenhan; Peking University, State Key Lab. of Nat. & Biomim. Drugs Kassack, Matthias; Institute of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Janiak, Christoph; Universität Düsseldorf, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie Scheu, Stefanie; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Wesselborg, Sebastian; Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Institut für Molekulare Medizin Kurtán, Tibor; Univeristy of Debrecen, Department of Organic Chemistry Aly, Amal; Heinrich-Heine-Universität, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Proksch, Peter; Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Institut für Pharmazeutische Biologie

SCHOLARONE™
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment

**Pro-Apoptotic and Immunostimulatory Tetrahydroxanthone Dimers from the
Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla***

David Rönsberg,[†] Abdessamad Debbab,[†] Attila Mándi,[‡] Vera Vasylyeva,[§] Philip Böhler,^{||}
Björn Stork,^{||} Laura Engelke,[⊥] Alexandra Hamacher,[⊥] Richard Sawadogo,[◇] Marc Diederich,[◇]
Victor Wray,[□] WenHan Lin,[○] Matthias Kassack,[⊥] Christoph Janiak,[§] Stefanie Scheu,^Δ
Sebastian Wesselborg,^{||} Tibor Kurtán,[‡] Amal H. Aly,^{†*} Peter Proksch^{†*}

[†] Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität,
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[‡] Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen,
Hungary

[§] Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie, Heinrich-Heine-Universität,
Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^{||} Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-
Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[⊥] Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität,
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[◇] Laboratory of Molecular and Cellular Biology of Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, 9,
rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

[□] Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

[○] National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University,
Health Science Center, 100083 Beijing, China

^Δ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-
Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Abstract

Four new metabolites (**1** and **4-6**) were isolated from *Phomopsis longicolla*, an endophyte of the Mangrove *Sonneratia caseolaris*, together with four known compounds (**2**, **3**, **7** and **8**). All compounds were unequivocally identified by spectroscopic and mass spectrometric analyses and by comparison with the literature. The absolute configuration of phomoxanthone A (**1**) was revised by X-ray crystallography, whereas those of **2-4** were deduced from TDDFT ECD calculations. Acidic hydrolysis of **1** resulted in deacetylphomoxanthone A (**11**), whereas alkaline hydrolysis afforded four new derivatives (**9a-10**). Phomoxanthone A (**1**) showed pro-apoptotic activity against a panel of human cancer cell lines including cisplatin resistant cells. The IC₅₀ against lymphoma cell lines was over 100-fold lower than against healthy blood cells. Phomoxanthone A was further found to activate murine T lymphocytes, NK cells and macrophages, suggesting its dual effect in combating cancer cells both through induction of apoptosis and activation of the immune system.

Keywords

Sonneratia caseolaris, natural products, endophytic fungi, *Phomopsis longicolla*, tetrahydroxanthone dimers, phomoxanthone A, apoptosis, immunostimulation.

Introduction

Cancer still poses one of the most serious health problems that ranks as the second leading cause of death in the Western World after heart/circulatory problems.¹ Problems in treating cancer are closely linked to chemoresistance against currently available cytostatic drugs.² During the onset of a chemotherapeutic cycle, cancer cells usually react favourably to the drugs administered and a vast majority of cancer cells are killed. A few surviving cells might display a highly chemo-resistant phenotype due to successive mutations of oncogenes and suppressor genes that deregulate the cell cycle.³ This type of chemoresistance is known as secondary or acquired resistance.⁴ Chemoresistance may also pre-exist in a few cells, which are then selected by chemotherapy.³ This model supports the idea of a heterogenous population of cancer cells (intrinsic resistance).⁴ Resistant cancer cells are difficult to treat by currently available chemotherapy or by radiotherapy. They will rapidly spread and develop metastases that attack vital organs of the body, with ultimate patient death. In this context, the identification of tumour-specific antigens and their recognition by T cells⁵ indicates the paradoxical fact that in spite of the natural capability of the immune system to recognise cancer cells, it often fails to control malignant growth. This may be explained by generalised immunodeficiency associated with tumour growth, or immunomodulatory properties of cancer within its microenvironment.⁶ The latter could be reversed by immunotherapy through activating immune effector functions to promote tumour destruction.⁷ However, the impact of tumour immunology on clinical management of cancer is still a matter of intensive investigation. Increasing evidence suggests that anticancer immune responses may contribute to the control of cancer after conventional therapy, helping to eliminate residual cancer cells or prevent micrometastases.⁸ Thus, involvement of antitumor immune responses in the therapeutic management of cancer, or the development of chemotherapeutic agents inducing specific immune responses, in addition to their direct cytotoxic effects on tumour cells, would attribute promising dual functions to a single molecule offering a great improvement of cancer

1
2
3 treatment that is less hampered by or even able to prevent the development of chemical
4
5 resistance.⁹
6

7
8 Natural products and natural product analogues have a long and impressive success story with
9
10 regard to the treatment of cancer. More than two thirds of currently available anti-cancer
11
12 drugs are derived from or inspired by nature.¹⁰ Prominent examples include plant derived
13
14 compounds such as paclitaxel, dimeric alkaloids from *Catharanthus roseus* (and their semi-
15
16 synthetic products), the camptothecin derived drugs irinotecan and topotecan, as well as
17
18 etoposide that is a derivative of the naturally occurring lignan podophyllotoxin. Recent
19
20 research endeavours have shown, however, that other less investigated organisms such as
21
22 marine invertebrates or endophytic fungi harbour a wealth of structurally unprecedented and
23
24 pharmacologically highly active compounds that can likewise provide important drug leads
25
26
27 for the future.
28
29

30
31 Endophytic fungi spend the whole or part of their life cycle colonizing healthy tissues of their
32
33 host plants, typically causing no apparent symptoms of disease.¹¹ This colonization is
34
35 believed to contribute to host plant adaptation to biotic and abiotic stress factors,¹²⁻¹⁵ which in
36
37 many cases has been correlated with fungal natural products. For instance, a vast array of anti-
38
39 proliferative secondary metabolites is hitherto reported from endophytic fungi.¹⁶ Examples
40
41 include the farnesyl-protein transferase inhibiting chaetomelic acids A and B, isolated from
42
43 endophytic *Chaetomella acutisea*,¹⁷ pro-apoptotic and c-Myc down-regulating secalonic acid
44
45 D from the mangrove endophytic fungus ZSU44,¹⁸ heat shock protein (HSP90) inhibiting
46
47 radicicol from *Chaetomium chiversii*,¹⁹ and DNA polymerase inhibiting kasanosins A and B
48
49 from *Talaromyces* sp..²⁰
50
51

52
53 It has been hypothesized that endophytes that survive under harsh environmental conditions
54
55 should be prioritized for bioprospecting^{10,21,22} as stress factors are known to induce
56
57 biosynthetic pathways leading to bioactive metabolites. Mangrove swamps with their high
58
59 salinity and periodical changes in tidal submergence represent one of the most stressful
60

habitats for host plants and endophytes alike. Hence, endophytes from Mangrove plants have recently attracted considerable attention from natural products chemists looking for new inspirations from nature.²³⁻²⁷ The present study focuses on the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* that was isolated from leaves of the mangrove plant *Sonneratia caseolaris* growing in South China. The genus *Phomopsis* contains more than 900 species that occur in a wide range of habitats with some of them known as endophytes.²⁸ Endophytic species of *Phomopsis* are known to produce a great variety of bioactive natural products,²⁹⁻⁴¹ including the tremorgenic mycotoxins paspalitrems A and C, the actin-binding cytochalasins,⁴² which are potent inhibitors of microtubule assembly, and xanthone derivatives such as phomoxanthone A (**1**).^{17,26-29} Our interest in *P. longicolla* was aroused by the strong inhibitory activity of a crude EtOAc extract (dose: 10 μ g/mL) of the endophyte in a MTT assay using the mouse lymphoma cell line L5178Y (data not shown). Subsequent chromatographic separation of the extract yielded eight natural products including the new 12-deacetylphomoxanthone A (**4**), phomo-2,3-dihydrochromone (**5**), isomonodictyphenone (**6**), in addition to phomoxanthone A (**1**) (Figure 1), whereas dicerandrol B (**2**) and C (**3**), monodictyphenone (**7**) and endocrocin (**8**) have been described previously. In addition, five semi-synthetic derivatives (**9a-11**) were obtained following acidic or alkaline hydrolysis of phomoxanthone A (**1**) (Figure 1). All compounds were unequivocally identified based on a combination of multidimensional NMR and MS data, and comparison with the literature. The absolute configuration of **1** was revised by X-ray crystallography compared to the originally reported configuration,⁴³ and those of **2-4** were established for the first time by CD calculation and comparison with **1**. The dimeric tetrahydroxanthone derivatives **1-4** showed strong inhibition of lymphoma cell line L5178Y proliferation, with phomoxanthone A (**1**) as the most active compound. Interestingly, the activity of phomoxanthone A extended also to several other human cancer cell lines including cancer cells that are resistant to the well known chemotherapeutic drug cisplatin making this compound an interesting candidate for further

studies. The cytotoxicity of **1** displayed selectivity towards cancer cells, as it was found to be over 100-fold less toxic to healthy blood cells than to lymphoma cell lines. We could also show for the first time that the cytostatic activity of **1** is due to its pro-apoptotic potential. Phomoxanthone A (**1**) followed by the less active dicerandrols B (**2**) and C (**3**) furthermore showed a clear upregulation of murine CD69⁺ T and NK cells, as well as of macrophages, indicating that **1** exhibits a dual efficacy in combating cancer cells through induction of apoptosis and activation of the immune system which could help in fighting tumour resistance during chemotherapy.

Results and Discussion

The ethyl acetate extract of *Phomopsis longicolla* following cultivation on rice solid medium was subjected to column chromatography using silica gel, Diaion HP20 and Sephadex LH-20, as alternating stationary phases, followed by semi-preparative HPLC for final purification. The tetrahydroxanthone dimer phomoxanthone A (**1**) (Figure 1) was obtained as the major constituent upon fractionation of the crude extract. Compound **1** had already been reported from *Phomopsis* sp. before with (aS, 5*R*, 6*R*, 10a*R*, 5'*R*, 6'*R*, 10a'*R*) configuration,^{43,44} which was revised in this study. In addition, the known tetrahydroxanthone dimers dicerandrol B (**2**)⁴⁵ and C (**3**)⁴⁵ (Figure 1) were readily identified by detailed analyses of their mass, 1D and 2D NMR spectra and by comparison with published data.

For **2** and **3** only the relative configuration had been published so far. Their absolute configurations have now been determined by TD-DFT ECD calculations. Dicerandrol B (**2**) has 2,2'-linkage of the two slightly different homochiral monomeric units, which similarly to secalonic acid F,⁴⁶ is expected to allow interconversion of the *P* and *M* helicity forms at room temperature, since the 1- and 1'-OH groups in *ortho* positions do not impose sufficient steric hindrance to interrupt free rotation about the biaryl axis. In order to exclude the possibility of axially chiral atropisomers and to estimate the rotational barrier around the C2-C2' bond,

torsional scans were performed on the $\omega_{C-1',C-2',C-2,C-1}$ angle from the lowest-energy conformers of *P* and *M* helicity *in vacuo* (Figure 2). The scans started from the two low-energy conformers (A and B in Figure 2) gave approximately the same results showing two energy barriers with different energies. Then transition state calculations were run at the two maxima, which identified the energy barrier of the lower transition state (TS1) as 20.5 kJ/mol and that of the higher one as 70.9 kJ/mol (Figure S1). The 20.5 kJ/mol energy barrier indicated that the *P* and *M* helicity forms can freely equilibrate at room temperature and they appear as conformers with different populations. The *P* and *M* helicity conformers are expected to produce different ECD curves and hence their populations are decisive on the experimental solution ECD spectrum. The populations of the *P* and *M* helicity conformers are governed by the central chirality elements and their accurate estimation by conformational analysis is crucial for the agreement of the computed and experimental ECD spectra. Dicerandrol B (**2**) showed a broad positive CE at 373 nm with shoulder at 344 and 328 nm, and three negative CE at 268, 233 and 198 nm. The solution TDDFT ECD approach was pursued to determine its absolute configuration. The initial MMFF conformational search of the arbitrarily chosen (*5R,6R,10aR,5'R,6'R,10a'R*)-**2** resulted in 84 conformers in a 21 kJ/mol energy window, the DFT reoptimization of which yielded 11, 7 and 11 conformers at B3LYP/6-31G(d) *in vacuo*, B3LYP/TZVP with PCM model for acetonitrile and M06/TZVP⁴⁷ with PCM model for MeCN, respectively. The three methods of conformational analysis applied for the optimizations yielded similar sets of conformers with the predominant population of the *M* helicity conformers (negative $\omega_{C-1',C-2',C-2,C-1}$ torsional angle). For instance, the B3LYP/TZVP reoptimization with PCM model for acetonitrile resulted in seven conformers above 2% population (Figure S2). The lowest-energy conformer had *M* helicity with -122.3° $\omega_{C-1',C-2',C-2,C-1}$ torsional angle and 30.8% population, and conformer C and D-F had also *M* helicity with slightly different orientation of the acetoxy groups. Conformer B had

P helicity with +124.75° torsional angle and 21.8% population and conformer B (2.0%) had also *P* helicity. The overall population of the *M* helicity conformers was found 56.6%, while that of the *P* helicity ones 23.8%. The C-5 and C-10a (C-5' and C-10a') substituents are *trans-diaxial* in all conformers, and the C-6 (C-6') methyl group adopts equatorial orientation. The Boltzmann-averaged ECD spectra were calculated with TZVP basis set and three functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) for the three sets of solution conformers of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**2**. The *M* and *P* helicity conformers had opposite CEs for the two high-energy transitions but all the conformers had a negative CE around 330 nm. The Boltzmann-averaged ECD spectra were near mirror image of the experimental spectrum (Figure 3A), which allowed the determination of absolute configuration as (5*S*,6*S*,10*aS*,5'*S*,6'*S*,10*a'S*).

Dicerandrol C (**3**) is a homodimer and the acetoxy derivative of dicenrandrol B (**2**) but interestingly it has negative CEs at 373 and 365 nm, opposite to that of **2**. In order to identify the origin of their different ECDs, TDDFT calculations were performed. The MMFF conformational search of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**3** resulted in 71 conformers in a 21 kJ/mol energy window, the DFT reoptimization of which yielded 11 and 17 conformers at B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* and M06/TZVP with PCM model for MeCN, respectively (Figure S3). Both the gas phase and the PCM model ECD calculations showed nearly mirror-image spectra to the experimental one but the lowest-energy negative transition could not be predicted well in the averaged spectra. However, the ECD spectra of the lowest-energy conformers obtained at both levels, showed the negative CE above 340 nm, supporting further the mirror-image relationship of the calculated and the measured ECD spectra. This finding also suggests that the population of the lowest-energy conformers may have been underestimated at both levels of theory. The lowest-energy conformer of the M06/TZVP reoptimization with PCM model had *P* helicity with +61.3° $\omega_{C-1',C-2',C-2,C-1}$ torsional angle. In the B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* optimization, the lowest-energy conformer has *P* helicity with

+132.1° dihedral angle and overall population of the *P* helicity conformers totals 47.3%, while that of the *M* helicity ones 29.9%. The additional acetoxy group changed the preferred sign and value of the biaryl dihedral angle, and this conformational change is responsible for the different ECD spectra of **2** and **3**. (*5R,6R,10aR,5'R,6'R,10a'R*)-**3** produced near mirror-image Boltzmann-averaged ECD spectra of the experimental one at the three levels of ECD calculations, which allowed the assignment of the absolute configuration as (*5S,6S,10aS,5'S,6'S,10a'S*) (Figure 3B).

The all (*S*) absolute configuration of dicerandrol B and C prompted us to reinvestigate the absolute configuration of phomoxanthone A (**1**).⁴³ Since our phomoxanthone A sample was isolated together with dicerandrol B and C, it was expected to contain monomers with all (*S*) absolute configuration as well. The recent phomoxanthone sample showed the same specific rotation and ECD data as the previously reported one, for which (*aS,5R,6R,10aR,5'R,6'R,10a'R*) absolute configuration had been assigned.⁴³ Theoretically, it was possible that the recent phomoxanthone A sample has (*aS,5S,6S,10aS,5'S,6'S,10a'S*), since the chiroptical parameters are determined by the axial chirality. In order to clarify this issue, the X-ray analysis of our phomoxanthone A sample was initiated.

In the previous study⁴³ phomoxanthone A (**1**) crystals were afforded as yellowish needles from a dichloromethane/diethyl ether solution. It was reported that **1** crystallized in space group *P2*₁ with two independent but geometrically identical molecules per asymmetric unit, as well as two solvent water molecules. X-ray analysis of these crystals revealed only the relative configuration of the stereogenic elements, whereas the absolute configuration of the compound was deduced based on semiempirical ECD calculation of the solid-state conformers.⁴³ The authors noted that "in the absence of significant anomalous scattering effects, the Flack parameter is essentially meaningless. Accordingly, Friedel pairs were merged."

In the present study, **1** also crystallized in the non-centrosymmetric space group $P2_1$ from ethyl acetate solution but with only one phomoxanthone A molecule in the asymmetric unit (Figures 4 and S4) and one water and one ethyl acetate solvent molecule in the unit cell. We could now determine the absolute structure from anomalous dispersion with Cu-K α radiation using the Flack parameter.⁴⁸⁻⁵¹ Friedel pairs were not merged. The absolute configuration of phomoxanthone A (**1**) was determined as (a*R*, 5*S*, 6*S*, 10a*S*, 5'*S*, 6'*S*, 10a'*S*), and thus enantiomeric to the previously reported absolute configuration (Figures 1 and S5). Accordingly, the previously reported absolute configuration of **1** has to be revised. In order to reveal the origin of the previous wrong configurational assignment by ECD calculation, TDDFT ECD calculations were performed at 3 levels of theory (B3LYP/TZVP, BH&HLYP/TZVP and PBE0/TZVP) on the previous and recent X-ray structures of **1**. Since the previous assignment was made by a semiempirical ECD method, ECD spectra of the B3LYP/6-31G(d) optimized and original X-ray structures of **1** were also calculated by the semiempirical ZINDO method for comparison. All DFT methods applied to the optimized and original X-ray geometries of (a*S*, 5*R*, 6*R*, 10a*R*, 5'*R*, 6'*R*, 10a'*R*)-**1** gave opposite effects to the negative 341 and the positive 316 nm CEs of the solution ECD spectrum as well as to the intense negative CEs at 228 and 222 nm when they were red-shifted by 12 nm (Figure 5). In contrast, the agreement with the solid-state ECD spectrum was poor and the computed low-energy negative transition had no oppositely signed counterpart in experimental solid-state ECD spectrum (Figure S6). The 342 nm negative CE of the solution ECD spectrum disappeared in the solid-state ECD spectrum, which is most likely due to intermolecular exciton coupled interaction in the solid-state. The computed ZINDO spectra achieved very poorly compared to the DFT methods and spectra had to be shifted with about 100 nm. The intermolecular interactions in the solid-state and the missing negative band of the solid-state ECD spectrum could lead to the wrong configurational assignment of phomoxanthone A during the former configurational assignment by ECD calculation. It has to be noted as well

that even the comparison of the DFT computed ECD spectra of the X-ray geometry with the solid-state experimental spectrum would not allow drawing an unambiguous conclusion.

The new compound **4** has the molecular formula $C_{36}H_{36}O_{15}$, as determined from HRESIMS (m/z 709.2727 $[M+H]^+$), showing a mass difference of 42 amu compared to **1**, which corresponds to the absence of an acetyl moiety. In addition, UV spectra of **4** were almost identical to those of **1**, indicating that both compounds share very similar structural scaffolds. The 1H NMR spectrum of **4** exhibited a similar set of signals as observed for **1**, but only three acetyl methyl groups resonating at $\delta(H)$ 1.75 (CH_3 -16'), 2.10 (CH_3 -14) and 2.11 ppm (CH_3 -14') (Table 1). ^{13}C NMR and DEPT spectra revealed the presence of 36 carbon atoms in total, including signals for only five carbonyl groups (Table 1). The structure was further confirmed by thorough analysis of 2D NMR spectra. The position of the acetyl functions was realized from 3J correlations of H-5/5' to C-13/13' and of H₂-12' to C-15', thus indicating the loss of the acetyl function present at 12-OH in **1**. Furthermore, ROESY correlations between H-5/5', H-6/6' and H₂-12/12' indicated their cofacial orientation. Analysis of coupling constants indicated that H-6 ($J_{6,7\beta} = 10$ Hz) and H-5 ($J_{5,6} = 1.7$ Hz) are in axial and equatorial positions, respectively. Compound **4** was thus identified as the new natural product 12-deacetylphomoxanthone A (Figure 1). The ECD spectrum of **4** was found quite different from that of phomoxanthone A (**1**) above 240 nm. A broad positive CE at 346 nm and weak negative plateau between 274 and 310 nm were observed in **4** instead of the negative 341 and the positive 316 nm CEs of **1**. These differences were attributed to the lack of the acetoxy group, which changed the preferred biaryl dihedral angle as demonstrated on the examples of dicerandrol B and C.

The HRESIMS of the new compound **5** showed the molecular ion peak at m/z 289.0707 $[M+H]^+$ indicating the molecular formula $C_{15}H_{12}O_6$. The 1H NMR spectrum (Table 2) exhibited two aromatic *meta* coupled protons at $\delta(H)$ 6.88 (H-6) and 6.73 (H-8) ppm, one

olefinic proton singlet at $\delta(\text{H})$ 6.27 (H-5') ppm, one aliphatic oxygenated methylene group at $\delta(\text{H})$ 5.15 (H₂-2) ppm, one methyl group at $\delta(\text{H})$ 2.38 (4'-CH₃) ppm and one methoxy group at $\delta(\text{H})$ 3.91 (7-OCH₃) ppm. The ¹³C NMR spectrum (Table 2) displayed 15 carbon atoms, including a keto group, an ester carbonyl group, ten olefinic carbon signals including four oxygenated carbons, one oxygenated methylene, one methoxy and one methyl group. The COSY spectrum revealed the *meta* coupled protons H-6 and H-8, as well as a long range coupling between 4'-CH₃ and H-5'. HMBC measurement confirmed the presence of a chromone moiety from the observed correlations of H-8 to C-4a, C-6, C-7 and C-8a, of H-6 to C-4a, C-5, C-7 and C-8, and of H₂-2 to C-1', C-4, C-4a and C-8a. The oxofuranylidene moiety was deduced from correlations of H-5' to C-2, C-3, C-4, C-3' and 4'-CH₃, as well as of 4'-CH₃ to C-3' and C-5'. The position of the methoxy group was confirmed by its correlation to C-7. Furthermore, analysis of the ROESY spectrum allowed the assignment of the stereochemistry around the double bond C-3=C-1'. The absence of a cross peak between H₂-2 and H-5' indicated spatial separation of these protons and thus an (*E*)-configuration of the double bond in **5**, for which we suggest the name phomo-2,3-dihydrochromone (Figure 1). Compounds **6** and **7** shared the same molecular formula as indicated by their HRESIMS data (m/z 289.07028 [M+H]⁺) indicating the molecular formula C₁₅H₁₂O₆ for both compounds. ¹H and ¹³C NMR, COSY and HMBC data (Table 3) indicated that **7** was identical and **6** was closely related to the known monodictyphenone.⁵² Both compounds differed with regard to the position of the methyl group. Based on the HMBC correlations of CH₃-11 to C-5, C-6 and C-7, the methyl group was unambiguously attached at C-6 of the symmetric dihydroxyphenyl moiety in **6**, in contrast to **7** where the methyl substituent was located at C-3. This could be explained by cleavage of the presumable anthraquinone precursor emodin either between C-4a and C-10 or C-10a and C-10 resulting in **6** or **7**, respectively (Scheme 1). Accordingly, **6** was identified as a new natural product for which we suggest the name isomonodictyphenone (Figure 1). In addition to the previously described natural products, the known endocrocin (**8**)

was isolated and identified by comparison of its UV, NMR and mass spectral data with published values.^{53,54}

The biosynthetic relationship between secondary metabolites of polyketide origin, including monomeric and dimeric xanthone derivatives has been the subject of intensive investigations.^{21,55-57} The polyketides isolated in this study from *P. longicolla* are assumed to be derived from a C₁₆-octaketide, which undergoes condensation and cyclisation to yield anthraquinone precursors, such as endocrocin (**8**) or emodin even though the latter was not isolated in this study. Emodin may be enzymatically transformed into monodictyphenone (**7**) by oxidative ring opening⁵⁸⁻⁶² between C-4a and C-10. Isomonodictyphenone (**6**) most likely originates in the same way by cleavage of the covalent C-10—C-10a bond of emodin. Benzophenones can be enzymatically converted into xanthenes by oxidative phenolic coupling, followed by dimerization to yield phomoxanthenes, dicerandrols and similar compounds, according to the proposed biosynthetic relationships of the secalonic acids described by Kurobane *et al.*⁵⁷ Breinholt *et al.* showed that the triketide xanthofusin emerges from an aromatic precursor by oxidative ring opening,⁶³ which may explain the formation of the oxofuranylidene substructure in phomo-2,3-dihydrochromone (**5**). Accordingly, a plausible biosynthetic pathway of the polyketides isolated in this study could be depicted as shown in Scheme 1.

To increase the chemical diversity of congeners for a first evaluation of structure-activity relationships, the natural product phomoxanthone A (**1**) was subjected to acidic or alkaline hydrolysis. Acidic hydrolysis, according to the method described by Isaka *et al.*,⁴⁴ resulted in formation of the previously described deacetyl analogue (**11**) of **1**. On the other hand, alkaline hydrolysis of **1** with alcoholic NaOH at room temperature yielded the new derivatives **9a-9c**, whereas treatment of **1** with aqueous NaOH under reflux resulted in the formation of a single new derivative (**10**). By analogy with **11**, **9a-9c** showed a difference of 168 amu compared to **1** upon mass spectral analysis, corresponding to the loss of four acetate functions. However,

inspection of NMR data indicated further structural rearrangements in the core structures of

9a-9c.

The molecular formula of **9a** was assigned as C₃₀H₃₀O₁₂ on the basis of HRESIMS showing the molecular ion peak at m/z 583.18110 [M+H]⁺. The ¹H NMR spectrum revealed two almost identical sets of signals, indicating an asymmetrical dimeric structure composed of closely related monomers. It exhibited two aromatic and two aliphatic hydroxy groups resonating at δ (H) 11.97 (1-OH), 11.72 (1'-OH), 5.49 (12-OH) and 5.43 ppm (12'-OH). Signals of the aromatic protons appeared at δ (H) 7.35 (H-3), 7.33 (H-3'), 6.52 (H-4) and 6.50 (H-2') ppm, thus indicating two sets of *ortho*-coupled protons as found in the biaryl units of other phomoxanthone derivatives.⁴⁴ In total, six methylene groups were detected at δ (H) 3.71/3.65 (H₂-12), 3.66/3.58 (H₂-12'), 3.21/2.86 (H₂-8a'), 3.16/3.05 (H₂-8a), 2.77/2.23 (H₂-7) and 2.13/1.96 ppm (H₂-7'). The remaining signals were assigned to two oxymethine protons at δ (H) 4.37 (H-5) and 4.22 (H-5') ppm, two tertiary methine groups at δ (H) 2.86 (H-6) and 2.51 (H-6') ppm, and two methyl groups at δ (H) 1.16 (CH₃-11) and 1.01 (CH₃-11') ppm. Thorough analyses of HMBC spectral data allowed the construction of two partially saturated γ -pyrone moieties annulated to the aromatic rings. The involved methylene groups (CH₂-8a/8a') showed correlations to the sp^2 carbons C-9a/9a', the carbonyl carbons C-9/9', as well as the sp^3 carbons C-10a/10a'. According to the molecular formula, the unsaturation index of **9a** is 16. The presence of four carbonyl groups (δ (C) 197.7 (C-9'), 197.6 (C-9), 175.9 (C-8') and 175.7 (C-8) ppm) and the tetracyclic biaryl scaffold accounted for 14 elements of unsaturation, thus indicating that the remaining part of **9a** should include two aliphatic ring systems. The structures of the latter were established by exhaustive analyses of the 2D NMR spectral data. Correlations of the tertiary methine protons H-6/6' to the oxymethines H-5/5', the methylene groups CH₂-7/7', and the methyl groups CH₃-11/11' were observed in the COSY spectrum, thus establishing the fragment CH-5/5'-CH-6/6'(CH₃-11/11')-CH₂-7/7'. Moreover, the HMBC spectrum provided a full set of all possible ²*J* and ³*J* correlations for H-

5/5', H-6/6' and H₂-7/7', confirming the fragment deduced from COSY and allowing the construction of two 3-methyl- γ -butyrolactone moieties based on the correlations observed from H-5/5' and H₂-7/7' to C-8/8'. Both 3-methyl- γ -butyrolactone rings were found to be linked to the tetracyclic biaryl skeleton at C-10a/10a' as indicated by the 3J correlations of the tertiary methine protons H-5/5' to C-10a/10a'. The 2,4'-linkage in the biaryl system was proven by HMBC correlations of H-3 to C-4', of H-3' to C-2, as well as of 1/1'-OH to C-1/1', C-2/2' and C-9a/9a'. Both oxymethine protons (H-5/5') were coupled to the corresponding tertiary methine protons (H-6/6') with coupling constants ($J_{5,6}$ = 4.7 and $J_{5',6'}$ = 3.9 Hz) characteristic for *trans* orientated protons in such ring systems.⁶⁴ This finding was supported by detailed analysis of the ROESY spectrum showing strong correlations between H-5/-5' and the methyl protons (H₃-11/-11'), thus unambiguously confirming their *cis* orientation. In addition, the ROESY correlations between the methylene groups CH₂-12/12' and H-8a β /8a' β , H-5/5', H-6/6' and H₃-11/11', as well as the absence of strong correlations to H₂-7/7' indicated an α orientation of the 3-methyl- γ -butyrolactone rings as reported for the structurally related blennolide E.⁶⁵

Compound **9b** showed almost identical UV, HRESIMS, as well as 1D and 2D NMR spectra compared to those of **9a**. The presence of the same set of signals in the ^1H and ^{13}C NMR spectra indicated the same dimeric structural scaffold. Furthermore, ROESY spectra of **9b** revealed the same relative stereochemistry as that of **9a**. However, the distinct difference in the measured $[\alpha]_{\text{D}}$ values (+6° for **9a** and -28° for **9b**) indicated stereochemical differences between the two molecules. Their solution ECD spectra had opposite CEs below 330 nm and positive CEs at about 350 nm, which suggested that they are atropodiastereomers with the same absolute configuration in the chromanone ring. In contrast to **9a** and **9b**, compound **9c** showed only one set of ^1H and ^{13}C NMR signals (Table 4) indicating a symmetrical dimer. Analysis of 2D NMR spectra revealed the same monomeric building units as those of **9a** and **9b**. However, a 2,2'-linkage within the biaryl system was established by the HMBC

correlations observed from H-4/4' to C-2/2', C-4a/4a' and C-9a/9a', from H-3/3' to C-1/1', C-2/2' and C-4a/4a', as well as from 1/1'-OH to C-1/1', C-2/2' and C-9a/9a'. Based on the $[\alpha]_D$ value ($[\alpha]_D^{20} = -68^\circ$) and the ROESY spectrum, showing the same correlations as observed for **9a** and **9b**, the relative configuration of **9c** was established as shown in Figure 1.

The molecular formula of **10** was determined from HRESIMS data as $C_{30}H_{26}O_{10}$ (m/z 547.1603 $[M+H]^+$), implying 18 degrees of unsaturation and a 204 and 36 amu decrease in molecular weight compared to **1** and **9a-c**, respectively. Detailed analysis of the NMR spectra of **10** revealed that the compound is a symmetrical dimer (Table 5). Furthermore, comparison of 1D and 2D NMR spectral data of **10** to those of **9c** illustrated similar structural features of both compounds. The symmetrical biaryl system, including four *ortho* coupled protons at $\delta(H)$ 6.51 (H-2/2') and 6.94 (H-3/3') ppm, as well as the 3-methyl- γ -butyrolactone moieties, were retained in **10**. The corresponding signals of the tertiary methine, methylene and oxymethine protons of the lactone moieties appeared at $\delta(H)$ 2.65 (H-6/6'), 2.43/2.76 (H-7/7') and 5.05 (H-5/5') ppm, respectively. A significant difference in the 1H NMR spectrum of **10** compared to that of **9c** was the disappearance of the methylene groups CH₂-8a/8a' and CH₂-12/12' and the presence of two additional signals, which were assigned to the olefinic protons at $\delta(H)$ 6.66 (H-8a/8a') and 7.82 (H-12/12') ppm. The ^{13}C NMR spectra of **10** showed 15 signals corresponding to two carbonyl carbons at $\delta(C)$ 176.0 ppm (C-8/-8'), 20 olefinic carbons at $\delta(C)$ 155.4 (C-1/1'), 152.1 (C-4a/4a'), 149.3 (C-9/9'), 139.7 (C-12/12'), 131.8 (C-3/3'), 123.5 (C-10a/10a'), 118.5 (C-4/4'), 109.3 (C-8a/8a'), 107.4 (C-2/2') and 106.8 ppm (C-9a/9a'), two oximethines at $\delta(C)$ 80.3 ppm (C-5/5'), and six aliphatic carbons at $\delta(C)$ 36.9 (C-6/6'), 36.6 (C-7/7') and 15.9 (C-11/11') ppm. The HMBC spectrum disclosed correlations of H-8a/8a' and H-12/12' to C-12/12' and C-8a/8a', respectively, and to both C-9/9' and C-10a/10a'. These data allowed construction of two furan rings, which were located between the already identified structural elements as evidenced by 3J correlations from H-8a/8a' to C-5/5', from H-6/6' to C-10a/10a', and by 4J correlations from the aromatic protons H-2/2' to C-9/9'.

Furthermore, the 4,4'-linkage of the aromatic rings in **10** was deduced from the strong 3J correlation of H-3 and H-3' to C-4' and C-4, respectively. In analogy to **9a-9c**, strong ROESY correlations between the oxymethine protons (H-5/5') and the methyl groups (H₃-11/11') confirmed the *trans* orientation of H-5/5' and H-6/6' in the terminal lactone rings.

Initial experiments employing a crude EtOAc extract of *P. longicolla* following cultivation on rice resulted in complete inhibition of the growth of the murine lymphoma cell line L5178Y (at a dose of 10 $\mu\text{g/mL}$) as indicated by a MTT assay (data not shown). When compounds **1-11** were assayed for their activity in the same cell line (Table 6) the dimeric tetrahydroxanthone derivatives (**1-4**) were found to be active with IC₅₀ values ranging from 0.3 – 10 μM (Table 6). These results were in accordance with the published cytotoxic activity of **1** towards mouth epidermal carcinoma (KB) and lymphoma (BC-1) cells, and of **2** and **3** against lung (A549) and colon (HCT116) carcinoma cells.^{44,45} The remaining compounds showed no activity. The 4,4'-linked substances phomoxanthone A (**1**) and 12-deacetylphomoxanthone A (**4**) featured IC₅₀ values of 0.3 and 2.8 μM , respectively whereas values of 1.1 and 10.0 μM were detected for the corresponding 2,2'-linked derivatives dicerandrols C (**3**) and B (**2**). These results indicated that the cytotoxic potential of this class of compounds is enhanced by a 4,4'-linkage of the tetrahydroxanthone monomers, and decreased upon loss of acetyl groups (**1** vs. **4** and **2** vs. **3**). Deacetylphomoxanthone A (**11**) showed no activity against L5178Y mouse lymphoma cells, which may at least partly be due to the lower lipophilicity and hence hindered transmembrane diffusion of the deacetylated compound compared to the acetylated phomoxanthone A (logP of **1** 2.230 vs. logP of **11** 0.125). Alternatively, phomoxanthone A (**1**) may have a favoured pharmacophore whereas the deacetylated congener **11** may have no or less affinity to the respective target. Structural modifications of phomoxanthone A (**1**) caused by alkaline hydrolysis which led to compounds **9a - 10** resulted in a complete loss of activity (Table 6), implying that the dimeric tetrahydroxanthone core structure is mandatory for cytotoxic activity. Phomoxanthone A

(1), which proved to be the most active compound isolated in this study, was subjected to further *in vitro* assays using different human cancer cell lines including cisplatin-sensitive as well as resistant cells (Table 6). The chosen cell lines included human ovarian carcinoma A2780, human tongue Cal27, and human esophagus Kyse510 cell lines. Remarkably, 1 showed almost the same potency against both sensitive and resistant cell lines (Table 6). In order to probe the selectivity of 1 against cancer vs. normal cells, we tested its effect on the human Burkitt's lymphoma cell line DG75 and the human T cell lymphoma cell line Jurkat versus healthy human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Results showed that 1 is highly selective against cancer cells, as it is over 100-fold less toxic to PBMCs (IC_{50} 61.2 μ M) compared to DG75 (IC_{50} 0.1 μ M) and Jurkat (IC_{50} 0.5 μ M) (Table 6).

In order to characterize the cytotoxic effect of the dimeric tetrahydroxanthone derivatives in more detail, we analyzed the apoptosis-inducing potential of the lead compound phomoxanthone A (1) for the first time. Apoptosis is the programmed form of cell death and central to many developmental and immunological processes. It is accompanied by specific molecular events including the activation of caspases, which are aspartate-directed cysteine proteases, or fragmentation of chromosomal DNA. First we assessed the amount of apoptotic hypodiploid nuclei upon phomoxanthone A-treatment of human DG75 B lymphocytes or Jurkat T lymphocytes, respectively. Hypodiploid nuclei are indicative for DNA fragmentation caused by the activation of caspases. Phomoxanthone A (1) significantly increased the amount of hypodiploid nuclei in both cell lines at a concentration of 1 μ M (Figure 6A). This effect could be entirely blocked by the addition of the caspase-inhibitor N-(2-quinoly)valyl-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy)methyl ketone (Q-VD-Oph) (Figure 6A). Next, we analyzed the activation of caspases by the detection of the proteolytic processing of the caspase-substrate poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by immunoblotting. Cleavage of PARP could be detected in both DG75 B cells and Jurkat T cells upon phomoxanthone A-treatment, and again this effect could be entirely blocked by the addition of Q-VD-Oph (Figure 6B). Finally,

we assessed the apoptosis-inducing capacity of compounds **1-11** by flow cytometric analyses of hypodiploid nuclei in Jurkat T cells. The dimeric tetrahydroxanthone derivatives were the most potent substances, thus confirming the data obtained from the cytotoxicity assay with the L5178Y cell line (Table 6). The 4,4'-linked derivatives phomoxanthone A (**1**) and 12-deacetylphomoxanthone A (**4**) showed the highest activity (Figure 6C). Again, structural modifications as in **9a-9c** and **11** abrogated the pro-apoptotic effect. Collectively, these results indicate that the dimeric tetrahydroxanthone core structure is essential for the induction of apoptosis.

The dimeric tetrahydroxanthone derivatives showing proapoptotic activities (Figure 6) were further tested for their ability to activate immune effector functions as measured by upregulation of cell type specific activation markers on specific murine immune cell subpopulations (Figure 7A). In analogy to the findings of the cytotoxicity assays, titrated concentrations of the two 4,4'-linked dimeric tetrahydroxanthone derivatives phomoxanthone A (**1**) and 12-deacetylphomoxanthone A (**4**) induced the most prominent upregulation of the early activation antigen CD69 on primary murine T lymphocytes. Specifically, a 1.8 fold and a 1.4 fold increase of the percentage of CD69⁺ T cells was observed, respectively, after 12 hrs incubation with these substances at a concentration of 1 μ M. A 2,2'-linkage of the tetrahydroxanthone monomers completely abolished the T cell activatory function or induced CD69 upregulation only at the highest concentration of 10 μ M, as for **2** and **3**, respectively. Furthermore, complete absence of acetyl groups (**11**) blunted the activation ability of the 4,4'-linked dimers. The positive correlation of lipophilicity with the T cell activation capacity of the substances (**1** vs. **11**) indicates the necessity of passing cellular membrane compartments rather than an interaction with cell surface molecules as the underlying mechanism of activation. Similar relative activation potentials for the studied substances could be found for primary murine NK cells and macrophages (M Φ) as measured by upregulation of CD69 and MHC class II, respectively, while none of the compounds tested were able to induce

upregulation of the costimulatory molecule CD86 on primary murine B lymphocytes (Figure 7B-D). Accordingly, in addition to their direct cytotoxic and pro-apoptotic activity, as shown above, the 4,4'-linked dimeric tetrahydroxanthones **1** and **4** exhibit an intrinsic immunostimulatory capacity on primary T cells, NK cells and MΦ by yet unknown signal transduction pathways. This dual activity offers interesting synergistic mechanisms to increase the efficiency of cancer treatment and to counteract the establishment of resistance pathways in cancer cells, and makes phomoxanthone A (**1**) an interesting candidate for further studies.

Experimental Section

General Experimental Procedures. HPLC: Dionex system Ultimate 3000 pump and Ultimate 3000 DAD; column Eurospher 100-C₁₈, [5 μm; 125 mm x 4 mm], Knauer; linear gradient 0.02% H₃PO₄ in H₂O and MeOH; flow-rate 1.0 mL/min. Semi-preparative HPLC: Merck-LaChrom L-7100 pump; Merck-LaChrom L-7400 UV-detector; Clarity Lite V2.7 analysis software, DataApex; column Eurospher 100-C₁₈ [5 μm; 300 mm x 8 mm], Knauer; flow-rate 5.0 mL/min. Optical rotations: Jasco P-2000 polarimeter. 1D- and 2D-NMR Spectra: Bruker-ARX-500 or Avance-DMX-600 spectrometers; at 500 or 600 MHz (¹H) and 125 or 150 MHz (¹³C); δ in ppm, J in Hz. ESIMS: Finnigan-LCQ-Deca mass spectrometer; in m/z. HRESIMS: Micromass-Q-ToF mass spectrometer; in m/z.

Fungal Material and Cultivation. The fungal strain *Phomopsis longicolla* was isolated from fresh healthy leaves of the mangrove tree *Sonneratia caseolaris*, collected in October 2005 in Dong Zhai Gang-Mangrove Garden on Hainan Island, P. R. China, using a protocol previously described.⁶⁶ *P. longicolla* was taxonomically identified according to a previously described method.^{67,68} The sequence data has been submitted to GenBank with accession

number AY857868.1. The fungus was cultivated on solid rice medium (to 100 g commercially available rice was added 100 mL of distilled water and kept overnight prior to autoclaving) at room temperature under static conditions.^{67,68}

Extraction and Isolation. The solid rice culture of *Phomopsis longicolla* was overlaid and extracted with EtOAc, then the solvent was removed under reduced pressure. The crude extract (24.9 g) was washed with dist. water and then fractionated between MeOH 90 % and *n*-hexane. The MeOH-fraction (16.4 g) was then subjected to Diaion HP-20 and eluted using a stepwise gradient system from 100% H₂O to 100% MeOH, and from MeOH/acetone (1:1) to 100% acetone. Promising fractions were subjected to further chromatographic separation using Diaion HP-20 with H₂O, MeOH and acetone as eluting solvents, silica (VLC) with a stepwise gradient system from 100 % *n*-hexane to 100% EtOAc and from 100% DCM to 100% MeOH, or Sephadex LH-20 (100% MeOH or 1:1 DCM/MeOH). If necessary, final purification was performed by semi-preparative HPLC to yield **1** (3.4 g), **2** (5.3 mg), **3** (3.2 mg), **4** (6.1 mg), **5** (3.9 mg), **6** (3.1 mg), **7** (2.1 mg) and **8** (5.4 mg).

Phomoxanthone A (1). Yellowish amorphous granules; $[\alpha]_D^{20} = +83^\circ$ (*c* 0.3, CHCl₃); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 218, 258, 333 nm. ECD (MeCN, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 1.10×10^{-4}): 341 (−7.79) with flat negative plateau up 420 nm, 316 (17.65), 275 (−3.49), 257 (1.33), 228 (−46.79), 208 (−66.22) positive below 197 nm. ECD (86 μ g **1** in 250 mg KCl, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$): 350 (19.16), 324 (32.71), 278 (−2.77), 258 (11.57), 227 (−87.44), 209 (−122.92), positive below 197 nm.

Dicerandrol B (2). Yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ (*c* 0.4, CHCl₃); UV $\lambda_{\max}$ (PDA): 215, 258, 338 nm. ECD (MeCN, $\lambda_{\max}$ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 1.30×10^{-4}): 373br (6.08), 344 sh (2.09), 328sh (2.11), 268sh (−6.42), 233 (−13.74), 198 (−13.2).

Dicernadrol C (3). Yellow amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17^\circ$ (c 0.1, CHCl_3); UV λ_{max} (PDA): 212, 260, 340 nm. ECD (MeCN, λ_{max} [nm] ($\Delta\epsilon$), $c = 0.99 \times 10^{-4}$): 375sh (-3.61), 365 (-3.70), 324 (9.01), 297sh (2.55), 258sh (-9.25), 233 (-16.57), 202 (-14.13).

12-Deacetylphomoxanthone (4). Yellow amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +35^\circ$ (c 0.2, MeOH); UV λ_{max} (PDA): 221, 259, 337 nm. ECD (MeCN, λ_{max} [nm] ($\Delta\epsilon$), $c = 1.26 \times 10^{-4}$): 346br (19.19), 300 (-0.71), 277 (-0.62), 252 (7.07), 226sh (-56.48), 211 (-62.70). ^1H and ^{13}C NMR: Table 1. HR-ESIMS: m/z 709.2127 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{O}_{15}^+$, 709.2127).

Phomo-2,3-dihydrochromone (5). Brown amorphous mass; UV λ_{max} (PDA): 215, 250, 345 nm. ^1H and ^{13}C NMR: Table 2. HR-ESIMS: m/z 289.0707 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6^+$, 289.0707).

Isomonodictyphenone (6). Yellowish powder; UV λ_{max} (PDA): 209, 286 nm. ^1H and ^{13}C NMR: Table 3. HR-ESIMS: m/z 289.0703 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6^+$, 289.0707).

Structural Derivatization of Phomoxanthone A

Alcoholic Alkaline Hydrolysis. A solution of phomoxanthone A (**1**) (30 mg) in ethanolic NaOH (5 mL, 0.5 N) was stirred for 4 h at 23°C followed by dropwise treatment with hydrochloric acid (37 % (m/m)). After reaching pH 4 the solution was neutralized with sodium bicarbonate (*q.s.*), then water (100 mL) was added and the aqueous dilution was extracted three times with EtOAc (30 mL). The combined solvent extracts were evaporated to dryness. The obtained substance mixture was purified by semi-preparative HPLC to yield **9a** (5.6 mg), **9b** (4.0 mg) and **9c** (9.4 mg).

Hydrolysis Product I (9a). Brownish amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6^\circ$ (c 1.1, DMSO); UV λ_{max} (PDA): 251, 360 nm. ECD (MeCN, λ_{max} [nm] ($\Delta\epsilon$), $c = 2.86 \times 10^{-4}$): 357sh (0.39), 306sh (2.08), 285 (3.78), 258 (-0.15), 237 (3.57), 208 (-8.05). ^1H and ^{13}C NMR: Table 4. HR-ESIMS: m/z 583.1810 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_{12}^+$, 583.1810).

Hydrolysis Product II (9b). Brownish amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28^{\circ}$ (c 0.8, DMSO); UV λ_{max} (PDA): 250, 359 nm. ECD (MeCN, λ_{max} [nm] ($\Delta\epsilon$), $c = 2.86 \times 10^{-4}$): 351 (1.23), 306sh (-1.76), 283 (-2.77), 237 (-3.06), 206 (4.01). ^1H and ^{13}C NMR: Table 4. HR-ESIMS: m/z 583.1810 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_{12}^+$, 583.1810).

Hydrolysis Product III (9c). Brownish amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -68^{\circ}$ (c 0.9, DMSO); UV λ_{max} (PDA): 252, 363 nm. ECD (MeCN, λ_{max} [nm] ($\Delta\epsilon$), $c = 2.86 \times 10^{-4}$): 356 (1.01), 285 (0.34), 266 (-0.37), 236 (2.43), 208 (-5.67). ^1H and ^{13}C NMR: Table 4. HR-ESIMS: m/z 583.1810 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_{12}^+$, 583.1810).

Aqueous Alkaline Hydrolysis. A solution of phomoxanthone A (**1**) (50 mg) in aqueous NaOH solution (100 mL, 0.5 N) was heated under reflux for one hour. After cooling, the mixture was adjusted with hydrochloric acid (37 % (m/m)) to pH 5, and then extracted three times by shaking with 30 mL of EtOAc. The combined solvent extracts were evaporated to dryness. The obtained substance mixture was purified by semi-preparative HPLC to yield **10** (4.8 mg).

Hydrolysis Product IV (10). Brownish amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -127^{\circ}$ (c 0.5, DMSO); UV λ_{max} (PDA): 215, 260 nm. ^1H and ^{13}C NMR: Table 5. HR-ESIMS: m/z 547.1603 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_{12}^+$, 547.1599).

Cell Proliferation Assay. Cytotoxicity was tested against the L5178Y mouse lymphoma cell line using the MTT (=3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay.^{69,70} Furthermore, the cytotoxicity was evaluated against the human ovarian carcinoma cell line A2780, the human tongue cell line Cal27, the human esophagus cell line Kyse510, the human T cell lymphoma cell line Jurkat, and the human Burkitt's lymphoma cell line DG75 by a MTT assay as previously described, except that for Jurkat and DG75 incubation

with DMSO at RT for 20 min was used to extract the formazan product from the cells.⁷¹ The A2780 cell line was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). The Cal27 and Kyse510 cell lines as well as Jurkat (#ACC-282) and DG75 (#ACC-83) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany). The cisplatin resistant (CisR) cell lines were generated by exposing the parental cell lines to weekly cycles of cisplatin in a IC_{50} concentration over a period of 24 - 30 weeks as described in Gosepath *et al.*⁷² and Eckstein *et al.*⁷³ All cancer cell lines were grown at 37 °C under humidified air supplemented with 5% CO₂ in RPMI 1640 (A2780, Kyse510, Jurkat, DG75) or DMEM (Cal27) containing 10% fetal calf serum, 120 IU/mL penicillin, and 120 µg/mL streptomycin. The medium for Jurkat and DG75 was additionally supplemented with 1% HEPES. The cells were grown to 80% confluency before using them for the cell proliferation assay.

The selectivity of phomoxanthone A (**1**) cytotoxicity was assessed on PBMCs by trypan blue exclusion assay. Different concentrations of **1** were used to treat cells while the negative control was treated with the same volume of DMSO. At each time course (24 and 48h), 20 µL of the cell suspension were mixed with 20 µL of trypan blue. 20 µL of this mixture were applied to a haemocytometer and observed by a binocular microscope. The unstained cells (viable) were counted in negative control and treated samples and the percentage of viability were calculated from three independent tests.

Apoptosis Assay. DG75 (Burkitt's lymphoma-derived human B cell line; DSMZ #ACC-83) cells or Jurkat (leukemia-derived human T cell line; DSMZ #ACC-282) cells were cultivated in medium containing the indicated concentrations of compounds for 24 hrs and apoptosis was measured. Nuclei were prepared by lysing cells in hypotonic lysis buffer [1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 50 µg/mL propidium iodide] and subsequently analyzed by flow

cytometry. Nuclei to the left of the 2 N peak were considered as apoptotic. Flow cytometric analyses were performed on LSRFortessa (BD Biosciences) using FACSDiva software.

Cell Extracts and Immunoblotting. DG75 B cells or Jurkat T cells were treated with the different compounds at the indicated concentrations for the indicated times. Cells were lysed in lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 2.5 mM NaPP, 10 μ M Na₂MoO₄, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors (P2714, Sigma)] and lysates were clarified by centrifugation at 16,000 g for 10 min. Equal total protein amounts, as determined by Bradford, were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membrane (Millipore). Immunoblot analysis was performed using primary mouse antibodies to PARP (Enzo #BML-SA250) or β -actin (Sigma #A5316), and IRDye[®]800- or IRDye[®]680-conjugated secondary antibodies (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany). Signals were detected with an Odyssey[®] Infrared Imaging system (LI-COR Biosciences).

FACS Analysis of Immune Cell Activation Markers. Spleens of female C57BL/6 mice were digested with collagenase VIII (Roche) and DNase I (Sigma) and homogenized using a cell strainer. Cell suspensions were incubated with the indicated compounds for 12 hrs in DMSO as 1:100 dilutions in medium at the indicated final concentrations. As positive controls cells were stimulated for 12 hrs with 10 ng/mL PMA and 500 ng/mL Ionomycin (both Sigma) or 100 ng/mL LPS (*Salmonella minnesota*, List laboratories). For FACS analysis cells were labelled with the following antibodies: CD11b (M1/70), B220 (Ra3-6B2), CD11c (HL3), CD3 ϵ (145-2C11), CD19 (1D3), CD86 (GL1), CD69 (H1.2F3), MHC class II (AF6-120.1), all from BD Biosciences, and CD49 (DX5) from Ebioscience. DAPI was added for dead cell discrimination. Samples were acquired on a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). T lymphocytes were defined as

CD3 ϵ ⁺CD49⁻, B lymphocytes as B220⁺CD11c⁻, NK cells as CD49⁺CD3 ϵ ⁻, and MΦs as CD11b⁺CD11c⁻.

X-Ray crystallography. Single crystals of phomoxanthone A (**1**) suitable for X-ray diffraction were crystallized from ethyl acetate at room temperature. A single-crystal was mounted on a loop under a polarizing microscope. *Data collection:* Compound **1**: Bruker Kappa APEX2 CCD diffractometer (with microfocus tube), Cu-K α radiation (λ = 1.54178 Å) at 123 ± 2 K, multilayer mirror, ω - and ϕ -scan; data collection with Apex2,⁷⁴ cell refinement and data reduction with SAINT,⁷⁴ experimental absorption correction with SADABS.⁷⁵ *Structure Analysis and Refinement:* The structure of **1** was solved by direct methods using SHELXS-97; refinement was done by full-matrix least squares on F^2 using the SHELXL-97 program suite.⁷⁶ All non-hydrogen positions were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms of two hydroxyl groups and for aromatic CH-, aliphatic CH-, CH₂-, CH₃-groups were positioned geometrically (O-H = 0.84 Å for OH, C-H = 0.95 Å for aromatic CH, C-H = 1.00 Å for aliphatic and olefinic CH, C-H = 0.99 Å for CH₂, C-H = 0.98 Å for CH₃) and refined using riding models with U_{iso}(H) = 1.2 U_{eq}(CH, CH₂) and U_{iso}(H) = 1.5 U_{eq}(O, CH₃). Hydrogen atoms of the other two hydroxyl (C-OH) groups have been found and refined with U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(O).

The absolute structure assignment was based on anomalous dispersion using the Flack parameter.⁴⁸⁻⁵¹ Friedel opposites were not merged. The correct assignment in the absence of any heavy atoms was checked by inverting the structure (MOVE 1 1 1 -1) which then led to a Flack parameter close to 1.

The crystal solvent molecules ethyl acetate and water in the channels of **1** were found highly disordered and could not be properly defined. Hence, the option SQUEEZE in PLATON for Windows⁷⁷⁻⁸⁰ was used to refine the framework structure without the disordered electron

density in the voids. One ethyl acetate and one water molecule per unit cell was squeezed.

With two phomoxanthone molecules in the unit cell then compound **1** should be named as phomoxanthone A hemi(ethyl acetate) hemi-hydrate. The SQUEEZE routine suggested a 277 Å³ (13.8%) cavity in the unit cell with a population of 87 electrons (roughly in agreement with 48 electrons for CH₃C(O)OC₂H₅ and 10 electrons for H₂O) for the solvated form. A PLATON⁷⁷⁻⁸⁰ calc void calculation for the solvent-free form with a probe radius of 1.2 Å gave a total potential solvent area volume of 291 Å³ (14.5%).

The crystal structure is disordered on the O16 and C36 position (the C=O moiety) as part of a torsional disorder of the acetyl group. The respective A atoms and B atoms were refined with about equal occupations and A and B components were separated by a PART instruction. This torsional disorder is due to the presence of only very weak C-H...O interactions in the packing diagram so that it can assume two different orientations (Figure S7). The displacement of the acetyl group does not affect and is independent of the absolute structure assignment.

Crystal data and details on the structure refinement are given in Table S1. Graphics were drawn with DIAMOND,⁸¹ analyses on the O-H...O-hydrogen bonds with PLATON for Windows.⁷⁷⁻⁸⁰ The structural data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC-No. 937755).

Computational section. Mixed torsional/low mode conformational searches were carried out by means of the Macromodel 9.9.223 software using Merck Molecular Force Field (MMFF) with an implicit solvent model for chloroform.⁸² Geometry reoptimizations were carried out at B3LYP/6-31G(d) in vacuo, B3LYP/TZVP with a PCM solvent model for acetonitrile and M06/TZVP level⁴⁷ with the PCM model for acetonitrile. TDDFT ECD calculations were run with various functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) and TZVP basis on the Gaussian 09 package.⁸³ Scans and TS calculations were carried out at the B3LYP/6-31G(d) level in vacuo.

ECD spectra were generated as the sum of Gaussians with 2400 and 3000 cm^{-1} half-height width (corresponding to ca. 13 and 16 nm at 230 nm), using dipole-velocity computed rotational strengths.⁸⁴ Boltzmann distributions were estimated from the ZPVE corrected B3LYP/6-31G(d) energies in the gas phase calculations and from the B3LYP/TZVP and M06/TZVP energies in the solvated ones. For computing rotational barriers the ZPVE corrected B3LYP/6-31G(d) energies were applied. The MOLEKEL software package was used for visualization of the results.⁸⁵

Supporting Information Available: Supplementary figures showing structures of the low- and high-energy transition states for the inversion of the C2-C2' bond of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**2**, solution conformers and populations ($\geq 2\%$) of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**2** and (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**3**, molecular structure of phomoxanthone A (**1**) with determined absolute configuration (different views), previous and re-determined absolute structures of phomoxanthone A (**1**), experimental and calculated ECD spectra of the non-optimized "old" (a*S*,5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*) X-ray structures of **1** *in vacuo*, and section of the packing diagram of phomoxanthone A (**1**). Supplementary tables showing crystal data and structure refinement for **1**, inter- and intramolecular interactions with lengths (Å) and angles (°) in **1**, and selected bond lengths (Å) and angles (°) in **1**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Corresponding Author

*For P.P.: phone, 0049-211-8114163; fax, 0049-211-8111923; email, proksch@uni-duesseldorf.de. For A.H.A.: phone, 0049-211-8114173; e-mail, amal.hassan@uni-duesseldorf.de

Acknowledgement

Financial support by grants of BMBF to P. P. is gratefully acknowledged. T. K. and A. M. thank the Hungarian National Research Foundation (OTKA K105871) for financial support and the National Information Infrastructure Development Institute (NIIFI 10038) for CPU time. R. S. was supported by an AFR fellowship from the Fonds National de la Recherche in Luxembourg. Research at LBMCC is financially supported by the Fondation de Recherche Cancer et Sang, the Recherches Scientifiques Luxembourg association, the Een Haerz fir kriibskrank Kanner association, the Action Lions Vaincre le Cancer association, the European Union (ITN “RedCat” 215009, interreg Iva project “Corena”) and the Télémie Luxembourg. M. D. is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU. We thank Prof. W. E. G. Müller (University of Mainz, Germany) for MTT analysis using the L5178Y cell line.

References

- (1) Halpin, H. A.; Morales-Suárez-Varela, M. M.; Martin-Moreno, J. M. Chronic disease prevention and the new public health. *Public Health Rev.* **2010**, *32*, 120-154.
- (2) Pritchard, J. R.; Lauffenburger, D. A.; Hemann, M. T. Understanding resistance to combination chemotherapy. *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15*, 249-257.
- (3) Loeb, K. R.; Loeb, L. A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 379-385.
- (4) Lippert, T. H.; Ruoff, H.-J.; Volm, M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. *Arzneimittelforschung* **2008**, *58*, 261-264.
- (5) Brichard, V. G.; Lejeune, D. Cancer immunotherapy targeting tumour-specific antigens: towards a new therapy for minimal residual disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8*, 951-968.
- (6) Mantovani, A.; Romero, P.; Palucka, A. K.; Marincola, F. M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* **2008**, *371*, 771-783.
- (7) Marincola, F. M.; Wang, E.; Herlyn, M.; Seliger, B.; Ferrone, S. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 334-341.
- (8) Zitvogel, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Andre, F.; Tesniere, A.; Kroemer, G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1991-2001.
- (9) Kiladjian, J.-J.; Mesa, R. A.; Hoffman, R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* **2011**, *117*, 4706-4715.
- (10) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.
- (11) Bacon, C. W.; White, J. F. Coevolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. In *Microbial Endophytes*, Bacon, C. W.; White, J. F., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp 341-388.

- (12) Redman, R. S.; Sheehan, K. B.; Stout, R. G.; Rodriguez, R. J.; Henson, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **2002**, 298, 1581.
- (13) Giordano, L.; Gonthier, P.; Varese, G. C.; Miserere, L.; Nicolotti, G. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Divers.* **2009**, 38, 69-83.
- (14) Bae, H.; Sicher, R. C.; Kim, M. S.; Kim, S.-H.; Strem, M. D.; Melnick, R. L.; Bailey, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* **2009**, 60, 3279-3295.
- (15) Singh, L. P.; Gill, S. S.; Tuteja, N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* **2011**, 6, 175-191.
- (16) Kharwar, R. N.; Mishra, A.; Gond, S. K.; Stierle, A.; Stierle, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1208-1228.
- (17) Lingham, R. B.; Silverman, K. C.; Bills, G. F.; Cascales, C.; Sanchez, M.; Jenkins, R. G.; Gartner, S. E.; Martin, I.; Diez, M. T.; Peláez, F.; Mochales, S.; Kong, Y.-L.; Burg, R. W.; Meinz, M. S.; Huang, L.; Nallin-Omstead, M.; Mosser, S. D.; Schaber, M. D.; Omer, C. A.; Pompliano, D. L.; Gibbs, J. B.; Singh, S. B. *Chaetomella acutisetata* produces chaetomelic acids A and B which are reversible inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, 40, 370-374.
- (18) Zhang, J.-Y.; Tao, L.-Y.; Liang, Y.-J.; Yan, Y.-Y.; Dai, C.-L.; Xia, X.-K.; She, Z.-G.; Lin, Y.-C.; Fu, L.-W. Secalonic acid D induced leukemia cell apoptosis and cell cycle arrest of G1 with involvement of GSK-3 β /catenin/c-Myc pathway. *Cell Cycle* **2009**, 8, 2444-2450.
- (19) Turbyville, T. J.; Wijeratne, E. M. K.; Liu, M. X.; Burns, A. M.; Seliga, C. J.; Luevano, L. A.; David, C. L.; Faeth, S. H.; Whitesell, L.; Gunatilaka, A. A. L. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and

- monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran Desert. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 178-184.
- (20) Kimura, T.; Nishida, M.; Kuramochi, K.; Sugawara, F.; Yoshida, H.; Mizushima, Y. Novel azaphilones, kasanosins A and B, which are specific inhibitors of eukaryotic DNA polymerases β and λ from *Talaromyces* sp. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4594-4599.
- (21) Kusari, S.; Hertweck, C.; Spiteller, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 792-798.
- (22) Strobel, G.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 491-502.
- (23) Klaiklay, S.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Sakayaroj, J. Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2299-2305.
- (24) Liu, D.; Li, X.-M.; Meng, L.; Li, C.-S.; Gao, S.-S.; Shang, Z.; Proksch, P.; Huang, C.-G.; Wang, B.-G. Nigrapyrone A-H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1787-1791.
- (25) Xu, J.; Aly, A. H.; Wray, V.; Proksch, P. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese Mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 21-25.
- (26) Li, H.; Huang, H.; Shao, C.; Huang, H.; Jiang, J.; Zhu, X.; Liu, Y.; Liu, L.; Lu, Y.; Li, M.; Lin, Y.; She, Z. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the Mangrove plant *Sonneratia apetala*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1230-1235.
- (27) Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. Mangrove derived fungal endophytes – a chemical and biological perception. *Fungal Divers.* **2013**, (in press).

- (28) Udayanga, D.; Liu, X.; McKenzie, E. C.; Chukeatirote, E.; Bahkali, A. A.; Hyde, K. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Divers.* **2011**, *50*, 189-225.
- (29) Dai, J.; Krohn, K.; Gehle, D.; Kock, I.; Flörke, U.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Rheinheimer, J. New oblongolides isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Melilotus dentata* from the shores of the Baltic Sea. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4009-4016.
- (30) Hussain, H.; Akhtar, N.; Draeger, S.; Schulz, B.; Pescitelli, G.; Salvadori, P.; Antus, S.; Kurtán, T.; Krohn, K. New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 749-756.
- (31) Claydon, N.; Grove, J. F.; Pople, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 937-943.
- (32) Hussain, H.; Ahmed, I.; Schulz, B.; Draeger, S.; Krohn, K. Pyrenocines J-M: four new pyrenocines from the endophytic fungus, *Phomopsis* sp. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 523-526.
- (33) Krohn, K.; Hussain, H.; Egold, H.; Schulz, B.; Green, I. Chemical derivatization of phomosine A, a highly antifungal secondary metabolite from *Phomopsis* sp. *ARKIVOC* **2012**, 6, 71-89.
- (34) Krohn, K.; Michel, A.; Römer, E.; Flörke, U.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Wray, V. Biologically active metabolites from fungi. 6. Phomosines A-C. Three new biaryl ethers from *Phomopsis* sp. *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *6*, 309-314.
- (35) Li, Y.-Y.; Wang, M.-Z.; Huang, Y.-J.; Shen, Y.-M. Secondary metabolites from *Phomopsis* sp. A123. *Mycology* **2010**, *1*, 254-261.
- (36) Lim, C.; Kim, J.; Choi, J. N.; Ponnusamy, K.; Jeon, Y.; Kim, S. U.; Kim, J. G.; Lee, C. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20*, 494-500.

- (37) Lin, T.; Lin, X.; Lu, C.; Hu, Z.; Huang, W.; Huang, Y.; Shen, Y. Secondary metabolites of *Phomopsis* sp. XZ-26, an endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2975-2982.
- (38) Nithya, K.; Muthumary, J. Secondary metabolite from *Phomopsis* sp. isolated from *Plumeria acutifolia* Poiret. *Recent Res. Sci. Tech.* **2010**, 2, 99-103.
- (39) Rukachaisirikul, V.; Sommart, U.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* **2008**, 69, 783-787.
- (40) Talontsi, F. M.; Islam, M. T.; Facey, P.; Douanla-Meli, C.; von Tiedemann, A.; Laatsch, H. Depsidones and other constituents from *Phomopsis* sp. CAFT69 and its host plant *Endodesmia calophylloides* with potent inhibitory effect on motility of zoospores of grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytochem. Lett.* **2012**, 5, 657-664.
- (41) Toyomasu, T.; Kaneko, A.; Tokiwano, T.; Kanno, Y.; Kanno, Y.; Niida, R.; Miura, S.; Nishioka, T.; Ikeda, C.; Mitsuhashi, W.; Dairi, T.; Kawano, T.; Oikawa, H.; Kato, N.; Sassa, T. Biosynthetic gene-based secondary metabolite screening: a new diterpene, methyl phomopsenonate, from the fungus *Phomopsis amygdali*. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 1541-1548.
- (42) Izawa, Y.; Hirose, T.; Shimizu, T.; Koyama, K.; Natori, S. Six new 10-pheynl-[11]cytochalasans, cytochalasins N-S from *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* **1989**, 45, 2323-2335.
- (43) Elsässer, B.; Krohn, K.; Flörke, U.; Root, N.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Antus, S.; Kurtán, T. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4563-4570.
- (44) Isaka, M.; Jaturapat, A.; Rukseeree, K.; Danwisetkanjana, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1015-1018.

- (45) Wagenaar, M. M.; Clardy, J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1006-1009.
- (46) Andersen, R.; Buechi, G.; Kobbe, B.; Demain, A. L. Secalonic acids D and F are toxic metabolites of *Aspergillus aculeatus*. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 352-353.
- (47) Zhao, Y.; Truhlar, D. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Account.* **2008**, *120*, 215-241.
- (48) Flack, H. On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Crystallogr. A* **1983**, *39*, 876-881.
- (49) Flack, H. D.; Bernardinelli, G. Absolute structure and absolute configuration. *Acta Crystallogr. A* **1999**, *55*, 908-915.
- (50) Flack, H. D.; Bernardinelli, G. The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. *Chirality* **2008**, *20*, 681-690.
- (51) Flack, H. D.; Sadki, M.; Thompson, A. L.; Watkin, D. J. Practical applications of averages and differences of Friedel opposites. *Acta Crystallogr. A* **2011**, *67*, 21-34.
- (52) Krick, A.; Kehraus, S.; Gerhauser, C.; Klimo, K.; Nieger, M.; Maier, A.; Fiebig, H. H.; Atodiressei, I.; Raabe, G.; Fleischhauer, J.; König, G. M. Potential cancer chemopreventive *in vitro* activities of monomeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 353-360.
- (53) Asahina, Y.; Fujikawa, F. Untersuchungen über Flechtenstoffe, LV, Mitteil.: Über Endocrocin, ein neues Oxy-anthrachinon-Derivat. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 1558-1565.

- (54) Waser, M.; Lackner, B.; Zuschrader, J.; Müller, N.; Falk, H. An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2377-2380.
- (55) Lim, F. Y.; Hou, Y.; Chen, Y.; Oh, J.-H.; Lee, I.; Bugni, T. S.; Keller, N. P. Genome-based cluster deletion reveals an endocrocin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4117-4125.
- (56) Kikuchi, H.; Isobe, M.; Kurata, S.; Katou, Y.; Oshima, Y. New dimeric and monomeric chromanones, gonytolides D–G, isolated from the fungus *Gonytrichum* sp. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6218-6223.
- (57) Kurobane, I.; Vining, L. C.; McInnes, A. G. Biosynthetic relationships among the secalonc acids. Isolation of emodin, endocrocin and secalonc acids from *Pyrenochaeta terrestris* and *Aspergillus aculeatus*. *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 1256-1266.
- (58) Bok, J. W.; Chiang, Y.-M.; Szewczyk, E.; Reyes-Domingez, Y.; Davidson, A. D.; Sanchez, J. F.; Lo, H.-C.; Watanabe, K.; Strauss, J.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. C.; Keller, N. P. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 462-464.
- (59) Chiang, Y. M.; Szewczyk, E.; Davidson, A. D.; Entwistle, R.; Keller, N. P.; Wang, C. C.; Oakley, B. R. Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2067-2074.
- (60) Lu, P.; Zhang, A.; Dennis, L. M.; Dahl-Roshak, A. M.; Xia, Y. Q.; Arison, B.; An, Z.; Tkacz, J. S. A gene (pks2) encoding a putative 6-methylsalicylic acid synthase from *Glarea lozoyensis*. *Mol. Genet. Genomics* **2005**, *273*, 207-216.
- (61) Lin, J.; Liu, S.; Sun, B.; Niu, S.; Li, E.; Liu, X.; Che, Y. Polyketides from the ascomycete fungus *Leptosphaeria* sp. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 905-910.

- (62) Sanchez, J. F.; Entwistle, R.; Hung, J.-H.; Yaegashi, J.; Jain, S.; Chiang, Y.-M.; Wang, C. C. C.; Oakley, B. R. Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4010-4017.
- (63) Breinholt, J.; Demuth, H.; Lange, L.; Kjaer, A.; Pedersen, C. Xanthofusin, an antifungal tetronic acid from *Fusicoccum* sp.: production, isolation and structure. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1013-1015.
- (64) Napolitano, J. G.; Gavin, J. A.; Garcia, C.; Norte, M.; Fernandez, J. J.; Daranas, A. H. On the configuration of five-membered rings: a spin-spin coupling constant approach. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6338-6347.
- (65) Zhang, W.; Krohn, K.; Zia, U.; Flörke, U.; Pescitelli, G.; Di Bari, L.; Antus, S.; Kurtán, T.; Rheinheimer, J.; Draeger, S.; Schulz, B. New mono- and dimeric members of the secalonic acid family: Blennolides A–G isolated from the fungus *Blennoria* sp. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4913-4923.
- (66) Rönsberg, D.; Debbab, A.; Mándi, A.; Wray, V.; Dai, H.; Kurtán, T.; Proksch, P.; Aly, A. H. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3256-3259.
- (67) Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Müller, W. E.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M. H.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972-980.
- (68) Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479-490.
- (69) Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936-942.

- (70) Ashour, M.; Edrada, R. A.; Ebel, R.; Wray, V.; Wätjen, W.; Padmakumar, K.; Müller, W. E. G.; Lin, W. H.; Proksch, P. Kahalalide derivatives from the Indian sacoglossan mollusk *Elysia grandifolia*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1547-1553.
- (71) Mueller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 506-515.
- (72) Gosepath, E. M.; Eckstein, N.; Hamacher, A.; Servan, K.; von Jonquieres, G.; Lage, H.; Györfy, B.; Royer, H. D.; Kassack, M. U. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2013-2019.
- (73) Eckstein, N.; Servan, K.; Girard, L.; Cai, D.; von Jonquieres, G.; Jaehde, U.; Kassack, M. U.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Royer, H.-D. Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 739-750.
- (74) Apex2, data collection program for the CCD area-detector system; SAINT, data reduction and frame integration program for the CCD area-detector system. Bruker analytical X-ray systems, Madison, Wisconsin, USA, 1997-2011.
- (75) Sheldrick, G. Program SADABS: Area-detector absorption correction, University of Göttingen, Germany, 1996.
- (76) Sheldrick, G. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112-122.
- (77) PLATON – A multipurpose crystallographic tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, Spek, A. L. 2008.
- (78) Windows implementation: Farrugia, L. J. University of Glasgow, Scotland, Version 40608, 2008.
- (79) Spek, A. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 7-13.

- (80) Spek, A. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 148-155.
- (81) Brandenburg, K. Diamond (Version 3.2), Crystal and Molecular Structure Visualization, Crystal Impact – K. Brandenburg & H. Putz Gbr, Bonn (Germany), 2009.
- (82) MacroModel, Schrödinger LLC, 2012.
<http://www.schrodinger.com/productpage/14/11/>
- (83) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E. Jr.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision B.01, 2010, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- (84) Stephens, P. J.; Harada, N. ECD cotton effect approximated by the Gaussian curve and other methods. *Chirality* **2010**, *22*, 229-233.
- (85) Varetto, U. MOLEKEL 5.4., 2009, Swiss National Supercomputing Centre: Manno, Switzerland.

Table 1. ^1H , ^{13}C NMR, COSY and HMBC data of 4 at 600 (^1H) and 75 MHz (^{13}C)

Nr.	4			
	δ_{H} (MeOH- d_4)	δ_{C} (MeOH- d_4)	COSY	HMBC
1		162.5		
2	6.46, <i>d</i> (8.7)	110.3	3	1, 4, 4a, 9, 9a
3	7.41, <i>d</i> (8.7)	142.4	2	1, 4', 4a, 9a
4		116.8		
4a		155.3		
5	5.59, <i>d</i> (1.7)	72.5	6	6, 7, 8a, 10a, 11, 12, 13
6	2.49, <i>m</i>	29.1	5, 7, 11	7, 11
7	2.49, <i>dd</i> (6.2, 20.5)	34.1	6, 7, 11	5, 6, 8, 8a
	2.33, <i>dd</i> (13.0, 20.5)			6, 8, 8a, 11, 12
8		178.8		
8a		102.0		
9		189.1		
9a		107.5		
10a		83.8		
11	1.00, <i>d</i> (6.4)	17.7	6, 7	5, 6, 7
12	3.87, <i>d</i> (13.2)	65.5	12	5
	3.53, <i>d</i> (13.2)			5, 8a, 10a
13		171.9		
14	2.10, <i>s</i>	20.7		13
1'		162.5		
2'	6.43, <i>d</i> (8.7)	109.6	3'	1', 4', 4a', 9', 9a'

1					
2					
3	3'	7.33, <i>d</i> (8.7)	142.0	2'	1', 4, 4a', 9a'
4					
5					
6	4'		116.8		
7					
8	4a'		155.8		
9					
10					
11	5'	5.49, <i>s</i>	71.7	6'	6', 7', 8a', 10a', 11', 12', 13'
12					
13	6'	2.49, <i>m</i>	28.8	5', 7', 11'	7', 11'
14					
15	7'	2.54, <i>dd</i> (5.5, 17.5)	34.1	5', 6', 7', 11'	5', 6', 8', 8a'
16					
17		2.35, <i>dd</i> (10.0, 17.5)		5', 6', 7', 11'	6', 8', 8a', 11', 12'
18					
19					
20					
21	8'		179.4		
22					
23	8a'		100.1		
24					
25	9'		189.1		
26					
27					
28	9a'		107.6		
29					
30					
31	10a'		82.3		
32					
33	11'	1.01, <i>d</i> (6.5)	17.7	6', 7'	5', 6', 7'
34					
35	12'	4.78, <i>d</i> (12.9)	65.5	12'	5', 10a', 15'
36					
37		4.01, <i>d</i> (12.9)			5', 8a', 10a', 15'
38					
39					
40					
41	13'		171.9		
42					
43	14'	2.11, <i>s</i>	20.8		13'
44					
45	15'		172.4		
46					
47					
48	16'	1.75, <i>s</i>	20.4		15'
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					

Table 2. ^1H , ^{13}C NMR, COSY and HMBC data of **5** at 300 (^1H) and 100 MHz (^{13}C)

Nr.	5			
	δ_{H} (MeOH- d_4)	δ_{C} (MeOH- d_4)	COSY	HMBC
2	5.15, <i>s</i>	63.6		1', 3, 4, 4a, 8a
3		113.3		
4		178.3		
4a		107.6		
5		172.0		
6	6.88, <i>d</i> (2.5)	111.2	8	4a, 5, 7, 8
7		165.2		
8	6.73, <i>d</i> (2.4)	104.3	6, 7-OCH ₃	4a, 6, 7, 8a
8a		161.3		
1'		157.5		
3'		167.7		
4'		114.3		
5'	6.27, <i>s</i>	114.3	4'-CH ₃	2, 3, 3', 4, 4'-CH ₃
7-OCH ₃	3.91, <i>s</i>	56.5	8	7
4'-CH ₃	2.38, <i>s</i>	19.2	5'	3', 5'

Table 3. ^1H , ^{13}C NMR, COSY and HMBC data of 6 at 600 (^1H) and 100 MHz (^{13}C)

Nr.	6			
	δ_{H} (MeOH- d_4)	δ_{C} (MeOH- d_4)	COSY	HMBC
1		130.0 ^c		
2	7.53, <i>dd</i> (1.0, 7.9)	122.0	3, 4	4, 9a, 12
3	7.28, <i>t</i> (7.9)	129.5	2, 4	1, 4a
4	7.05, <i>dd</i> (1.0, 7.9)	120.8	2, 3	2, 9a
4a		154.6		
5	6.16 ^a , <i>s</i>	108.7 ^a	11	7, 8a, 10a, 11
6		149.0 ^c		
7	6.16 ^a , <i>s</i>	108.7 ^a	11	5, 8, 8a, 11
8		163.4 ^b		
8a		110.1 ^c		
9		^d		
9a		135.0 ^c		
10		169.2		
10a		163.4 ^b		
11	2.24, <i>s</i>	21.5	5, 7	5, 6, 7

^a and ^b superimposed signals due to chemical equivalence^c no signal detected in ^{13}C NMR; chemical shift deduced from HMBC correlation^d no signal detected in ^{13}C NMR

Table 4. ¹H, ¹³C NMR, COSY and HMBC data of 9a-9c at 600 (¹H) and 100 MHz (¹³C)

Nr.	9a				9b				9c			
	δ_{H} (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ_{C} (DMSO- <i>d</i> ₆)	COSY	HMBC	δ_{H} (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ_{C} (DMSO- <i>d</i> ₆)	COSY	HMBC	δ_{H} (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ_{C} (DMSO- <i>d</i> ₆)	COSY	HMBC
1		157.7				157.5				159.2		
2		116.1				116.4				115.6		
3	7.34, <i>d</i> (8.5)	139.5	4	1, 4', 4a	7.35, <i>d</i> (8.5)	139.8	4	1, 4', 4a	7.33, <i>d</i> (8.5)	136.2	4	1, 2', 4a
4	6.44, <i>d</i> (8.5)	106.8	3	2, 4a, 9, 9a	6.52, <i>d</i> (8.6)	106.7	3	2, 4a, 9, 9a	6.47, <i>d</i> (8.5)	105.6	3	1, 2, 9a
4a		158.5				157.8				157.2		
5	4.21, <i>d</i> (3.6)	86.3	6	6, 8, 10a, 11	4.37, <i>d</i> (4.7)	87.1	6	6, 8, 8a, 10a, 11, 12	4.33, <i>d</i> (4.7)	86.7	6	6, 8, 10a, 11
6	2.72, <i>m</i>	28.7	5, 7, 11		2.86, <i>m</i>	28.7	5, 7, 11	8, 11	2.82, <i>m</i>	27.0	5, 7, 11	
7	2.25, <i>dd</i> (9.2, 17.9)	35.4	6, 7	5, 6, 8, 11	2.77, <i>dd</i> (9.4, 17.8)	35.9	6, 7	5, 6, 8, 11	2.74, <i>dd</i> (9.3, 17.7)	34.8	6, 7	5, 6, 8, 11
8	1.93, <i>dd</i> (4.3, 17.9)				2.23, <i>dd</i> (5.5, 17.8)				2.19, <i>dd</i> (5.5, 17.7)			
8		175.9				175.7				175.6		
8a	3.18, <i>d</i> (17.2)	37.1	8a	5, 9, 9a, 10a, 12	3.16, <i>d</i> (17.5)	38.6	8a	5, 9, 9a, 10a, 12	3.15, <i>d</i> (17.4)	37.6	8a	5, 9, 10a, 12
22												
23	2.83, <i>d</i> (17.2)				3.05, <i>d</i> (17.3)				2.93, <i>d</i> (17.4)			
9		197.5				197.6				196.6		
9a		106.6				106.6				105.7		
10a		83.8				83.8				82.8		
11	1.02, <i>d</i> (7.0)	20.4	6	5, 6, 7	1.16, <i>d</i> (6.8)	20.0	6	5, 6, 7	1.12, <i>d</i> (6.8)	19.4	6	5, 6, 7
12	3.66, <i>d</i> (4.7)	61.3	12-OH	5, 8a, 10a	3.71, <i>dd</i> (5.1, 11.6)	62.5	12-OH	5, 8a, 10a	3.64, <i>dd</i> (4.9, 18.7)	62.2	12-OH	5, 8a, 10a
31					3.65, <i>dd</i> (5.2, 11.8)							
1-OH	12.01, <i>s</i>			1, 2, 9a	11.97, <i>s</i>			1, 2, 9a	11.95, <i>s</i>			1, 2, 9a
12-OH	5.35, <i>r</i> (5.0)		12	10a	5.49, <i>r</i> (5.2)		12	10a, 12	5.47, <i>r</i> (5.0)		12	10a
1'		160.0				158.8				159.2		
2'	6.50, <i>d</i> (8.5)	107.9	3'	1', 4', 9a'	6.50, <i>d</i> (8.8)	108.1	3'	1', 4', 9a'		115.6		
3'	7.37, <i>d</i> (8.5)	139.8	2'	1', 2, 4a'	7.33, <i>d</i> (8.5)	139.8	2'	1', 2, 4a'	7.33, <i>d</i> (8.5)	136.2	4'	1', 2, 4a'
4'		115.1				115.3			6.47, <i>d</i> (8.5)	105.6	3'	1', 2', 9a'
4a'		156.1				156.1				157.2		

44

ACS Paragon Plus Environment

5'	4.39, <i>d</i> (4.7)	87.4	6'	6', 8', 10a', 11'	86.3	6'	6', 8', 10a', 11'	4.33, <i>d</i> (4.7)	86.7	6'	6', 8', 10a', 11'
6'	2.87, <i>m</i>	28.6	5', 7', 11'		2.51, <i>m</i>	5', 7', 11'		2.82, <i>m</i>	27.0	5', 7', 11'	
7'	2.78, <i>dd</i> (9.4, 17.8)	35.9	6', 7'	5', 6', 8', 11'	2.13, <i>dd</i> (9.4, 17.9)	6', 7'	5', 6', 8', 11'	2.74, <i>dd</i> (9.3, 17.7)	34.8	6', 7'	5', 6', 8', 11'
	2.20, <i>dd</i> (5.4, 17.8)				1.96, <i>dd</i> (4.7, 17.9)			2.19, <i>dd</i> (5.5, 17.7)			
8'		175.7						-	175.6		
8a'	3.10, <i>d</i> (17.3)	38.8	8a'	5', 9', 10a', 12'	3.21, <i>d</i> (17.3)		5', 9', 9a', 10a', 12'	3.15, <i>d</i> (17.4)	37.6	8a'	5', 9', 10a', 12'
	3.06, <i>d</i> (17.3)				2.86, <i>d</i> (17.1)			2.93, <i>d</i> (17.4)			
9'		197.7							196.6		
9a'		107.1							105.7		
10a'		83.6							82.8		
11'	1.15, <i>d</i> (6.8)	20.0	6'	5', 6', 7'	1.01, <i>d</i> (7.0)		5', 6', 7'	1.12, <i>d</i> (6.8)	19.4	6'	5', 6', 7'
12'	3.75, <i>dd</i> (5.0, 11.7)	62.1	12'-OH	5', 8a', 10a'	3.66, <i>dd</i> (5.0, 11.6)		12', 12'-OH 5, 8a', 10a'	3.64, <i>dd</i> (4.9, 18.7)	62.2	12', 12'-OH 5', 8a', 10a'	
					3.58, <i>dd</i> (5.3, 11.6)					12', 12'-OH	
1'-OH	11.74, <i>s</i>			1', 2', 9a'	11.72, <i>s</i>		1', 2', 9a'	11.95, <i>s</i>		1', 2', 9a'	
12'-OH	5.45, <i>r</i> (5.3)		12'	10a'	5.43, <i>r</i> (5.2)		10a', 12'	5.47, <i>r</i> (5.0)		12'	10a'

Table 5. ^1H , ^{13}C NMR, COSY and HMBC data of 10 at 600 (^1H) and 100 MHz (^{13}C)

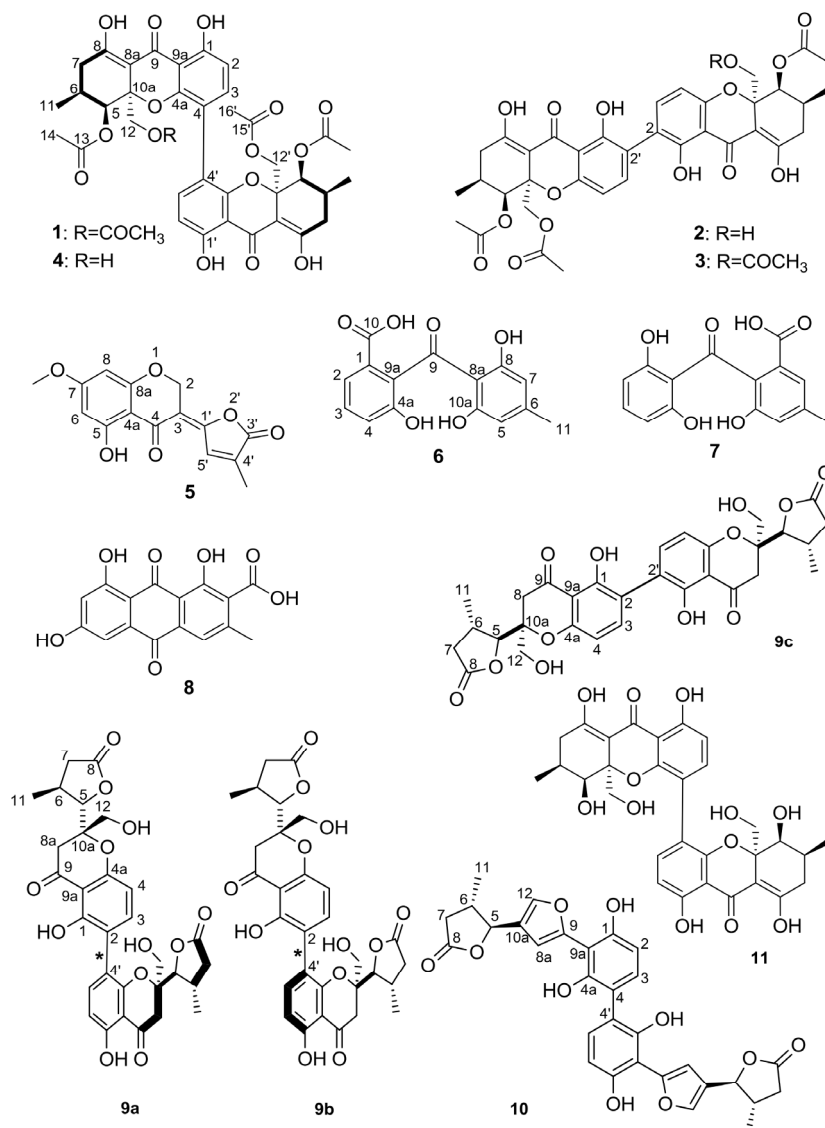
Nr.	10			
	δ_{H} (DMSO- d_6)	δ_{C} (DMSO- d_6)	COSY ^a	HMBC ^a
1/1'		155.4		
2/2'	6.51, <i>d</i> (8.3)	107.4	3	1, 4, 9, 9a
3/3'	6.94, <i>d</i> (8.4)	131.8	2	1, 4', 4a, 9a
4/4'		118.5		
4a/4a'		152.1		
5/5'	5.05, <i>d</i> (8.7)	80.3	6, 12	6, 7, 8a, 10a, 11, 12
6/6'	2.65, <i>m</i>	36.9	5, 7, 11	5, 7, 10a, 11
7/7'	2.43, <i>dd</i> (10.3, 17.0)	36.6	6, 7	5, 6, 8, 11
	2.76, <i>dd</i> (7.9, 17.0)		6, 7	5, 6, 8, 11
8/8'		176.0		
8a/8a'	6.66, <i>s</i>	109.3	12	5, 9, 10a, 12
9/9'		149.3		
9a/9a'		106.8		
10a/10a'		123.5		
11/11'	1.10, <i>d</i> (6.5)	15.9	6	5, 6, 7
12/12'	7.82, <i>s</i>	139.7	5, 8a	8a, 10a, 9
1/1'-OH	9.6, <i>s</i>			9a
4a/4a'-OH	9.48, <i>s</i>			9a

^a correlations listed for only one monomeric building unit.

Table 6. Cytotoxic activity of isolated compounds

Samples	L5178Y growth in %		IC ₅₀ (μM) ^a
tested	(Conc. 10 μg/mL)		
1	1.2		0.3
2	6.6		10.0
3	0.5		1.1
4	0.5		2.8
5	85.6		
6	92.6		
7	100		
8	100		
9a	90.7		
9b	97.4		
9c	89.2		
10	100		
11	100		
IC ₅₀ of 1 (μM) ^a			
cell line	Cal27	Kyse510	A2780
sens	5.2	0.8	0.7
CisR	5.6	0.8	0.9
Selectivity of 1			
cell line	DG75	Jurkat	PBMC
IC ₅₀ (μM) ^b	0.1	0.5	61.2
sens: sensitive to cisplatin		CisR: cisplatin resistant	
^a incubation for 72 hrs		^b incubation for 48 hrs	

Figure 1.



* Axial chirality of atropodiastereomers not assigned.

Figure 2.

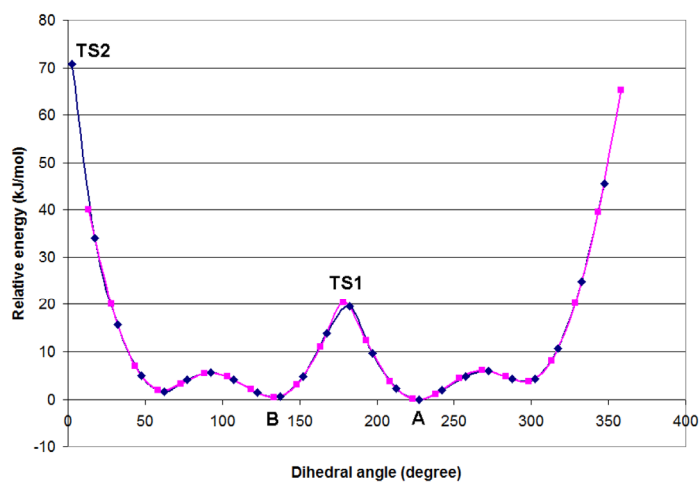


Figure 3.

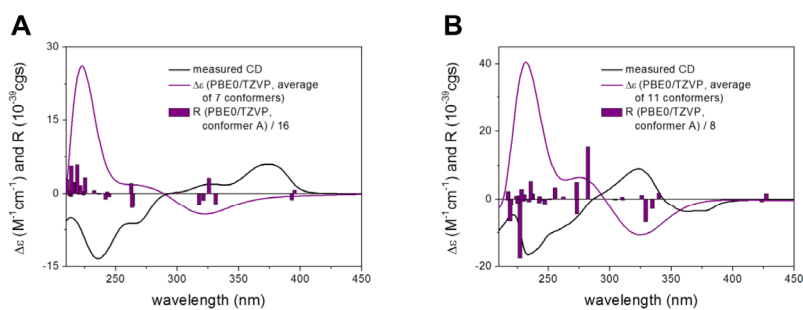


Figure 4.

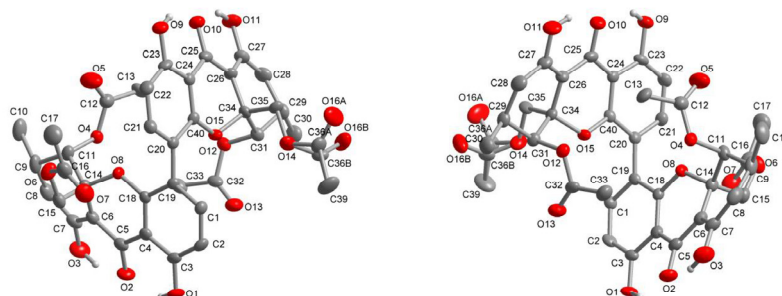


Figure 5.

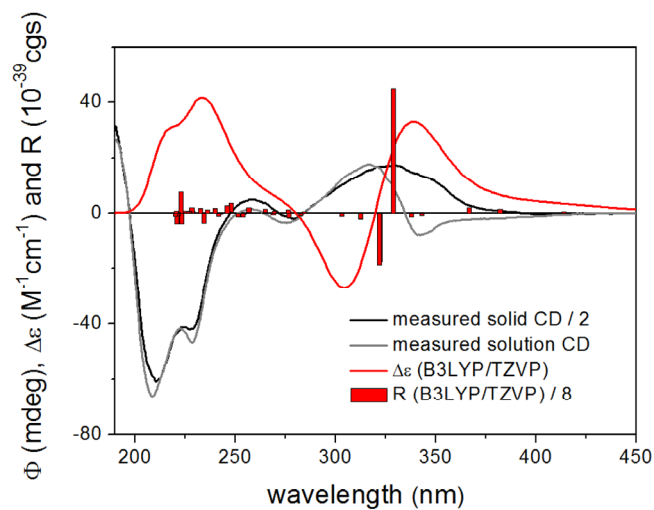


Figure 6.

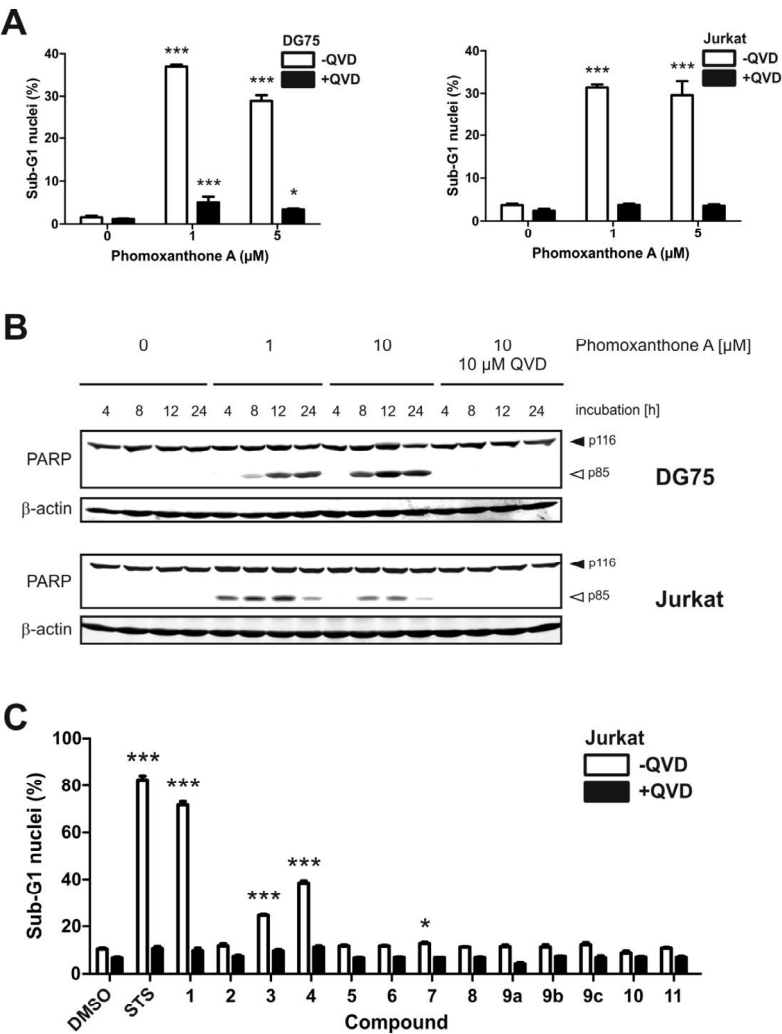
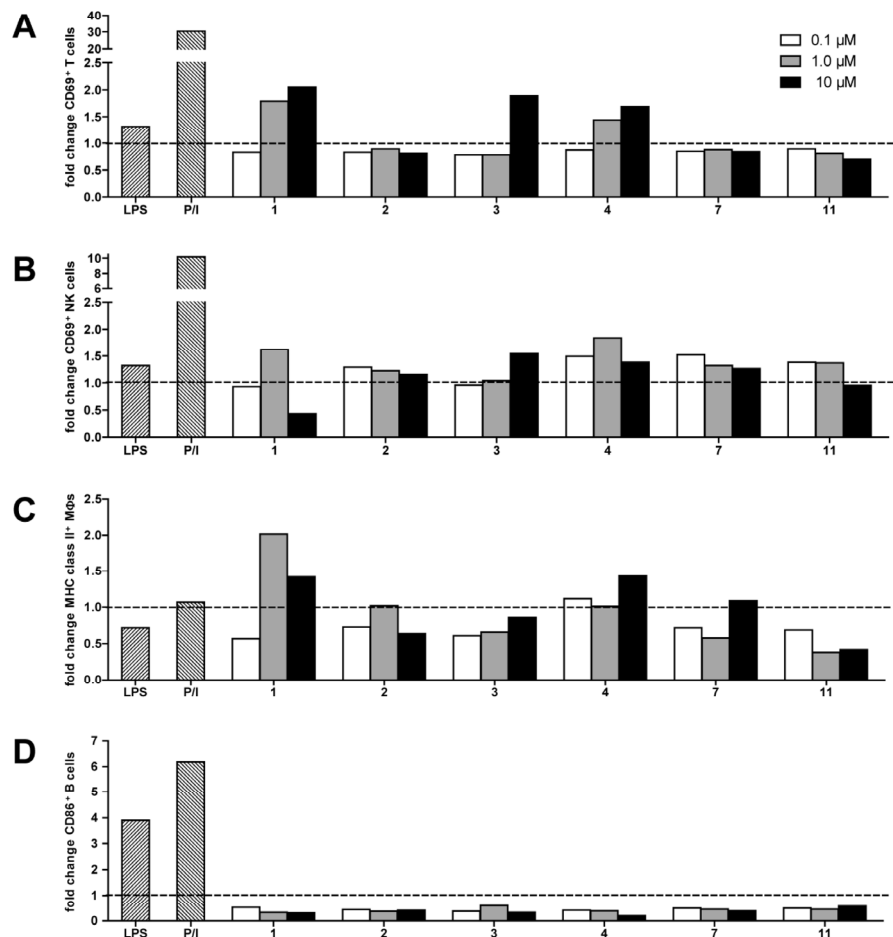


Figure 7.



Scheme 1.

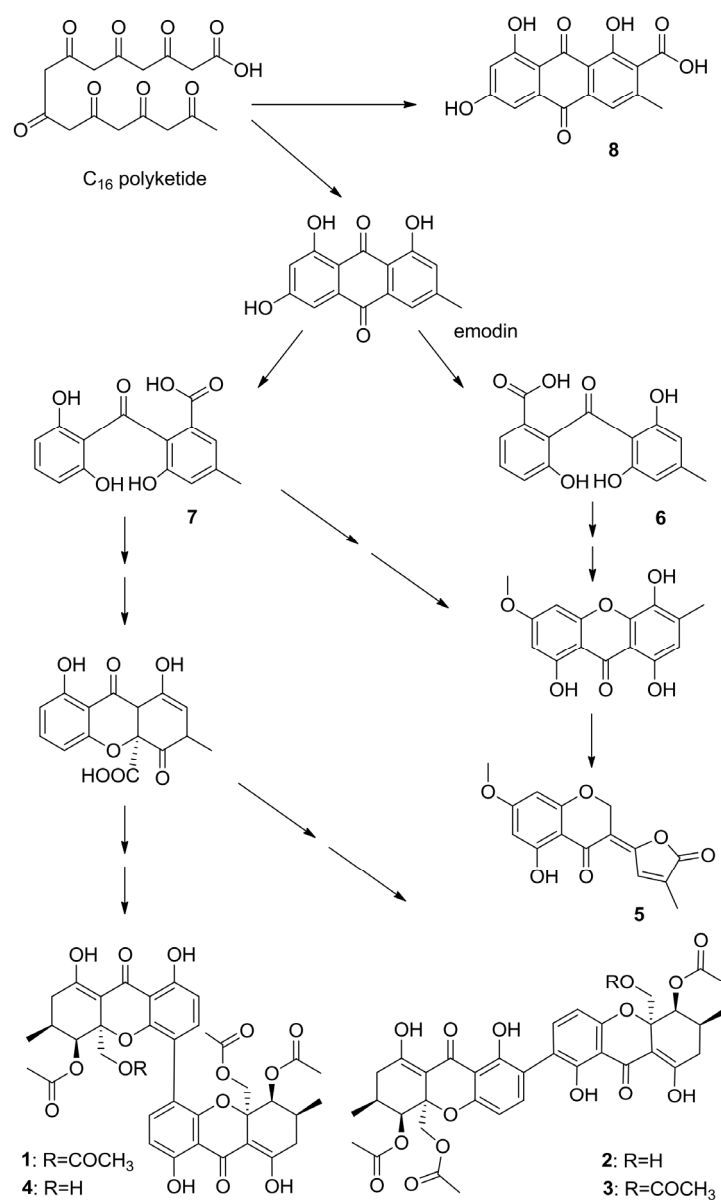


Figure 1. Chemical structures of compounds **1-11**.

Figure 2. Preliminary torsional angle scans for determining the rotational energy barrier around the C2-C2' bond ($\omega_{C-1',C-2',C-2,C-1}$ torsional angle) of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**2**. The scans were started from the lowest-energy *in vacuo* conformers of *M* and *P* helicity (A and B), respectively. Relative energy (kJ mol⁻¹) is plotted in the function of the $\omega_{C1'-C2'-C2-C1}$ torsional angle. TS1 and TS2 stands for the two transition states of the inversion of helicity.

Figure 3. Experimental and PBE0/TZVP calculated ECD spectra of the B3LYP/TZVP and B3LYP/6-31G(d) reoptimized low-energy geometries of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**2** (A) and (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**3** (B), respectively, in acetonitrile. Bars represent the calculated rotational strength values of the lowest-energy conformer.

Figure 4. Molecular structure of phomoxanthone A (**1**) (50% thermal ellipsoids) with determined absolute configuration. H atoms on carbons are not shown for clarity. Note the torsional disorder of one acetyl group.

Figure 5. Experimental and calculated B3LYP/TZVP ECD spectra of the X-ray conformers of (a*S*,5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**1** *in vacuo* (average of the two conformers). Computed spectrum is shifted with 12 nm to the red.

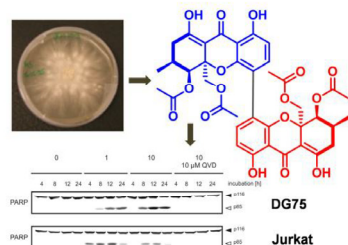
Figure 6. Apoptosis induction by dimeric tetrahydroxanthone derivatives. (A) DG75 B cells (left panel) and Jurkat T cells (right panel) were treated with the indicated concentrations of phomoxanthone A (**1**) in the absence or presence of the caspase-inhibitor Q-VD-OPh (10 μ M) for 24 hrs. Subsequently, apoptosis was assessed by propidium iodide staining of hypodiploid apoptotic nuclei and flow cytometry. (B) DG75 B cells (upper panels) and Jurkat

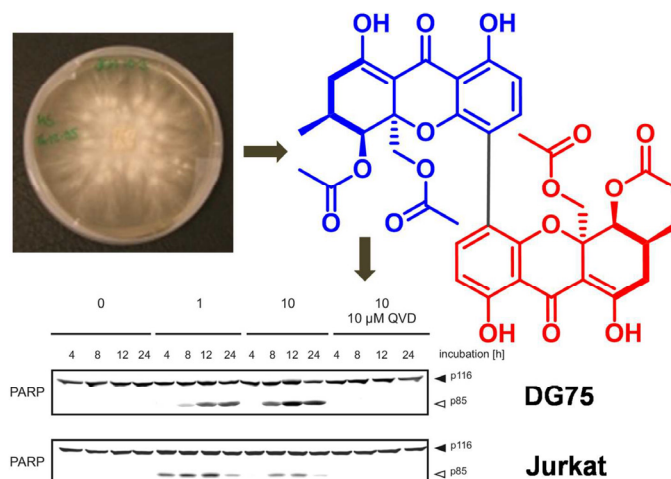
T cells (lower panels) were treated with the indicated concentrations of phomoxanthone A (**1**) in the absence or presence of 10 μ M Q-VD-OPh for the indicated times. Cleared cellular lysates were analyzed for PARP and β -actin by immunoblotting. Solid arrowheads indicate uncleaved form of PARP, open arrowheads indicate cleaved form. (C) Jurkat T cells were incubated with 0.1 % DMSO (negative control), 2.5 μ M staurosporine (STS; positive control), or 10 μ M of compounds **1-11** in the absence or presence of 10 μ M Q-VD-OPh for 24 hrs. Then apoptosis was assessed by propidium iodide staining of hypodiploid apoptotic nuclei and flow cytometry. Analyses in (A) and (C) were performed in triplicates; error bars = SD; p values were calculated by two-way ANOVA with Bonferroni post-test; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Figure 7. Immunostimulatory capacity of selected tetrahydroxanthene derivatives. Single cell suspensions from whole spleens of C57BL/6 mice were incubated for 12 hrs with the indicated concentrations of compounds **1-4**, **7**, and **11**, 0.1 % DMSO (negative control), LPS (positive control) or PMA and Ionomycin (P/I; positive control). Cell activation was measured by flow cytometry as expression of the surface markers CD69 on T cells (A) and NK cells (B), MHC class II on M Φ s (C) and CD86 on B cells (D), and given as fold increase compared to the DMSO negative control. Shown is one representative of two independent experiments for compounds **2-4**, **7** and **11** and of three independent experiments for compound **1**.

Scheme 1. Putative biosynthetic pathway for the new polyketides **1**, **4-6** and the known compounds **2**, **3**, **7** and **8**.

Table of Contents Graphic





406x287mm (96 x 96 DPI)

Supporting Information

Pro-Apoptotic and Immunostimulatory Tetrahydroxanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla*

David Rösberg,[†] Abdessamad Debbab,[†] Attila Mándi,[‡] Vera Vasylyeva,[§] Philip Böhlér,^{||} Björn Stork,^{||} Laura Engelke,[⊥] Alexandra Hamacher,[⊥] Richard Sawadogo,[◊] Marc Diederich,[◊] Victor Wray,[□] WenHan Lin,[◊] Matthias Kassack,[⊥] Christoph Janiak,[§] Stefanie Scheu,^Δ Sebastian Wesselborg,^{||} Tibor Kurtán,[‡] Amal H. Aly,^{†*} Peter Proksch^{†*}

[†] Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[‡] Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen, Hungary

[§] Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

^{||} Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[⊥] Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

[◊] Laboratory of Molecular and Cellular Biology of Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

[□] Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

[◊] National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, China

^Δ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Table of Contents

Figure S1. Structures of the low- and high-energy transition states for the inversion of the C2-C2' bond of (5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>aR</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,10 <i>a'R</i>)- 2 .	S2
Figure S2. Solution conformers and populations ($\geq 2\%$) of (5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>aR</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,10 <i>a'R</i>)- 2 .	S2
Figure S3. Solution conformers and populations ($\geq 2\%$) of (5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>aR</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,10 <i>a'R</i>)- 3 .	S3
Figure S4. Molecular structure of phomoxanthone A (1) with determined absolute configuration.	S4
Figure S5. Phomoxanthone A (1) with the absolute structure assignment.	S4
Figure S6. Experimental and calculated ECD spectra of the non-optimized “old” (a <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>aR</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,10 <i>a'R</i>) X-ray structures of 1 <i>in vacuo</i> .	S5
Figure S7. Section of the packing diagram of phomoxanthone A (1) showing three molecules with illustration of the torsional acetyl group disorder (encircled) for the red central molecule.	S6
Table S1. Crystal data and structure refinement for 1 .	S7
Inter- and intramolecular interactions with lengths (Å) and angles (°) in 1 .	S8
Selected bond lengths (Å) and angles (°) in 1 .	S8

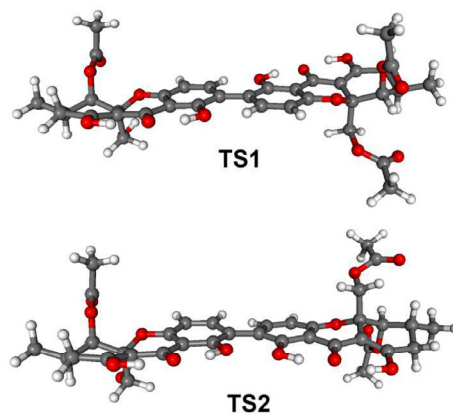


Figure S1. Structures of the low- and high-energy transition states for the inversion of the C2-C2' bond of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-2. Relative energies of transition states are **TS1** = 20.5 and **TS2** = 70.9 kJ/mol, respectively.

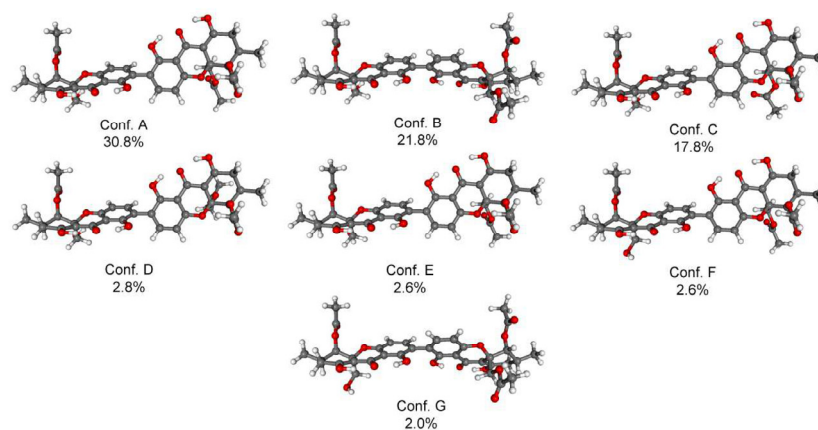


Figure S2. Solution conformers and populations ($\geq 2\%$) of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-2 obtained by B3LYP/TZVP reoptimization (PCM solvent model for acetonitrile) of the MMFF conformers. (Overall populations of the *M* and *P* helicity conformers are 56.6% and 23.8%, respectively.)

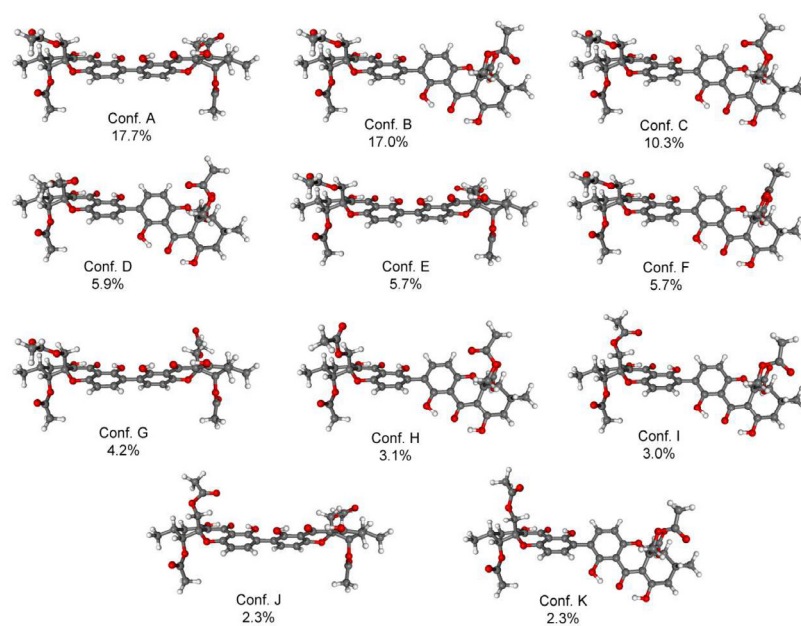


Figure S3. Solution conformers and populations ($\geq 2\%$) of (5*R*,6*R*,10*aR*,5'*R*,6'*R*,10*a'R*)-**3** obtained by B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* reoptimization of the MMFF conformers.

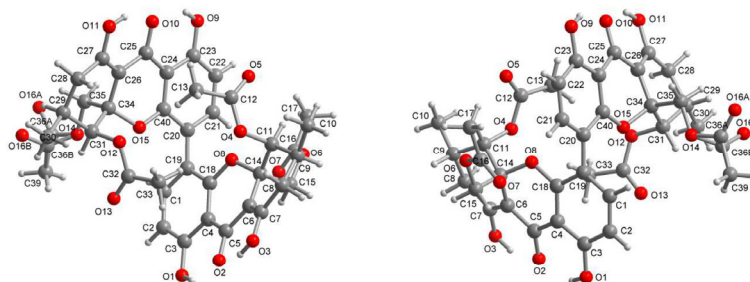


Figure S4. Molecular structure of phomoxanthone A (**1**) with determined absolute configuration (2 different views). Note the torsional disorder of one acetyl group.

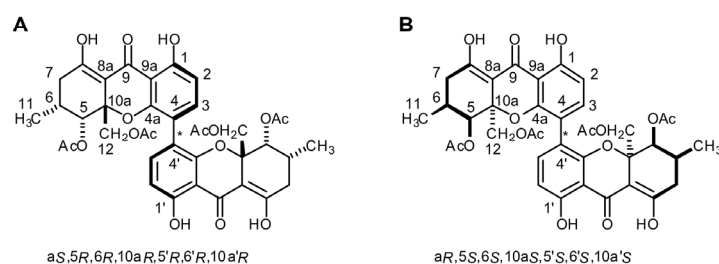


Figure S5. Phomoxanthone A (**1**) with the absolute structure assignment and as schematically drawn by Elsässer et al. (A). Phomoxanthone A (**1**) with the absolute structure assignment from an X-ray structure re-determination; compare with A (B).

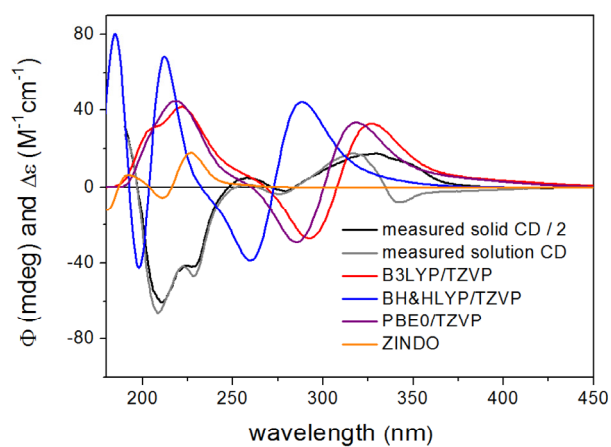


Figure S6. Experimental and calculated ECD spectra of the non-optimized “old” (a*S*,5*R*,6*R*,10*aR*,5′*R*,6′*R*,10*a′R*) X-ray structures of **1** *in vacuo* (average of the two conformers). Calculated spectra are not shifted.

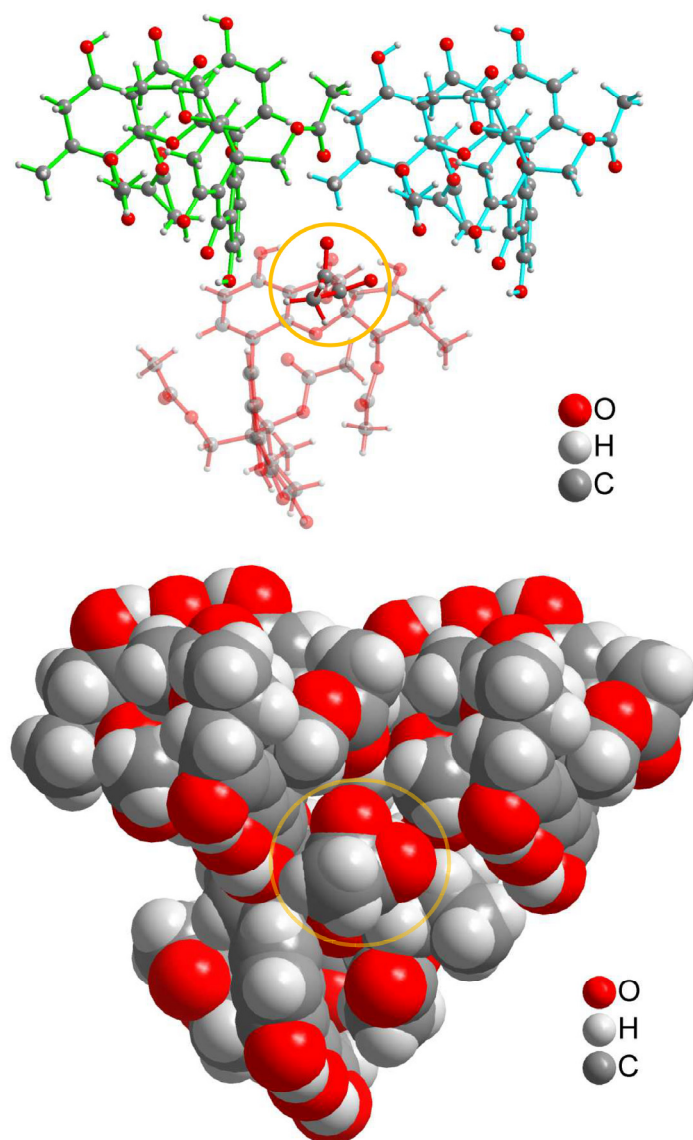


Figure S7. Section of the packing diagram of phomoxanthone A (**1**) showing three molecules with illustration of the torsional acetyl group disorder (encircled) for the red central molecule.

Table S1. Crystal data and structure refinement for 1.

Compound	1
Empirical formula	C ₃₈ H ₃₈ O ₁₆
M / g mol ⁻¹	750.68
Crystal size / mm ³	0.15 × 0.14 × 0.13
Temperature / K	123(2)
θ range / °	2.98–63.98 (91.20%)
(completeness)	
h; k; l range	–12, 11; ±14; ±17
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> / Å	10.6741(8)
<i>b</i> / Å	12.3578(9)
<i>c</i> / Å	15.4377(11)
<i>α</i> / °	90
<i>β</i> / °	95.518(3)
<i>γ</i> / °	90
<i>V</i> / Å ³	2013.9(3)
<i>Z</i>	2
<i>D</i> _{calc} / g/cm ³	1.238
<i>μ</i> / mm ⁻¹	0.825
<i>F</i> (000)	788
Max./min. transm.	0.9025 / 0.8877
Refl. collected	9025
Indep. refl. (<i>R</i> _{int})	5338 (0.0250)
Data / restraints / parameters	5338 / 2 / 519
Max./min. Δ <i>ρ</i> / e.Å ⁻³ ^a	0.371 / –0.188
<i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)] ^b	0.0461 / 0.1263
<i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ (all data) ^b	0.0470 / 0.1271
Goodness-of-fit on <i>F</i> ² ^c	1.079
Flack parameter ^d	0.05(19)

^a Largest difference peak and hole. – ^b $R_1 = [\sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|]$; $wR_2 = [\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum w(F_o^2)]^{1/2}$. – ^c Goodness-of-fit = $[\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p)]^{1/2}$. – ^d Absolute structure parameter.³¹

Inter- and intramolecular interactions with lengths (Å) and angles (°) in 1.^a

D–H···A	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
O(1)–H(1)···O(9) ⁱⁱ	0.97(4)	2.55(4)	3.276(4)	132(3)
O(3)–H(3)···O(2)	0.84	1.81	2.551(4)	146
O(11)–H(11)···O(10)	0.84	1.79	2.539(4)	147
O(1)–H(1)···O(2)	0.97(4)	1.83(4)	2.629(4)	139(3)
O(9)–H(9)···O(10)	0.76(4)	1.96(4)	2.613(4)	144(5)
O(9)–H(9)···O(2) ⁱⁱⁱ	0.76(5)	2.58(5)	2.922(3)	109(4)

^a Symmetry operations for 1: ii x,y–1,z; iii = x,y+1,z.

Selected bond lengths (Å) and angles (°) in 1.

O(1)–C(3)	1.362(4)	O(1)–C(3)–C(2)	119.4(3)	O(11)–C(27)–C(26)	121.2(3)
O(2)–C(5)	1.260(4)	O(2)–C(5)–C(4)	121.6(3)	O(11)–C(27)–C(28)	115.1(3)
O(3)–C(7)	1.331(5)	O(2)–C(5)–C(6)	121.0(3)	O(12)–C(31)–C(34)	107.3(2)
O(4)–C(12)	1.349(4)	O(3)–C(7)–C(6)	123.3(3)	O(12)–C(31)–C(29)	107.9(3)
O(4)–C(11)	1.444(4)	O(3)–C(7)–C(8)	113.4(3)	O(13)–C(32)–O(12)	124.4(3)
O(5)–C(12)	1.199(5)	O(4)–C(11)–C(14)	106.4(2)	O(13)–C(32)–C(33)	126.4(3)
O(6)–C(16)	1.363(5)	O(4)–C(11)–C(9)	107.6(3)	O(12)–C(32)–C(33)	109.2(3)
O(6)–C(15)	1.426(4)	O(5)–C(12)–O(4)	124.6(3)	O(15)–C(34)–C(26)	110.4(2)
O(7)–C(16)	1.197(5)	O(5)–C(12)–C(13)	125.6(3)	O(15)–C(34)–C(31)	104.2(2)
O(8)–C(18)	1.368(4)	O(4)–C(12)–C(13)	109.7(3)	O(15)–C(34)–C(35)	108.8(3)
O(8)–C(14)	1.435(4)	O(8)–C(14)–C(6)	111.9(2)	O(14)–C(35)–C(34)	110.3(3)
O(9)–C(23)	1.348(4)	O(8)–C(14)–C(11)	104.9(3)	O(14)–C(36)–O(16A)	105.8(6)
O(10)–C(25)	1.265(4)	O(8)–C(14)–C(15)	107.9(3)	O(14)–C(36)–C(39)	119.1(4)
O(11)–C(27)	1.340(4)	O(6)–C(15)–C(14)	110.6(3)	O(16A)–C(36)–C(39)	112.3(5)
O(12)–C(32)	1.372(4)	O(7)–C(16)–O(6)	123.4(4)	O(14)–C(36)–O(16B)	109.1(6)
O(12)–C(31)	1.452(4)	O(7)–C(16)–C(17)	125.8(4)	O(16A)–C(36)–O(16B)	93.3(5)
O(13)–C(32)	1.184(5)	O(6)–C(16)–C(17)	110.8(3)	O(15)–C(40)–C(20)	116.4(3)
O(14)–C(36)	1.214(5)	O(8)–C(18)–C(19)	116.0(3)	O(15)–C(40)–C(24)	122.3(3)
O(14)–C(35)	1.433(4)	O(8)–C(18)–C(4)	121.7(3)	C(12)–O(4)–C(11)	117.6(3)
O(15)–C(40)	1.356(4)	O(9)–C(23)–C(22)	118.8(3)	C(16)–O(6)–C(15)	118.3(3)
O(15)–C(34)	1.453(4)	O(9)–C(23)–C(24)	121.3(3)	C(18)–O(8)–C(14)	118.9(2)
O(16A)–C(36)	1.460(9)	O(10)–C(25)–C(26)	121.1(3)	C(32)–O(12)–C(31)	116.6(3)
O(16B)–C(36)	1.487(10)	O(10)–C(25)–C(24)	121.9(3)	C(36)–O(14)–C(35)	122.2(3)
				C(40)–O(15)–C(34)	117.4(2)

6 Publikation 3: *Phomopsis longicolla* II

Vorgesehen zur Veröffentlichung

Eigener Anteil an der Arbeit: 80 %, Erstautor, Durchführung der Experimente (Ausnahmen s. Erklärung), Schreiben des Manuskriptes

New Secondary Metabolites from the Mangrove Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla*

Rönsberg D, Aly, A H, [...], Proksch, P

Abstract

The endophytic fungal strain *Phomopsis longicolla*, isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*, was fermented on two different solid culture media. A culture on rice yielded three new natural products (**1-3**), together with two known compounds (**4, 5**), whereas four known metabolites (**6-9**) were identified from extracts of the fungus cultured on white beans. The structures of the new compounds, phomocyclinone (**1**), phomopyrone (**2**) and 2,3,5-trihydroxypalmitic acid (**3**), were unambiguously determined by 1D and 2D NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. All isolated compounds were subjected to cytotoxicity, insecticidal and antimicrobial assays, where only **1** and **4** exhibited significant cytotoxic activity against L5178Y mouse lymphoma cells with IC₅₀ values of 5.2 and 14.6 μ M, respectively.

Introduction

Fungi are known to produce a broad variety of physiologically active substances. A well-known example is lovastatin, a secondary metabolite of ascomycetes, which is capable of inhibiting the biosynthesis of antifungal saponins in a host plant.¹ More specifically, lovastatin is used to treat hypercholesterolemia, since it reduces the endogenous cholesterol biosynthesis by competitively inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase. Further examples of therapeutically important secondary metabolites from fungi include several antibiotics,² cytostatics,³ and immunosuppressives.⁴

Endophytic fungi which reside in the tissues of host plants have proven to be specifically promising in the search for new bioactive natural products. In particular, Mangrove derived endophytes are of interest due to their unique ecosystem embracing both terrestrial and marine habitats. Consequently, they include a consortium of soil, marine and freshwater fungi,^{5,6} which are believed to contribute to Mangrove adaptation to extreme environmental conditions, including high salinity, temperature and moisture, anaerobic soil, tidal activities, as well as high microbial and faunal competition.⁷⁻¹⁰ In the course of adapting to these evolutionary pressures, metabolic modifications of Mangrove derived endophytes resulted in an immense chemical diversity making them promising sources of structurally unprecedented natural products with an amazing array of bioactivities.

Several studies showed that different culture conditions have a major influence on fungal metabolism, with implications for not only the productivity but also for the entire spectrum of secondary metabolites.^{7,11-19} This may be explained by the ability of fungi to activate silent biosynthetic pathways when needed and in contrast to stop them under stress-free conditions.^{20,21} A well described method is the OSMAC (one strain many compounds) approach, in which cultivation parameters for a given microorganism are systematically changed to alter its metabolic profile.¹³ Such variations in metabolic profiles of fungi are crucial in the search for new bioactive natural products offering great chances for drug discovery programs.

In the present investigation, the influence of two different solid culture media including rice and white beans on the secondary metabolite profile of the endophyte *Phomopsis longicolla* that was isolated from the Mangrove plant *Sonneratia caseolaris* was examined. From the extract of *P. longicolla* cultured on rice three new natural products, including phomocyclinone (**1**), phomopyrone (**2**) and 2,3,5-trihydroxypalmitic acid (**3**), were obtained, together with the known compounds dankasterone (**4**) (24R)-6 β -hydroxy-24-ethylcholest-4-en-3-one (**5**). When cultured on white beans the fungus yielded four known substances,

including the α -pyrone nectriapyrone (**6**), and three phenolic acids, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid and *p*-hydroxyphenylacetic acid (**7-9**). When subjected to a panel of bioassays that included cytotoxicity, antibacterial, antifungal and insecticidal assays only the crude extract of *P. longicolla* cultured on rice showed activity. Subsequent bioactivity-guided isolation yielded the new compounds **1** and **4** as active principles that were responsible for the cytotoxicity of the respective extract along with some other previously described compounds, such as the major component phomoxanthone A (**X**).²²

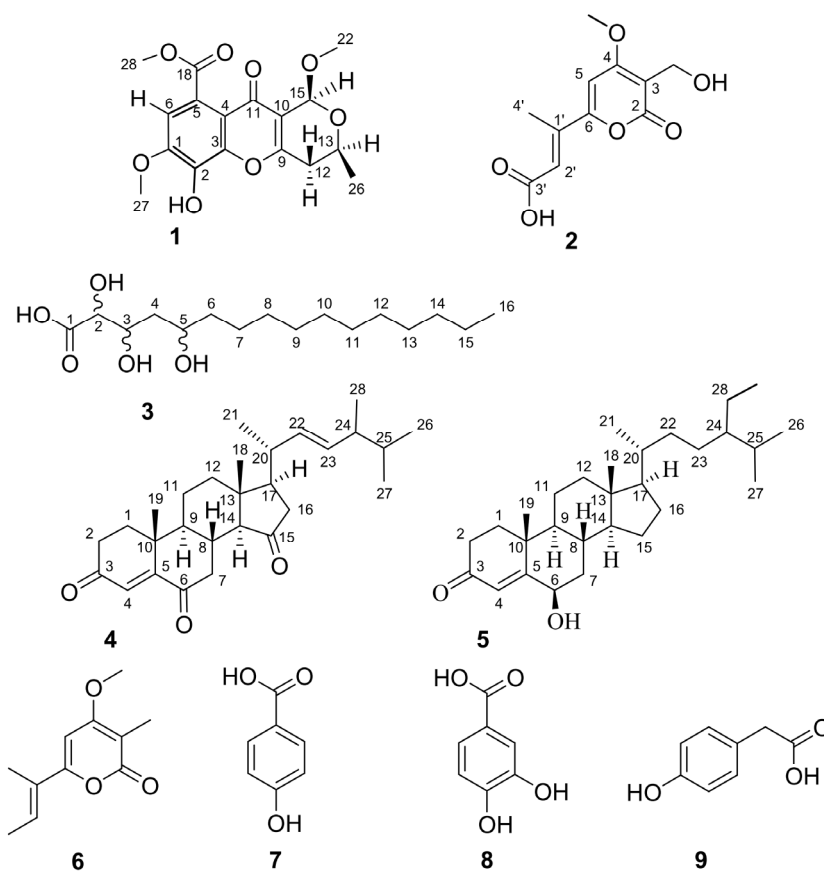


Figure 1. Chemical structures of compounds (**1-9**).

Results

Fermenting *P. longicolla* on two different solid media including rice and white beans had profound effects on the resulting patterns of natural products as shown by HPLC charts obtained for the respective crude extracts (Figure 1).

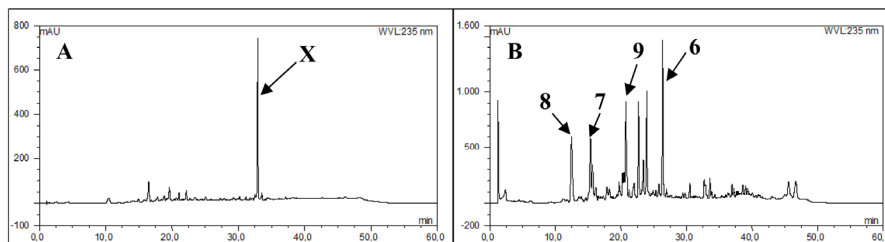


Figure 2. HPLC Chromatograms of crude rice (A) and bean (B) culture extracts of *P. longicolla* at 235 nm.

From the extract of *P. longicolla* cultured on rice three new compounds (**1-3**) and two known metabolites (**4, 5**) were obtained. Further new and known natural products isolated from the rice culture extract, including the main component phomoxanthone A (**X**) are published elsewhere.²² Compound **1** was obtained as a brownish, amorphous powder.

The molecular formula was derived from HR-ESIMS spectrum as $C_{17}H_{18}O_8$. The 1H NMR spectrum (Table 1) indicated the presence of one aliphatic methyl group at $\delta(H)$ 1.41 ppm (CH_3 -26), three methoxy groups at $\delta(H)$ 3.53, 3.95 and 4.02 ppm (CH_3 -22, CH_3 -28 and CH_3 -27, respectively), an aliphatic methylene group at $\delta(H)$ 2.79/2.69 ppm (CH_2 -12), an oximethine group at $\delta(H)$ 4.4 ppm (H-13), an acetal proton at $\delta(H)$ 5.49 ppm (H-15), as well as an aromatic proton at $\delta(H)$ 7.1 ppm (H-6). The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) showed a total of seventeen signals, including signals for an ester carbonyl at $\delta(C)$ 171.8 ppm (C-18), a carbonyl at $\delta(C)$ 175.6 ppm (C-11), three sp^2 carbons, four sp^2 and one sp^3 oxygenated carbons, an acetal carbon at $\delta(C)$ 95.7 ppm (C-15), a methylene, three methoxy and one

methyl group. The aliphatic ring was confirmed by the HMBC correlations of H-15 to C-9, C-10, C-11 and C-13, of H₂-12 to C-9, C-10, C-13 and C-26, as well as by comparison of the NMR data with those obtained for the structural analogue SB236050.²³ The position of the methoxy group CH₃-22 was deduced from its HMBC ³*J* correlation to C-15, whereas correlations of CH₃-26 to C-12 and C-13 confirmed its location at C-13. The aromatic ring was established by the HMBC correlations of H-6 to C-1, C-2, C-4, C-5 and C-18, as well as the ⁴*J* correlation to C-11. Correlations of the methoxy groups CH₃-27 and CH₃-28 to C-1 and C-18, respectively, confirmed their attachment at the aromatic ring. The relative stereochemistry of **1** was deduced from the coupling constants observed in the ¹H NMR spectrum as well as from the correlations detected in the ROESY spectrum (Table 1). The large non-geminal coupling of H-12 α to H-13 (10.9 Hz) indicated their axial-axial orientation. Furthermore, the ROESY correlation of H-13 to H-15 revealed axial orientation of the latter as well. The compound was found to be optically inactive, which indicated its racemic nature. Thus, **1** was identified as a new natural product for which we propose the name phomocyclinone.

Table 1. ^1H , ^{13}C NMR, COSY and HMBC data of **1** at 300 (^1H) and 75 (^{13}C) (MeOH- d_4 , δ in ppm, J in Hz)

Nr.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1		151.9		
2		137.3		
3		146.5		
4		116.5		
5		124.7		
6	7.10, <i>s</i>	110.0	27	4, 5, 1, 3, 2, 18, 11
9		166.1		
10		117.0		
11		175.6		
12	2.79, <i>dd</i> (3.8, 17.9) 2.69, <i>dd</i> (10.9, 17.9)	35.1	13, 15, 26	9, 10, 13, 26
13	4.4, <i>m</i>	63.5	12, 15, 26	
15	5.49, <i>s</i>	95.7	12, 13, 26	9, 10, 11, 13, 22
18		171.8		
22	3.53, <i>s</i>	55.7		15
26	1.41, <i>d</i> (6.2)	21.0	12, 13	9, 12, 13
27	4.02, <i>s</i>	57.3	6	1
28	3.95, <i>s</i>	53.3		18

Compound **2** had the molecular formula $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_6$ as determined by HR-ESIMS (m/z 241.0707 $[\text{M}+\text{H}]^+$). The presence of an α -pyrone core structure was indicated by the characteristic UV spectrum²⁴ observed for **2** and was confirmed by NMR spectroscopy (Table 2). The ^1H NMR spectrum revealed the presence of two olefinic protons at $\delta(\text{H})$ 6.77 (H-2') and 6.90 ppm (H-5), one hydroxy methylene group at $\delta(\text{H})$ 4.51 ppm (3- CH_2OH), an olefinic methyl group at $\delta(\text{H})$ 2.46 ppm (CH_3 -4'), and a methoxy group at 4.10 ppm (4- OCH_3). In addition, ^{13}C NMR and HMBC data showed one carboxy ester function at $\delta(\text{C})$ 165.6 ppm (C-2), two oxygenated sp^2 carbons at $\delta(\text{C})$ 169.7 (C-4) and 161.4 ppm (C-6), and two quaternary sp^2 carbons at $\delta(\text{C})$ 143.7 (C-1') and 107.9 ppm (C-3). The suggested α -pyrone core was confirmed by HMBC correlations observed from H-5 to C-3, C-4 and C-6, as well as from the hydroxy methylene group 3- CH_2OH to C-2, C-3 and C-4. The position of the methoxy group

was confirmed by its correlation to C-4. Correlations of CH₃-4' to C-1', C-2' and C-6 indicated its position at C-1' of the side chain, and corroborated the linkage of the latter to the pyrone nucleus at C-6. This was further confirmed by the correlation observed for H-5 to C-1'. The presence of a terminal carboxylic group was deduced from the HR-ESIMS and the fragment detected at m/z 196 [M-COO]⁻ in the ESIMS. The *trans* configuration of the double bond was confirmed by the 1D NOE correlation observed between CH₃-4' and H-5. Thus, **2** was identified as a new natural product for which we propose the name phomopyrone.

Table 2. ¹H, ¹³C NMR, COSY and HMBC data of **2** at 600 (¹H) and 100 (¹³C) (MeOH-*d*₄, δ in ppm, *J* in Hz)

Nr.	δ_H	δ_C	COSY	HMBC
2		165.6		
3		107.9		
4		169.7		
5	6.90, <i>s</i>	98.4		1', 3, 4, 6
6		161.4		
1'		143.7		
2'	6.77, <i>s</i>	122.2 ^a	4'	
3'		^b		
4'	2.46, <i>s</i>	13.7	2'	1', 2', 6
3-CH ₂ OH	4.51, <i>s</i>	54.0		2, 3, 4
4-OCH ₃	4.10, <i>s</i>	57.8		4

^a no signal detected in ¹³C NMR; chemical shift deduced from HMBC

^b no signal detected in ¹³C NMR

Compound **3** was obtained as white needles. The IIR-ESIMS exhibited a prominent peak at m/z 305.2323 [M+H]⁺ consistent with the molecular formula C₁₆H₃₂O₅. ¹H NMR and COSY spectra (Table 3) displayed characteristic signals for an aliphatic alkyl chain resonating between $\delta(H)$ 1.19 and 1.31 ppm (CH₂-8 to CH₂-15) with a terminal methyl group at $\delta(H)$ 0.87 ppm (CH₃-16), three methylene groups at lower field $\delta(H)$ 1.38/1.47 (CH₂-7), 1.64/1.74 (CH₂-6) and 1.81/2.25 ppm (CH₂-4), and three oxygenated *sp*³ methines at $\delta(H)$ 3.95 (H-2), 4.02 (H-3) and 4.31 ppm (H-5). The ¹³C NMR spectrum (Table 3) confirmed the

corresponding carbon signals and revealed in addition one carboxyl carbon at $\delta(\text{C})$ 173.1 ppm (C-1). Thorough inspection of the COSY spectrum showed that all protons (H-2 to CH₃-16) belong to one continuous spin system. Furthermore, HMBC correlations were observed for H-2 to C-1, C-3 and C-4, for H-3 to C-2 and C-4, for CH₂-4 to C-2 and C-3, for H-5 to C-4 and C-6, for CH₂-6 to C-4, C-5, C-7 and C-8, as well as for CH₂-7 to C-9. In addition, cross peaks were detected for the terminal CH₃-16 to C-14 and C-15, for CH₂-15 to C-14 and C-16, and for CH₂-14 to C-13, C-15 and C-16. Thus, **3** was determined to be 2,3,5-trihydroxypalmitic acid. The stereochemistry of the secondary hydroxyl groups was not determined due to the small sample amount of **3**.

Table 3. ¹H, ¹³C NMR, COSY and HMBC data of **3** at 600 (¹H) and 100 MHz (¹³C) (CHCl₃-*d*₁, δ in ppm, *J* in Hz)

Nr.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	-	173.1	-	-
2	3.95, <i>d</i> (9.7)	74.3	3	1, 3, 4
3	4.02, <i>dt</i> (4.0, 9.9)	69.3	2, 4	2, 4
4	2.25, <i>dt</i> (3.5, 13.7) 1.81, <i>dt</i> (11.8, 13.6)	35.8	3, 5	2, 3
5	4.31, <i>m</i>	78.7	4, 6	4, 6, 7
6	1.74, <i>m</i> 1.64, <i>m</i>	35.8	5, 7	4, 5, 7, 8
7	1.47, <i>m</i> 1.38, <i>m</i>	24.8	6, 8	9
8	1.19-1.31	29.3-29.6	7, 9	
9	1.19-1.31	29.3-29.6	8, 10	
10	1.19-1.31	29.3-29.6	9, 11	
11	1.19-1.31	29.3-29.6	10, 12	
12	1.19-1.31	29.3-29.6	11, 13	
13	1.19-1.31	29.3-29.6	12, 14	
14	1.22, <i>m</i>	31.9	13, 15	13, 15, 16
15	1.29, <i>m</i>	22.7	14, 16	14, 16
16	0.87, <i>t</i> (6.9)	14.2	15	14, 15

Two minor compounds (**4** and **5**) were isolated from a non-polar fraction, the structures of which were elucidated by EIMS and NMR spectroscopy. Compounds **4** and **5** were thus identified as dankasterone and (24*R*)-6 β -hydroxy-24-ethylcholest-4-en-3-one, respectively on the basis of their MS, ^1H and ^{13}C NMR data and by comparison with literature values.²⁵⁻²⁷

From an extract of *P. longicolla* cultured on white beans only the known compounds **6-9** were isolated. Nectriapyrone (**6**),^{28,29} 4-hydroxybenzoic acid (**7**),³⁰ protocatechuic acid (**8**)³¹ and (4-hydroxyphenyl)acetic acid (**9**)³² were identified based on UV, MS and NMR data analysis and by comparison with literature values.

The differences in the secondary metabolite profiles of rice and bean extracts were reflected in their bioactivities. The EtOAc extract of *P. longicolla* cultured on rice inhibited growth of L5178Y mouse lymphoma cells almost completely at a dose of 10 $\mu\text{g/mL}$ as shown with a MTT assay (Table 5). When the fungus was grown on white beans instead the bioactivity of the extract was completely lost (Table 5). Bioactivity-guided isolation of *P. longicolla* rice culture extract yielded phomocyclinone (**1**) with an IC_{50} value of 5.2 μM and the triketosteroid **4** with an IC_{50} of 14.6 μM as active principles. The remaining compounds were inactive in this bioassay. Crude extracts and isolated compounds proved also to be inactive when tested for insecticidal as well as antimicrobial activity against selected multidrug-resistant pathogens indicating that growth inhibition towards lymphoma cells is probably not caused by general toxicity but may rather be due to more specific interactions that remain to be elucidated.

Table 5. Cytotoxicity of *P. longicolla* extracts and isolated compounds

Samples tested	L5178Y growth in % (Conc. 10 μ g/ml)	IC ₅₀ (μ M)
<i>P. longicolla</i> rice EtOAc	1.2	n.d.
<i>P. longicolla</i> bean EtOAc	113.6	
1	0	5.2
3	98.1	
2	111.4	
4	0	14.6
5	101.4	
6	102.8	
7	80.8	
8	110.5	
9	112.9	

n.d. - not determined

Experimental Section

General Experimental Procedures. HPLC: Dionex system Ultimate 3000 pump + Ultimate 3000 DAD; column Eurospher 100-C₁₈, [5 μ m; 125 mm x 4 mm], Knauer; linear gradient 0.02% H₃PO₄ in H₂O and MeOH; flow-rate 1.0 ml/min. Semi-preparative HPLC: Merck-LaChrom L-7100 pump; Merck-LaChrom L-7400 UV-detector; Clarity Lite V2.7 analysis software, DataApex; column Eurospher 100-C₁₈ [5 μ m; 300 mm x 8 mm], Knauer; flow-rate 5.0 ml/min. Optical rotations: Jasco P-2000 polarimeter. 1D- and 2D-NMR Spectra: Bruker-ARX-500 or Avance-DMX-600 spectrometers; at 300 or 600 (¹H) and 75 or 100 MHz (¹³C); δ in ppm, *J* in Hz. ESIMS: Finnigan-LCQ-Deca mass spectrometer; in *m/z*. HR-ESIMS: Micromass-Q-ToF mass spectrometer; in *m/z*.

Fungal Material and Cultivation. The fungal strain *P. longicolla* was isolated from fresh, healthy leaves of the mangrove tree *Sonneratia caseolaris*, collected in October 2005 in Dong Zhai Gang-Mangrove Garden on Hainan Island, P. R. China, in addition to eight other species as previously described.³³ *P. longicolla* was taxonomically identified according to a previously described method.^{34,35} For cultivation of *P. longicolla* on solid white beans and

rice media, 80 g of white beans and 100 g of rice, respectively, were macerated in cold water for 4 h in 1L Erlenmeyer flasks each and then autoclaved. After cooling the media were inoculated under aseptic conditions as described previously.^{34,35}

Extraction and Isolation. Solid rice and bean cultures of *P. longicolla* were extracted with EtOAc and extracts were dried under reduced pressure. The crude extract of rice and bean cultures (24.9 and 14.6 g, respectively) were washed with dist. water and then fractionated between MeOH 90% and *n*-hexane. The MeOH fractions (16.4 and 9.36 g, respectively) were subjected to column chromatography on Diaion HP-20 and eluted using a stepwise gradient system from 100% H₂O to 100% MeOH, followed by washing with MeOH/acetone (1:1) and 100% acetone. Promising fractions were subjected to further chromatographic separation using Diaion HP-20 with H₂O, MeOH and Acetone as eluting solvents, silica gel 60 (VLC) with a stepwise gradient system from 100% *n*-hexane to 100% EtOAc and from 100% DCM to 100% MeOH, or Sephadex LH-20 eluted with 100% MeOH or DCM/MeOH (1:1). Final purification was performed by semi-preparative HPLC to yield **1** (11.0 mg), **2** (4.2 mg), **3** (2.2 mg), **4** (2.6 mg) and **5** (1.2 mg) from the rice extract, and **6** (2.6 mg), **7** (1.8 mg), **8** (2.1 mg) and **9** (2.0 mg) from the bean extract.

Phomocyclinone (1): brownish, amorphous powder, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 2^\circ$ (*c* 0.1, MeOH), UV λ_{max} (PDA): 240 and 301 nm, ¹H and ¹³C NMR: Table 1. HR-ESIMS: *m/z* 351.1074 [M+H]⁺ (calc. for C₁₇H₁₉O₈⁺, 351.10744).

Phomopyrone (2): yellow powder, UV λ_{max} (PDA): 237, 277 and 338 nm, ¹H and ¹³C NMR: Table 2. HR-ESIMS: *m/z* 241.0707 [M+H]⁺ (calc. for C₁₁H₁₃O₆⁺, 241.07066).

2,3,5-Trihydroxypalmitic acid (3): white needles, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22^\circ$ (*c* 0.3, MeOH), ¹H and ¹³C NMR: Table 3. HR-ESIMS: *m/z* 305.2323 [M+H]⁺ (calc. for C₁₅H₁₃O₆⁺, 305.2323).

Determination of Minimal Inhibitory Concentration. Tests were carried out according to the EUCAST (<http://www.eucast.org>) criteria in a dilution assay against the following multidrug-resistant pathogens: Bacteria: *Escherichia coli* (EC 15), *Klebsiella pneumoniae* (KL 18), *Pseudomonas aeruginosa* (PS 22), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 3), *Staphylococcus epidermidis* (11), *Streptococcus pneumoniae* (STR 7), *Enterococcus faecalis* (EK 4), and *Enterococcus cloacae* (35). Fungi: *Aspergillus fumigatus* (45) and *Candida albicans*.

Cell Proliferation Assay. Cytotoxicity was tested against the L5178Y mouse lymphoma cell line using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay.^{36,37}

Insecticidal Activity Assay. The laboratory colony was reared on artificial diet under controlled conditions at 26°C as described previously.³⁸ Feeding studies were carried out with neonate larvae of *Spodoptera littoralis* ($n = 10$ for each treatment). Neonate larvae were kept on diet treated with various concentrations of the analysed fractions at high concentrations (1500 and 5000 ppm). After 6 days survival and weight of the surviving larvae were recorded and compared with controls. Control diet was prepared with the carrier (EtOAc or MeOH) only.

References

1. Yang, R.; Yang, X.; Feng, L.; Zeng, Q. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine* **2010**, *27*, 535-543.
2. Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-36.
3. Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R. S.; Hess, W. M. *Microbiology* **1996**, *142*, 435-440.
4. Borel, J. F. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2002**, *114*, 433-7.
5. Ananda, K.; Sridhar, K. R. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 871-8.
6. Sengupta, A.; Chaudhuri, S. *Mycorrhiza* **2002**, *12*, 169-174.
7. Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1829-45.
8. Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. J. *Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257-268.
9. Jones, E. B. G.; Stanley Susan, J.; Pinruan, U. In *Botanica Marina*, 2008; p. 163.
10. Sridhar, K. R. *Curr. Sci.* **2004**, 1586-1587.

11. Babitha, S.; Soccol, C. R.; Pandey, A. *J. Basic Microbiol.* **2007**, *47*, 118-126.
12. Basyuni, M.; Baba, S.; Inafuku, M.; Iwasaki, H.; Kinjo, K.; Oku, H. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1786-800.
13. Bode, H. B.; Bethe, B.; Hofs, R.; Zeeck, A. *Chembiochem* **2002**, *3*, 619-27.
14. Kjer, J.; Wray, V.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Pretsch, A.; Lin, W.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2053-7.
15. Neysens, P.; Messens, W.; Gevers, D.; Swings, J.; De, V. L. *Microbiology* **2003**, *149*, 1073-1082.
16. Shwab, E. K.; Keller, N. P. *Mycol. Res.* **2008**, *112*, 225-30.
17. Wang, Y.; Lu, Z.; Sun, K.; Zhu, W. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 535-542.
18. Williams, R. B.; Henrikson, J. C.; Hoover, A. R.; Lee, A. E.; Cichewicz, R. H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1895-7.
19. Pettit, R. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 19-25.
20. Scherlach, K.; Hertweck, C. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1753-60.
21. Schroeckh, V.; Scherlach, K.; Nutzmam, H. W.; Shelest, E.; Schmidt-Heck, W.; Schuemann, J.; Martin, K.; Hertweck, C.; Brakhage, A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14558-63.
22. Rösberg, D.; Debbab, A.; Mándi, A.; Vasylyeva, V.; Böhrer, P.; Stork, B.; Engelke, L.; Hamacher, A.; Sawadogo, R.; Diederich, M.; Wray, V.; Lin, W.; Kassack, M.; Janiak, C.; Scheu, S.; Wesselborg, S.; Kurtán, T.; Aly, A. H.; Proksch, P. *J. Med. Chem.* **2013**, (in press).
23. Payne, D. J.; Hueso-Rodriguez, J. A.; Boyd, H.; Concha, N. O.; Janson, C. A.; Gilpin, M.; Bateson, J. H.; Cheever, C.; Niconovich, N. L.; Pearson, S.; Rittenhouse, S.; Tew, D.; Diez, E.; Perez, P.; de la Fuente, J.; Rees, M.; Rivera-Sagredo, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1880-1886.
24. Scott, A. I. *The Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products*; Pergamon Press: Oxford, 1964.
25. Arai, Y.; Nakagawa, T.; Hitosugi, M.; Shiojima, K.; Ageta, H.; Basher, O.; Abdel, H. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 471-474.
26. Della Greca, M.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430-1435.
27. Amagata, T.; Doi, M.; Tohgo, M.; Minoura, K.; Numata, A. *Chem. Commun.* **1999**, *0*, 1321-1322.
28. Avent, A. G.; Hanson, J. R.; Truneh, A. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1065-1066.
29. Nair, M. S. R.; Carey, S. T. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *19*, 1655-8.
30. The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra (1993), 2, 1084A
31. The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra (1993), 2, 1116B
32. Sowemimo, A. A.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Proksch, P.; Omobuwajo, O. R.; Adesanya, S. A. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1217-1222.
33. Rösberg, D.; Debbab, A.; Mándi, A.; Wray, V.; Dai, H.; Kurtán, T.; Proksch, P.; Aly, A. H. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3256-3259.
34. Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Müller, W. E.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schachtele, C.; Kubbutat, M. H.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972-980.
35. Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479-490.
36. Ebrahim, W.; Kjer, J.; El Amrani, M.; Wray, V.; Lin, W.; Ebel, R.; Lai, D.; Proksch, P. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1081-1091.
37. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 936-42.
38. Chaidir, J.; Hiort, J.; Nugroho, B. W.; Bohnenstengel, F. I.; Wray, V.; Witte, L.; Hung, P. D.; Kiet, L. C.; Sumaryono, W.; Proksch, P. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 837-842.

7 Diskussion

Die Bezifferung der einzelnen in diesem Abschnitt behandelten Verbindungen erfolgt analog zur Nummerierung im jeweiligen Manuskript mit zusätzlich vorangestellter Publikationsnummer (1, 2 bzw. 3).

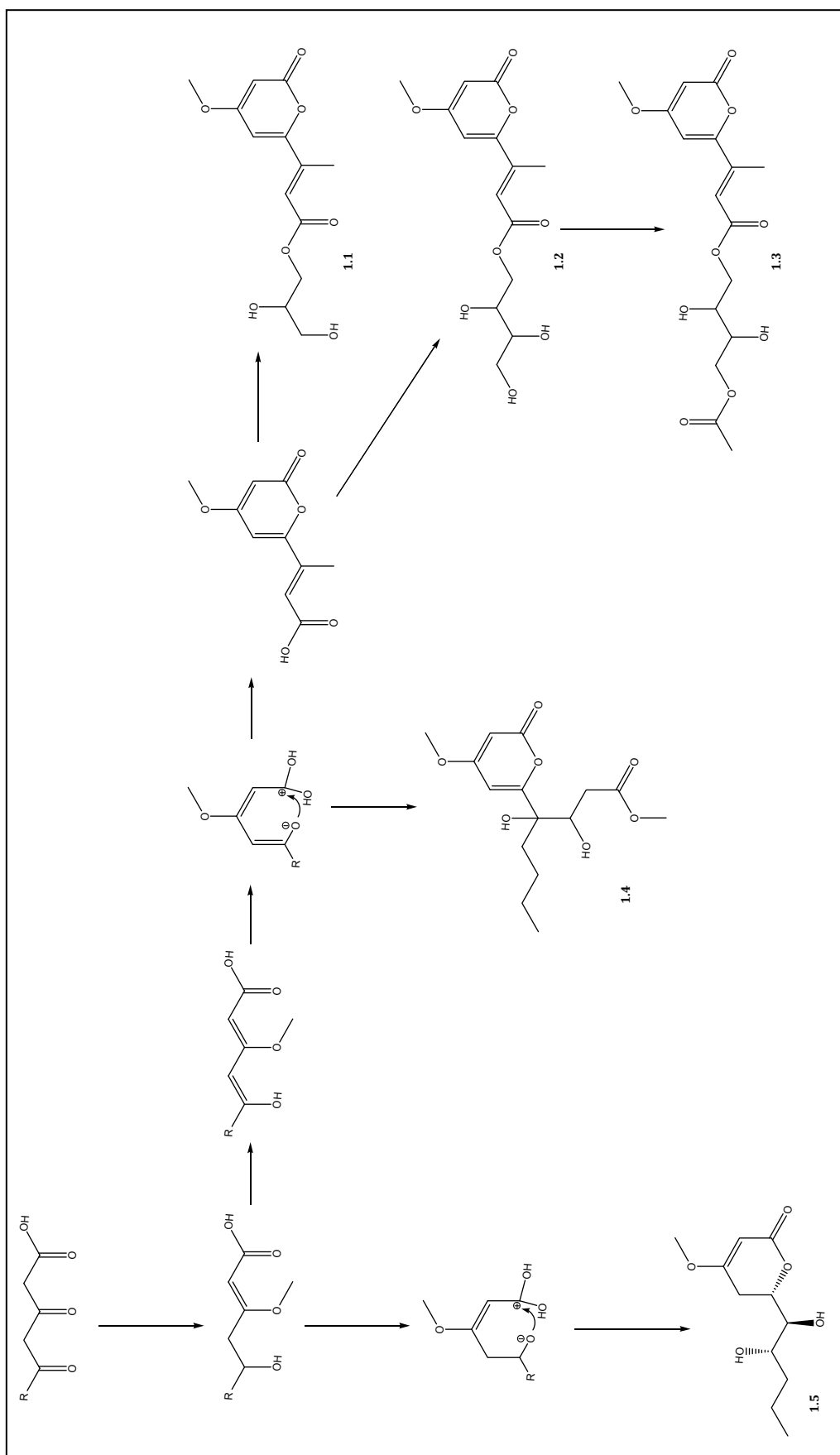
7.1 Isolierte Naturstoffe aus *Pestalotiopsis virgatula*

7.1.1 α -Pyronderivate

α -Pyron ist ein zweifach ungesättigter, sechsgliedriger, zyklischer Ester und kommt als Substruktur in einer Vielzahl natürlicher Stoffwechselprodukte vor, die verschiedenste biologische Funktionen, wie etwa die Verteidigung gegen andere Organismen (z.B. Bufadienolide), erfüllen oder als Intermediärprodukte bei der Biosynthese bestimmter Naturstoffe, wie Pheromonen, eine Rolle spielen (McGlacken und Fairlamb, 2005). Aus dem EtOAc-Extrakt des endophytischen Pilzes konnten die vier neuen Pyrone Pestalotiopyron I-L (**1.1-1.4**) isoliert werden. Darüber hinaus konnte die bereits aus weiteren *Pestalotiopsis*-Arten bekannte Substanz Pestalopyron gewonnen werden (Venkatasubbaiah und Van Dyke, 1991; Xu *et al.*, 2011). Entsprechend zahlreicher Literaturangaben werden auch die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Pyrone höchstwahrscheinlich enzymatisch durch Oxidations-, Reduktions- und Zyklisierungsreaktionen von β -Polyketo-Carbonsäuren im Verlaufe ihrer Biosynthese gebildet (Rawlings, 1999). Der gemeinsame hypothetische Biosyntheseweg für **1.1-1.4** ist in Schema 7.1 dargestellt. Aus biosynthetischen Überlegungen ließ sich darüber hinaus schlussfolgern, dass die 1,2,3,4-Butantetrol-Einheit in **1.2** und **1.3** höchstwahrscheinlich einem der beiden natürlichen Zuckeralkohole Threit ((2R, 3R)-1,2,3,4-butanetetrol, (2S,3S)-1,2,3,4-butanetetrol) oder Erythrit ((2R, 3S)-1,2,3,4-butanetetrol) entstammt. Erythrit ist aufgrund des spiegelsymmetrischen Aufbaus seiner Struktur (*meso*-Form) optisch inaktiv, während die Threit-Enantiomere optische Drehung aufweisen. Die Tatsache, dass **1.2** und **1.3** optisch aktiv sind und keine weiteren Stereozentren aufweisen, deutet darauf hin, dass sie mit dem Tetraol Threit verestert sind.

7.1.2 5,6-Dihydro- α -pyrone

Das neue 5,6-Dihydro- α -pyron (6S, 1'S, 2'S)-Hydroxypestalotin (**1.5**) sowie die bekannten Substanzen Pestalotin und Hydroxypestalotin wurden aus *P. virgatula* isoliert. Die beiden bekannten Substanzen wurden 1972/73 erstmals durch Ellestad und McGahren aus einer nicht bestimmten *Penicillium*-Spezies isoliert (Ellestad *et al.*, 1972; McGahren *et al.*, 1973). Pestalotin ist die erste Verbindung, für die eine



Schema 7.1: Gemeinsamer Biosyntheseweg der neuen Naturstoffe 1.1-1.5

synergetische Wirkung mit dem pflanzlichen Wachstumshormon Gibberellin nachgewiesen werden konnte (Kimura *et al.*, 1971). Ein möglicher Biosyntheseweg für **1.5** ist in Schema 7.I enthalten.

7.2 Isolierte Naturstoffe aus *Phomopsis longicolla*

Die Ergebnisse zu den in diesem Kapitel beschriebenen Substanzen finden sich in den Publikationen 2 und 3.

7.2.1 Polyketide

Aus den Reiskulturextrakten des endophytischen Pilzes konnten insgesamt zehn Polyketide (**2.1-2.8**, **3.1**, **3.2**) isoliert werden. Detaillierte, biogenetische Zusammenhänge der Substanzen wurden unter Berücksichtigung relevanter Quellen erstellt. Dieser biogenetische Kontext wird im Kapitel 7.2.1.2 für diese Substanzen zusammenfassend behandelt.

7.2.1.1 Substanzen

7.2.1.1.1 Endocrocin

Das Oxy-anthrachinon-Derivat Endocrocin (**2.8**) wurde erstmals durch Asahina und Fujikawa aus der in Japan beheimateten Blattflechte *Nephromopsis endocrocea* isoliert (Asahina und Fujikawa, 1935) und später durch Waser *et al.* effektiv partial-synthetisch gewonnen (Waser *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte die Substanz durch den Autor mittels säulenchromatographischer Verfahren aus dem Pilz-Extrakt isoliert werden. Aufgrund seiner Stellung im Polyketidstoffwechsel spielt es eine wichtige Rolle bei der molekularbiologisch-chemischen Untersuchung von Biosynthesewegen in Mikroorganismen (Chiang *et al.*, 2010).

7.2.1.1.2 Benzophenone

Erstmalig wurde Monodictyphenon (**2.7**) im Jahre 2005 durch Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2005) beschrieben. Dies ist ein bemerkenswert später Zeitpunkt angesichts der relativ simplen strukturellen Komposition der Verbindung sowie der Schlüsselrolle, die sie im Polyketidstoffwechsel biologisch hochinteressanter Folgeprodukte einnimmt. Das neue Konstitutionsisomer Isomonodictyphenon (**2.6**) könnte diese Position gleichberechtigter Maßen einnehmen und strukturelle Variationen im Bezug auf die Position der Methylgruppe am aromatischen Ring bestimmter Dihydroxanthon-Derivate, wie etwa dem Nidulalin A (Kawahara *et al.*, 1994) und anderer Benzophenon-Abkömmlinge erklären. **2.6** und **2.7** zeigten im DPPH-Assay bemerkenswerte radikalfangende Aktivität, was sich durch das Strukturmerkmal der mehrfach hydroxylierten Aromaten erklären lässt.

7.2.1.1.3 Tetrahydroxanthenon-Verbindungen

Derivate des 9*H*-Xanthen-9-ons (griech. *xanthos* = gelb) werden von einer Vielzahl an Bakterien, Pilzen und Flechten produziert. Die einzelnen Verbindungen sind vielfältig substituiert und weisen unterschiedliche Sättigungsgrade auf. So kommen neben den vollaromatischen Xanthonen (**I**) auch Dihydro- (z.B. **II**), Tetrahydro- (z.B. **III**) und selten Hexahydroxanthenone (**IV**) vor (Abb. 7.I). Die Substanzgruppe zeichnet sich durch eine Reihe verschiedener biologischer Aktivitäten aus (El-Seedi *et al.*, 2010; Masters und Bräse, 2012), auf die in Kapitel 7.4 detailliert eingegangen wird.

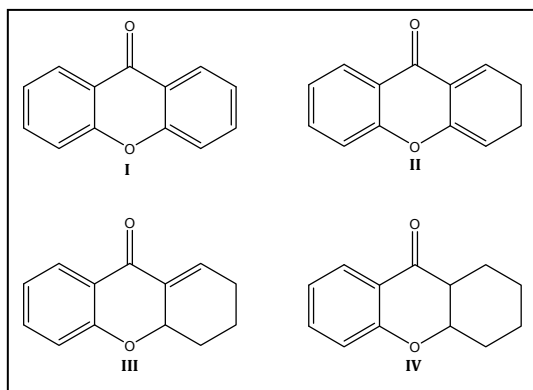


Abbildung 7.I Xanthon und Beispiele für hydrierte Xanthone

Bei den in dieser Arbeit gefundenen Phomoxanthon- und Dicerandrol-Derivaten (**2.1-2.4**) handelt es sich um dimere Tetrahydroxanthenone mit jeweils sechs Stereozentren. Bei diesen Substanzgruppen sind zwei chemisch nah verwandte oder identische Tetrahydroxanthenon-Monomere über eine Biarylfunktion miteinander verknüpft. Diese Verknüpfung kann symmetrisch oder asymmetrisch erfolgen. Neben diesen beiden Gruppen dimerer Tetrahydroxanthenon-Verbindungen sind die Secalonsäuren (Kurobane *et al.*, 1987) und Rugulotrosine (Stewart *et al.*, 2004) weitere Beispiele für in der Natur vorkommende bioaktive Tetrahydroxanthenon-Dimere.

Die entsprechenden monomeren Verbindungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Natürliche vorkommende Tetrahydroxanthenon-Monomere sind jedoch seit einiger Zeit bekannt. 1978 isolierte Turner die Verbindung Diversonol (Turner, 1978). 16 Jahre später isolierten Krick *et al.* ähnliche Substanzen (Monodictysin-Reihe) aus *Monodictys putredinis*, einem Schlauchpilz, den sie aus einer ungenannten Grünalgen-Art isolieren konnten (Krick *et al.*, 2007). Weitere Beispiele für natürliche, monomere Xanthon-Derivate sind Nidulalin A (Kawahara *et al.*, 1994) und die erst kürzlich entdeckten Blennoide (Zhang *et al.*, 2008), die monomeren Biosynthese-Vorstufen der Secalonsäuren. Aufgrund ihrer starken Toxizität, aus der sich zahlreiche interessante Bioaktivitäten ableiten, zählt man die Tetrahydroxanthenone zu den Mykotoxinen (Steyn, 1992).

7.2.1.1.4 Phomo-2,3-dihydro-chromon

Diesem neuen 2,3-Dihydro-chromon-Derivat (**2.5**) konnten keine Bioaktivitäten nachgewiesen werden. Die Substanz ist die erste bekannte Verbindung mit einem 2,3-Dihydro-chromon-System, welches an Position 3 mit einer 5-Oxofuran-2(5*H*)-yliden-Einheit verknüpft ist.

7.2.1.1.5 Phomocyclinon

Die in dieser Arbeit isolierte Verbindung Phomocyclinon (**3.1**) ist strukturell mit den Chaetocyclinonen A und B verwandt, die erstmals 2007 aus einer *Chaetomium*-Art isoliert wurden (Lösgen *et al.*, 2007). Für Chaetocyclinon A konnten Lösgen *et al.* eine antimykotische Wirkung gegen *Phytophthora infestans* nachweisen. Zytotoxizitätsexperimente mit verschiedenen Krebszelllinien blieben für Chaetocyclinon A und B ohne Befund. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich interessanter Weise, dass die strukturell ähnlich aufgebaute Verbindung Phomocyclinon (**3.1**) stark zytotoxische Wirkung an Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y) entfaltet.

7.2.1.1.6 α -Pyrone

Wie auch schon bei der Untersuchung des endophytischen Pilzes *Pestalotiopsis virgatula* (vgl. Kap. 7.1.1) konnten aus *Phomopsis longicolla* ebenfalls zwei α -Pyrone Phomopyron (**3.2**) und Nectriapyron (**3.7**) isoliert werden. Die Struktur der aus dem Bohnenextrakt isolierten Verbindung Nectriapyron (**3.7**) kann theoretisch in zwei Isopreneinheiten unterteilt werden. Nair und Carey beschrieben die Substanz erstmals und untersuchten dabei auch seine biosynthetische Herkunft durch Fütterungsversuche mit [2-¹⁴C]-Mevalonsäure und postulierten eine monoterpenoide Biogenese für **3.7** (Nair und Carey, 1975). 1992 konnten Avent *et al.* mittels Fütterungsversuchen mit [Me-²H₃]-Methionin belegen, dass Nectriapyron aus einer Tetraketid-Vorstufe gebildet wird und dabei zwei zusätzliche, markierte Kohlenstoffatome durch Methylgruppen-Übertragung von markiertem Methionin erhält (Avent *et al.*, 1992). Ebenso kann die Biosynthese von Phomopyron (**3.2**) analog der in Kap. 7.1.1 dargestellten Stoffwechselwege aus einem Oktaketid angenommen werden.

7.2.1.2 Biosynthese der Polyketide

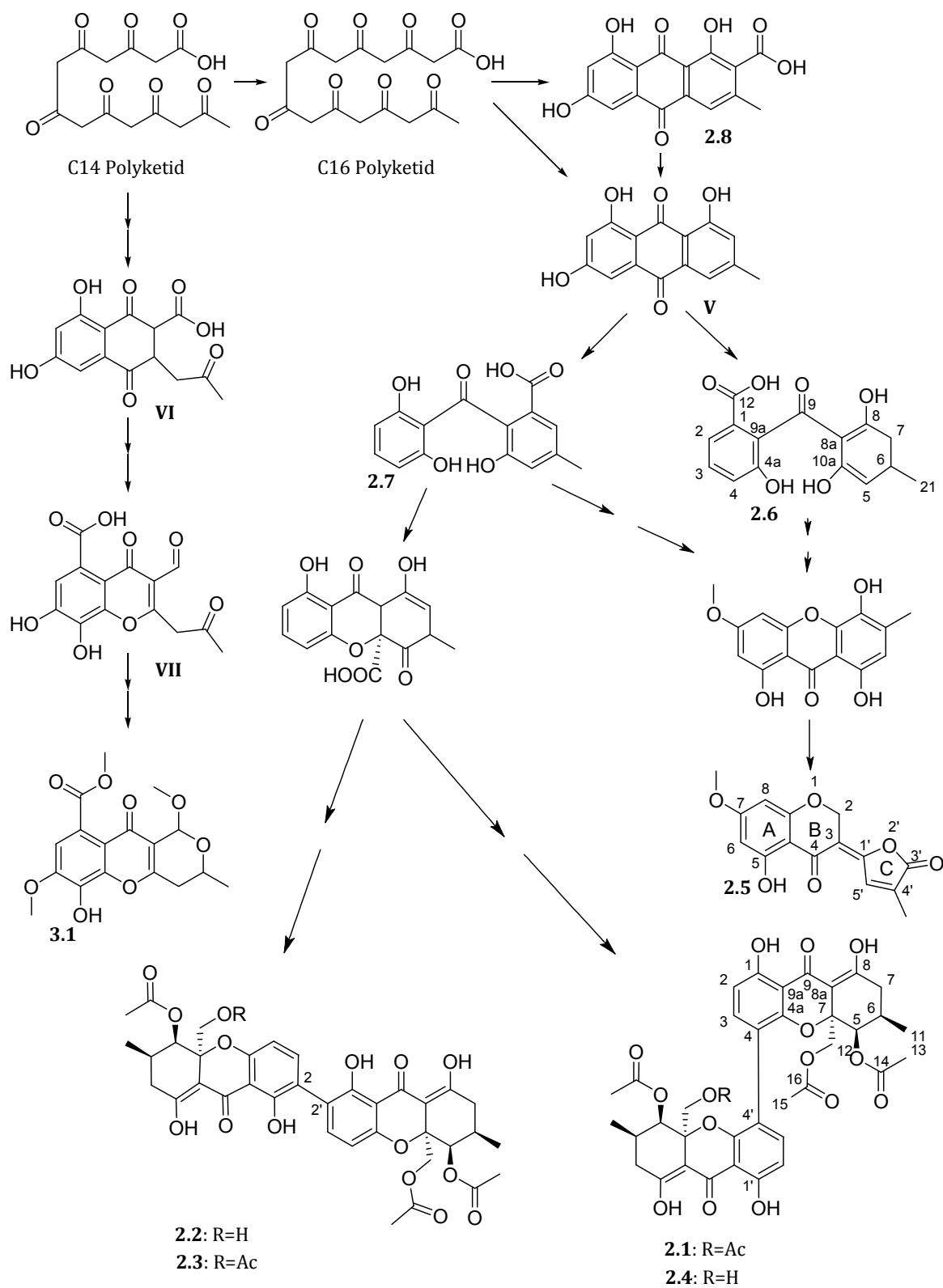
Im Rahmen dieser Arbeit wurden vermehrt strukturell nah verwandte oder voneinander abgeleitete Polyketide isoliert und strukturell aufgeklärt. Diese Tatsache wirft die Frage nach den biosynthetischen Zusammenhängen dieser Verbindungen auf. Grundsätzlich verläuft die Biosynthese der Polyketide über Poly- β -Ketoester verschiedener Kettenlängen. Diese werden an Polyketidsynthasen aus Acetyl-CoA

und Malonyl-CoA gebildet und durch Reduktions-, Oxidations- und Zyklisierungsreaktionen weiter enzymatisch umgesetzt. Der Hauptanteil der in dieser Arbeit aus *Phomopsis longicolla* isolierten Polyketide entstammt einem C₁₆-Oktaketid (Schema 7.II). In der Reaktionsfolge entstehen daraus zunächst Anthrachinone, wie z.B. das Endocrocin (**2.8**). Eine besondere Rolle im Stoffwechsel der in dieser Arbeit isolierten Polyketide und im speziellen der dimeren Tetrahydroxanthanon-Verbindungen spielt das Benzophenon-Derivat Monodictyphenon (**2.7**). Es entsteht durch oxidative Ringöffnung des aus Endocrocin (**2.8**) hervorgehenden Anthrachinons Emodin (**V**) zwischen C-4a und C-10. Das Konstitutionsisomer Isomonodictyphenon (**2.6**) entsteht höchst wahrscheinlich auf gleiche Weise, jedoch kommt es dabei zur Spaltung der kovalenten C-10/C-10a-Bindung, was zur Folge hat, dass die Methylgruppe in diesem Falle am symmetrischen Dihydroxyphenylrest lokalisiert ist, und sich die Säurefunktion in *meta*-Position zur OH-Gruppe im zweiten Phenylrest befindet. Benzophenone können enzymatisch durch oxidative Phenolkupplung zu Xanthonen umgesetzt werden und schließlich zu, Phomoxanthonen (**2.1**, **2.4**), Dicerandrolen (**2.2**, **2.3**) und ähnlichen Verbindungen dimerisieren (Chiang *et al.*, 2010; El-Seedi *et al.*, 2010; Masters und Bräse, 2012). Die Ausbildung des Xanthonringsystems findet - wie durch Kurobane *et al.* nachgewiesen werden konnte - vor der Dimerisierung statt (Kurobane *et al.*, 1978).

Breinholt *et al.* haben gezeigt, dass die Oxofuranyliden-Einheit des Triketids Xanthofusin durch oxidative Ringöffnung einer aromatischen Vorstufe entsteht (Breinholt *et al.*, 1993). Analog dazu kann auch die Bildung dieser Substruktur in Phomo-2,3-dihydro-chromon (**2.5**) erklärt werden. Im vorliegenden Falle ist die Methylgruppe höchstwahrscheinlich rein polyketidischer Natur, und nicht wie im Falle des Xanthofusins durch nachträgliche Methylierung (Methionin) erklärbar. Evidenz dafür bietet die Tatsache, dass die geeignete CH₃-Einheit bereits in der Benzophenon-Vorstufe und damit auch nach Rezyklisierung in dem nachfolgenden Xanthon-Intermediat vorhanden ist.

Die Biosynthese von Chaetocyclinon A wurde durch Fütterungsversuche mit [1-¹³C]-sowie [1,2-¹³C]-markierter Essigsäure durch Lösgen *et al.* untersucht (Lösgen *et al.*, 2007). Der Biosynthese der strukturell sehr nah verwandten Substanz Phomocyclinon (**3.1**) kann analog dazu ein Heptaketid zugrundegelegt werden, welches über Kondensationsreaktionen und Zyklisierung zu einem Hydroxynaphthochinon (**VI**) umgesetzt wird (Schema 7.II). Ähnlich der bereits beschriebenen Biosynthese der Benzophenone kommt es im Folgenden zur Bildung eines Benzoessäurederivates durch oxidative Ringöffnung. Nach Rotation des aromatischen Ringes entsteht durch erneute Ringbildung das Chromon **VII**, dessen terminale COOH-Funktion zum Aldehyd reduziert wird. Nach Redox-Reaktionen zum

Diol reagiert die Seitenkette dieses Produktes intramolekular mit der Aldehydfunktion zum zyklischen Acetal; schließlich werden drei freie Hydroxygruppen methyliert (**3.1**).



Schema 7.II. Möglicher Biosyntheseweg der Polyketide 2.1-2.8 und 3.1.

7.2.2 Phenolsäuren

Die in diesem Kapitel beschriebenen Substanzen konnten aus dem Bohnenkulturextrakt des Pilzes isoliert werden (Publikation 3).

7.2.2.1 Benzoessäurederivate

Die einfachen Phenolsäuren *p*-Hydroxybenzoessäure (**3.8**) und Protocatechusäure (PCS, **3.9**) sind in der Natur weit verbreitet. Sie finden sich in zahlreichen als Lebensmittel genutzten Pflanzen, wie der Reispflanze *Oryza sativa* oder der Küchenzwiebel *Allium cepa* (Tanaka *et al.*, 2011). Auch in Früchten wie Pflaumen (*Prunus domestica*) (Kayano *et al.*, 2002), Mandeln (*Prunus amygdalus*) (Sang *et al.*, 2002) oder Weintrauben (*Vitis vinifera*) (Li *et al.*, 1993) konnten diese einfachen Phenolsäuren nachgewiesen werden. Das Vorkommen solcher Substanzen in endophytischen Pilzen ist ebenfalls bekannt (Sowemimo *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2002).

Aufgrund der phenolischen Hydroxylfunktionen besitzen die Substanzen in aller Regel eine ausgeprägte antioxidative Wirkung. Für PCS (**3.9**) ist eine zehnfach stärkere antioxidative Wirkung als α -Tocopherol beschrieben (Ueda *et al.*, 1996). Im Tierversuch konnten Beytur *et al.* zeigen, dass PCS (**3.9**) die toxischen Effekte von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin – einem langlebigen, sehr giftigen und trivial als Dioxin bekannten Industrieschadstoff – auf die Reproduktionsfähigkeit von Ratten senkt (Beytur *et al.*, 2012). Borate *et al.* konnten lipidsenkende Eigenschaften für PCS (**3.9**) im Tierversuch an Ratten nachweisen (Borate *et al.*, 2012).

Die Datenlage zur biologischen Aktivität von PCS (**3.9**) ist jedoch widersprüchlich; einige Studien haben gezeigt, dass es als Antioxidans wirkt und dadurch die chemische Karzinogenese unterdrücken kann, und andere, dass es oxidativen Stress induziert und damit Tumorbildung fördern kann (Babich *et al.*, 2002). Japanische Forscher untersuchten die vermeintlich protektive Wirkung von PCS (**3.9**) auf künstlich induzierten Hautkrebs bei Mäusen. Dabei konnten sie feststellen, dass PCS (**3.9**) nicht nur keinen schützenden Effekt aufweist, sondern vielmehr eine deutliche Verstärkung der Hautkrebsbildung bei Mäusen im Zusammenspiel mit bestimmten Noxen herbeiführt (Nakamura *et al.*, 2000).

7.2.2.2 4-Hydroxyphenylelessigsäure

4-Hydroxyphenylelessigsäure (**3.10**) wurde erstmals 1912 aus der Wurzel der Löwenzahnpflanze *Taraxacum officinale* isoliert und beschrieben (Power und Browning, 1912). Später konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass es sich bei der Substanz um einen ubiquitär vorkommenden Metaboliten handelt, für den spezifische Abbauwege in Bakterien und Pilzen existieren (Adachi *et al.*, 1964; Sparnins *et al.*, 1978; Sparnins *et al.*, 1974). Experimente von Fries zeigen, dass **3.10**

und sein dehydroxyliertes Derivat Phenylelessigsäure als natürliche Wachstumsregulatoren in Braunalgen fungieren (Fries, 1977).

4-Hydroxyphenylelessigsäure (**3.10**) kommt neben einer Reihe weiterer Phenolsäuren in nativem Olivenöl vor. Die Menge an phenolischen Verbindungen ist ein sehr wichtiger Parameter bei der Bewertung der Qualität nativer Olivenöle (Cortesi, 1981; Solinas, 1982). Die Phenolsäuren spielen für die Haltbarkeit eine wichtige Rolle und sind darüber hinaus auch für den Säuregehalt und die Bitterkeit und damit maßgeblich für den Geschmack der Öle verantwortlich. Zudem haben Studien gezeigt, dass die Menge an Phenolen zusammen mit einem hohen Anteil monoungesättigter bis mehrfach ungesättigter Fettsäuren, zu den gesundheitsfördernden Eigenschaften nativen Olivenöls beiträgt (Bendini *et al.*, 2007).

7.2.2.3 Biosynthese einfacher Phenolsäuren

Aus aliphatischen Vorstufen werden in der Natur aromatische Verbindungen hauptsächlich auf drei Wegen gebildet:

- Shikimisäureweg, der u.a. zu aromatischen Aminosäuren und Phenylpropanen führt.
- Acetat-Malonat-Weg, der durch Zyklisierungsreaktionen von Polyketoverbindungen zu aromatischen Verbindungen führt.
- Isoprenoidweg: Sich aus den Biosynthesewegen Acetat-Mevalonat-Weg bzw. 1-Desoxy-D-xylulose-Weg ergebende Isoprenoide können beispielsweise in Form von Monoterpenen dehydriert und enzymatisch zu Aromaten umgesetzt werden.

Bei vielen aromatischen Substanzen lässt sich aufgrund ihres Substitutionsmusters ableiten über welchen dieser Wege ihre Biosynthese verlaufen ist. *Para*-substituierte Phenole entstehen zumeist aus dem Shikimisäureweg (Hänsel und Sticher, 2007). Von diesem Weg ausgehend verläuft die Verkürzung der C₃-Seitenkette der entstandenen Phenylpropane ähnlich der β -Oxidation der Fettsäuren (Schneider, 2011). Die in dieser Arbeit isolierten Phenolsäuren entsprechen diesem Substitutionsmuster; darüber hinaus belegen gezielte Untersuchungen die Biogenese dieser Verbindungen über den Shikimisäureweg (Barker und Frost, 2001).

7.2.3 Steroide

Das bereits bekannte Stigmasterolderivat **3.5** wurde erstmals 1972 aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* isoliert (Katsui *et al.*, 1972). Später wurde diese Verbindung durch eine Vielzahl von Forschergruppen aus verschiedenen anderen Pflanzenarten isoliert (siehe u.a.: Arai *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2011; Della Greca *et al.*,

1990; Feng *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Leu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008)). Einige von ihnen untersuchten auch die biologischen Aktivitäten der in ihren Arbeiten isolierten Substanzen. So testeten sie etwa die anti-inflammatorische Wirkung (Huang *et al.*, 2011), die zytotoxische (Liu *et al.*, 2008) sowie die radikalfangende Aktivität (Leu *et al.*, 2011), konnten aber keine Wirkung für **3.5** nachweisen.

Bisher wurde **3.5** ausschliesslich aus pflanzlichen Quellen isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass **3.5** auch von endophytischen Pilzen produziert wird.

Ein zweites im Rahmen dieser Arbeit isoliertes Triterpen - das Triketosteroid **3.6** - wies interessanter Weise im Zytotoxizitäts-Assay an L5178Y-Maus-Lymphomzellen einen EC₅₀-Wert von 6.2 µg/ml auf. Sakagami *et al.* werteten die Daten von etwa 1000 Verbindungen aus, die als gemeinsames Charakteristikum α,β -ungesättigte Ketofunktionen besitzen, und fanden heraus, dass diese Substanzen besonders häufig zu nicht-apoptotischem Zelltod bestimmter Zelllinien in entsprechenden Biotests führen (Sakagami *et al.*, 2007). Auch die hier festgestellte Zytotoxizität von **3.6** an L5178Y-Zellen könnte sich demnach durch dieses Strukturmerkmal in den Ringen A und B erklären lassen; zu eingehenden SAR-Untersuchungen stand jedoch nicht genügend Substanzmenge zur Verfügung.

Die Biosynthese der Triterpene wird von Hänsel und Sticher (Hänsel und Sticher, 2007) umfassend dargestellt und hier kurz erläutert. Das biosynthetisch gesehen erste azyklische Triterpen Squalen wird an einem Multienzymkomplex, der u.a. eine Epoxidase sowie eine Zyklase umfasst, erst zum 2,3-Oxidosqualen epoxidiert und schließlich zu einem tetrazyklischen Kation zyklisiert. Das aus diesem Zwischenprodukt resultierende Lanosterol wird durch verschiedene Enzyme, wie Demethylasen, Methyltransferasen, Reduktasen und Oxidasen, weiter zu diversen Steroiden umgesetzt (Lees *et al.*, 1995). Durch die eingangs beschriebene Oxidierung des Squalens, die die Reaktivität der Zwischenstufe steigert und die enzymatische Zyklisierungsreaktion ermöglicht, tragen aus der Biosynthese hervorgehende Steroide üblicher Weise eine Hydroxylfunktion an C-3. Diese kann, wie im Falle des Steroids **3.6**, auch zur Ketofunktion oxidiert werden.

7.2.4 2,3,5-Trihydroxypalmitinsäure

Das neue Palmitinsäurederivat **3.3** konnte als Präzipitat aus einer MeOH/DCM-Lösung nach Filtration und Waschen mit MeOH gewonnen werden. In den durchgeführten Bioassays wurden für **3.3** keine Aktivitäten nachgewiesen. **3.3** besitzt drei Stereozentren an den Positionen 2, 3 und 5. Die von Matsumori *et al.* entwickelte und auf der Auswertung von Kopplungskonstanten ($^2J_{C,H}$ und $^3J_{H,H}$) basierende

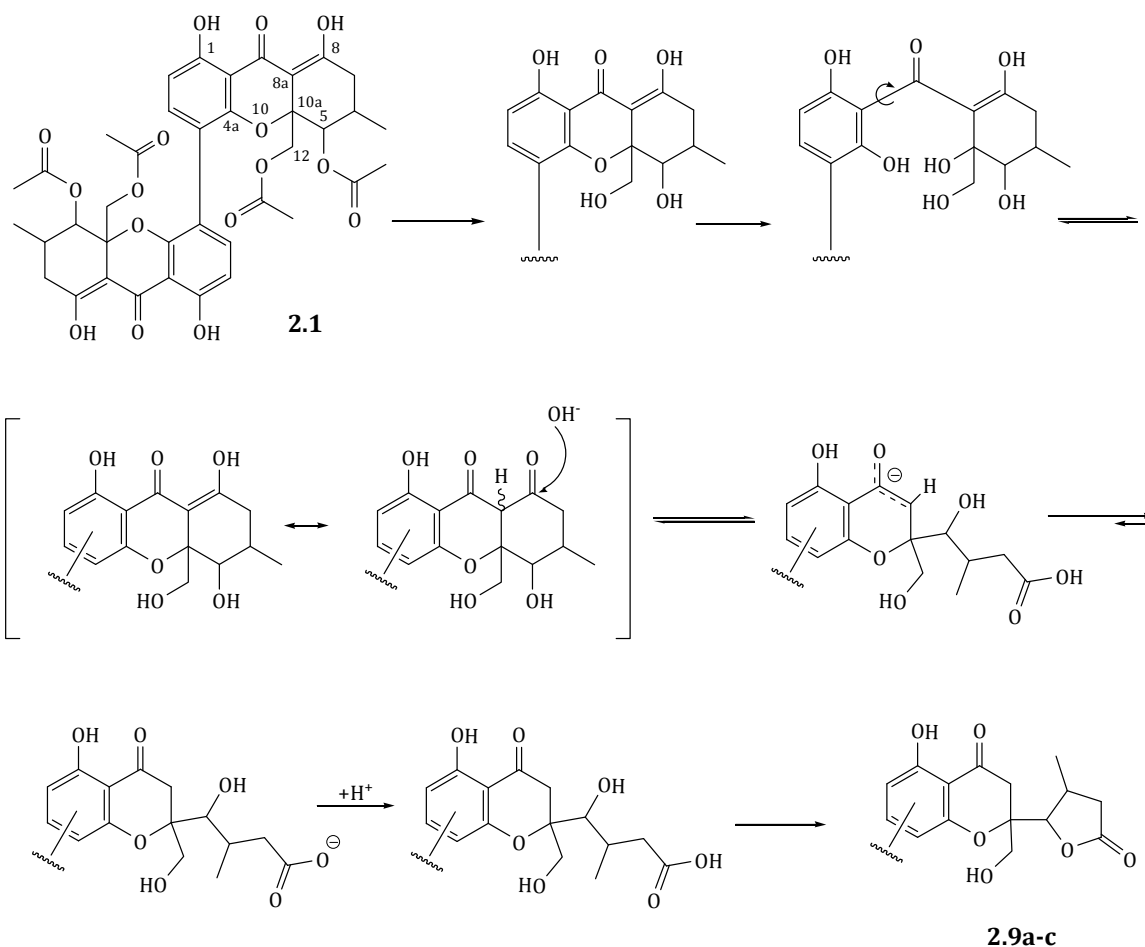
Methode (Matsumori *et al.*, 1999) zur Aufklärung der relativen Stereochemie azyklischer Kohlenwasserstoffe konnte aufgrund der geringen Substanzausbeute nicht angewendet werden.

7.3 Semisynthetische Hydrolyseprodukte

7.3.1 Hydrolyseprodukt I, II und III

Durch basische Hydrolyse im wasserfreien Milieu konnten in dieser Arbeit drei vom Naturstoff Phomoxanthon A (**2.1**) abgeleitete, partialsynthetische Produkte (**2.9a-2.9c**) gewonnen werden. Die Reaktion beginnt höchstwahrscheinlich mit der hydrolytischen Abspaltung der Acetylfunktionen an 5/5' bzw. 12/12' (Schema 7.III). Im weiteren Verlauf kommt es zur Öffnung des vinylogen, intramolekularen Esters in Position 10. Diese hydrolytische Esterspaltung verläuft reversibel, wobei es zwischenzeitlich zur Rotation um die 9,9a- bzw. 9',9a'-Bindung kommen kann und sich die vinyloge Esterfunktion alternativ durch elektrophilen Angriff der 1/1'-OH-Gruppe an C-10a/10a' ausbilden kann. Auf diese Weise erklärt sich das Vorliegen der 2,4'- bzw. 2,2'-verknüpften Biarylachsen der Produkte **2.9a-2.9c**. Die Enolfunktion in Pos. 8 kann unter Basekatalyse zum β -Diketon tautomerisieren. Bei dieser im basischen Milieu bevorzugten Ketoform kommt es zum nucleophilen Angriff eines Hydroxidions an C-8 und anschließend zur Ringöffnung zwischen 8,8a bzw. 8'/8a'. Die so entstandene negative Ladung an Pos. 8a ist mesomeriestabilisiert und wird durch intramolekulare Protonenwanderung an dieser Stelle neutralisiert. Die in jeder der beiden monomeren Hälften entstandene Seitenkette – eine γ -Hydroxycarbonsäurefunktion – kann säurekatalysiert durch Ringschluss zum Lacton reagieren.

Die Substanzen **2.9a-2.9c** wiesen in keinem der durchgeführten Bioassays bemerkenswerte Aktivität auf.

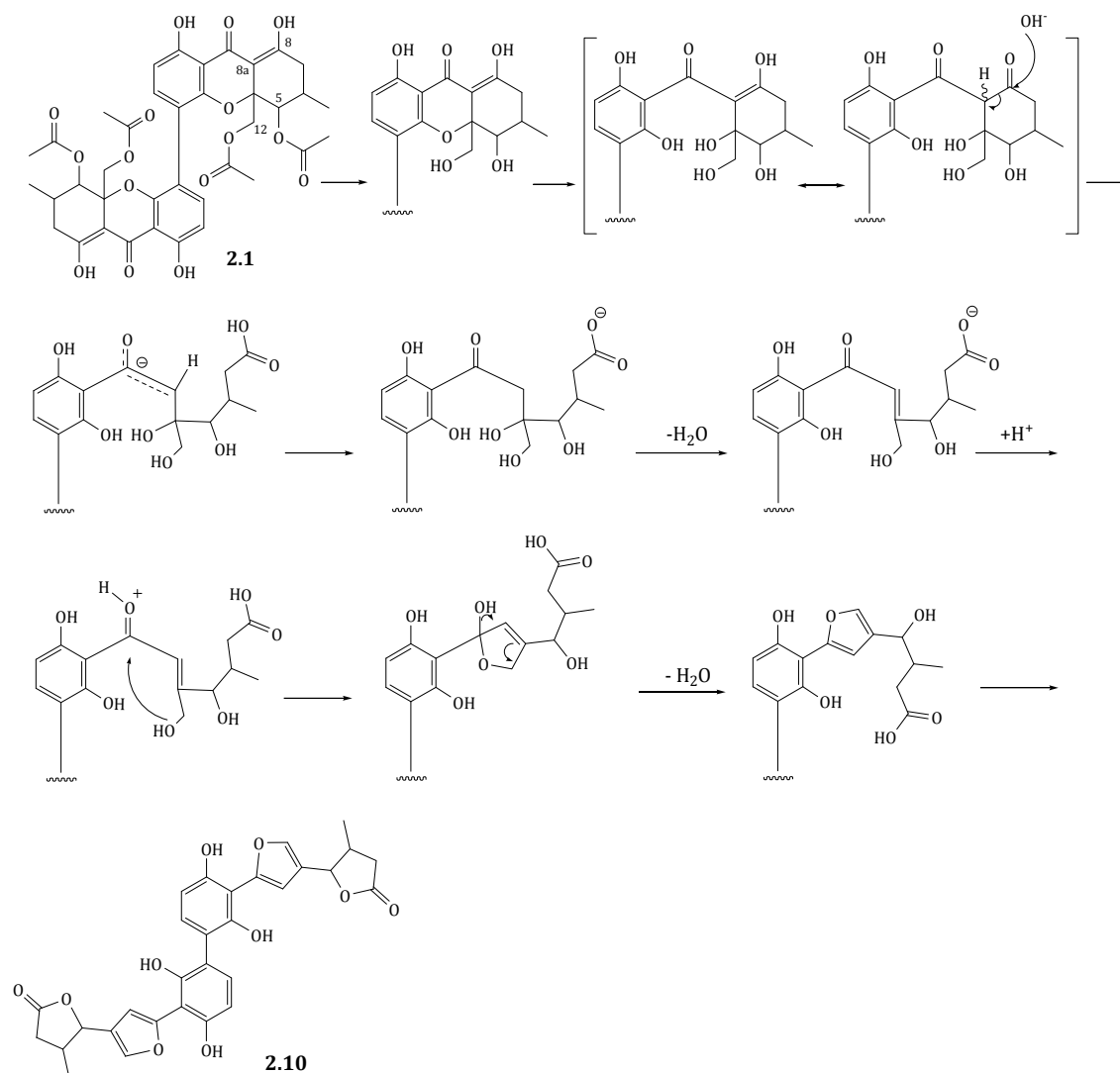


Schema 7.III Postulierter Reaktionsverlauf der basischen Hydrolyse von Phomoxanthon A (2.1) in Ethanol bei Raumtemperatur.

7.3.2 Hydrolyseprodukt IV

Durch Erhitzen des Naturstoffes Phomoxanthon A (**2.1**) in einer 0,5 N NaOH-Lösung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die neue Substanz **2.10** erzeugt werden. Schema 7.IV zeigt den postulierten Reaktionsablauf, der mit der Abspaltung der Acetylgruppen beginnt. Im weiteren Verlauf kommt es nach hydrolytischer Spaltung des vinylogenen, intramolekularen Esters zu einer β -Diketonspaltung zwischen C-8/8' und C-8a/8a'. Die Esterspaltung ist unter den vorliegenden, stark basischen Bedingungen bei Hitzeeinwirkung nicht unmittelbar reversibel, so dass vermehrt die offenkettige Form vorliegt. Durch anschließendes Ansäuern kommt es zur Kondensation der Hydroxylfunktion in Position 10a/10a'. Die enolisierbare γ -Dicarbonyleinheit zyklisiert zum Furanylring, wobei im vorliegenden Falle der postulierte Reaktionsmechanismus für die Paal-Knorr-Synthese (Amarnath und Amarnath, 1995) zur Synthese von 1-Hetero-2,4-cyclopentadieneinheiten angenommen werden kann. Anschließend kommt es zur Lactonisierung der entstandenen Seitenketten (γ -Hydroxycarbonsäure).

2.10 erwies sich in allen durchgeführten Bioassays als inaktiv.



Schema 7.IV Möglicher Reaktionsverlauf der basischen Hydrolyse von Phomoxanthon A (2.1) unter Erhitzen in Wasser.

7.3.3 Deacetylphomoxanthon A

Deacetylphomoxanthon A (**2.11**) wurde nach der von Isaka *et al.* beschriebenen Methode (Isaka *et al.*, 2001) durch saure Hydrolyse von Phomoxanthon A (**2.1**) dargestellt und mittels verschiedener Bioassays auf seine biologische Wirkung hin untersucht. Gemäß den bisher in der Literatur bekannten Resultaten, konnte auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bioassays der wirksamkeitsmindernde Effekt der Deacetylierung des Naturstoffs Phomoxanthon A (**2.1**) belegt werden.

7.4 Struktur und Wirkung – Die Bedeutung des Tetrahydroxanthanon-Gerüsts für die Bioaktivität

Die bisher größte bekannte Gruppe sekundärer Inhaltsstoffe aus Pilzen mit Tetrahydroxanthanon-Gerüst stellen die Secalonsäuren dar (Spiegl, 2008). Ihr Wirkspektrum ist breit gefächert und umfasst unter anderem neben antibakterieller, mykostatistischer, antiphlogistischer und zytotoxischer Aktivität auch HIV-Protease hemmende Wirkung (Lesch und Bräse, 2004). Diese und andere potentiell pharmazeutisch relevanten Bioaktivitäten zeichnen in unterschiedlichem Umfang neben den Secalonsäuren auch alle weiteren bekannten dimeren Tetrahydroxanthanon-Gruppen aus. Diese auffallend hohe Bandbreite pharmakologischer Effekte führte zur Beschreibung „privileged structures“ für diese Substanzklasse (Masters und Bräse, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die radikalfangenden Eigenschaften sowie insektizide, zytotoxische, immunmodulatorische und antibakterielle Wirkung der isolierten Tetrahydroxanthenone untersucht. Die zur Gruppe der Phomoxanthone gehörenden Substanzen Phomoxanthon A (**2.1**) und 12-Deacetylphomoxanthon A (**2.4**) sowie die ebenfalls isolierten Sekundärstoffe Dicerandrol B (**2.2**) und C (**2.3**) fielen durch ihre besonders potente zytotoxische und immunmodulatorische Wirkung auf. Zwischen den Substanzen bestehen die strukturellen Unterschiede zum einen in der Position der Biarylachse (Phomoxanthone: 4,4'; Dicerandrole: 2,2') und zum anderen in der Anzahl acetylierter Hydroxygruppen (**2.1** > **2.4** und **2.3** > **2.2**).

Beide Faktoren wirken sich auf die Bioaktivität aus:

Die 4,4'-verknüpften Tetrahydroxanthenone (**2.1**, **2.4**) wiesen in allen Zytotoxizitätsassays deutlich niedrigere EC₅₀-Werte auf, als die korrespondierenden 2,2'-verknüpften Dicerandrole (**2.2**, **2.3**). In analoger Weise spiegelte sich das Verhältnis der Bioaktivitäten von **2.1-2.4** in den Immunoblottingassays an murinen T-Lymphozyten, murinen NK-Zellen sowie Macrophagen wider. Somit kann angenommen werden, dass die 4,4'-Verknüpfung der Tetrahydroxanthanon-Monomere zu einem räumlichen Profil der Substanzen führt, das einen günstigen Einfluss auf die zytotoxische bzw. immunmodulatorische Aktivität an bestimmten Zelllinien besitzt

Die Anzahl an gebundenen Acetylgruppen am Tetrahydroxanthanon-Gerüst hat einen deutlichen Einfluss auf die Lipophilie der jeweiligen Verbindung. Die Lipophilie einer Substanz wird durch ihren Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{OW}) gekennzeichnet. Der LogP-Wert ergibt sich aus dem dekadischen Logarithmus des K_{OW} und ist demnach für lipophile Substanzen größer null und für hydrophile

Verbindungen kleiner null. Die ermittelten LogP-Werte für **2.1** und sein vollständig deacetyliertes Analogon **2.11** betragen 2,230 bzw. 0,125.

Mit steigender Lipophilie steigt, wie durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegt werden konnte, innerhalb der jeweiligen Substanzgruppe die Aktivität. Das vollständig deacetylierte Partialsyntheseprodukt Deacetylphomoxanthon A (**2.11**) weist demnach in allen durchgeführten Assays die geringste Aktivität auf, wohingegen Phomoxanthon A (**2.1**) die potenteste der getesteten Substanzen ist. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Substanzen die Zellmembran passieren müssen, um ihre entsprechende Wirkung entfalten zu können; sie interagieren demnach nicht etwa mit oberflächenständigen Membranbestandteilen.

Dass das Vorhandensein des Tetrahydroxanthanon-Gerüsts essentiell für die ermittelten Bioaktivitäten ist zeigten die Hydrolyseexperimente zur partialsynthetischen Abwandlung des Naturstoffes Phomoxanthon A (**2.1**). Sämtliche Hydrolyseprodukte (**2.9a-2.9c**, **2.10**) erwiesen sich in den Bioassays zur Untersuchung der Zytotoxizität als auch der Immunmodulation als wirkungslos.

7.5 Zytotoxizität und Immunstimulation als dualer Wirkansatz

Zur Behandlung maligner Krebserkrankungen stehen der modernen Medizin Behandlungsmöglichkeiten aus drei Therapiefeldern zur Verfügung: Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie. Diese konventionellen Therapiemöglichkeiten zielen im Rahmen ihrer jeweiligen Wirkprinzipien auf die direkte Abtötung respektive Entfernung des entarteten Zielgewebes ab. Seit Anfang der 1980er Jahre entwickelte sich zudem das Interesse vieler Forschergruppen in Bezug auf die Beteiligung des Immunsystems an Malignomentstehung und -wachstum. 1985 konnten Drebin *et al.* zeigen, dass an sich nicht zytotoxische Antikörper an speziell transformierten Krebszellen binden und diese somit für das Immunsystem markieren und angreifbar machen (Drebin *et al.*, 1985). Heutzutage weiß man, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle in der Krebstherapie spielt. Ist es beispielsweise durch immunsuppressive Einflüsse zusätzlich geschwächt, so kann dies zur Progression einer bestehenden Krebserkrankung führen (Whiteside, 2006). Obwohl die klassischen Chemotherapeutika das klinische Management der meisten Krebsarten dominieren (Zitvogel *et al.*, 2008), erhalten nach und nach auch neuartige Immuntherapieansätze Einzug in den Markt. Unter dem Namen Provenge® brachte das US-amerikanische Pharmaunternehmen Dendreon im Jahre 2010 den weltweit ersten immunologischen „Krebsimpfstoff“ auf den Markt (Bot, 2010). Bei diesem Arzneimittel handelt es sich um körpereigene, dendritische Zellen, die dem Patienten

nach Entnahme und Aufarbeitung mit einem Fusionsprotein wieder infundiert werden und gezielt Prostatakrebszellen angreifen. Krebszellen lassen sich also grundsätzlich durch das körpereigene Immunsystem effektiv bekämpfen, jedoch haben die entarteten Zellen Strategien und Mechanismen entwickelt das menschliche Immunsystem lokal oder systemisch zu schwächen oder es sogar für sich zu nutzen (Whiteside, 2006). Krebszellen können die angeborenen und adaptiven Immunreaktionen durch Selektion nicht-immunogener Tumorzellvarianten oder durch aktive Unterdrückung der Immunantwort auf ihre Oberflächenmerkmale umgehen (Zitvogel *et al.*, 2008).

Es ist bekannt, dass selbst konventionelle Behandlungstherapien wie Strahlentherapie oder bestimmte Chemotherapeutika neben den primären Wirkansätzen auch immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen. So kann es durch Strahlentherapie zu bestimmten genetischen Veränderungen des Zielgewebes kommen, wodurch auf den entarteten Krebszellen Oberflächenproteine exprimiert werden, die eine T-Zell induzierte Immunantwort auslösen (Chakraborty *et al.*, 2004). Neben ihrer zytotoxischen Wirkung stimulieren Anthracycline die Membranexpression bestimmter Proteine auf Tumorzellen, die ihre Phagozytose durch dendritische Zellen einleiten und die Antigenpräsentation an T-Zellen ermöglichen (Apetoh *et al.*, 2007). Die Stimulation und Steuerung des Immunsystems spielt also eine wichtige Rolle bei der Therapie von Krebserkrankungen und ist noch lange nicht abschließend erforscht.

Solche dualen Wirkweisen konnten interessanter Weise auch für die im Rahmen dieser Arbeit isolierten, 4,4'-verknüpften Tetrahydroxanthene **2.1** und **2.4** nachgewiesen werden. Zum einen weisen die getesteten Dimere Apoptose induzierende Eigenschaften an DG75 B- und Jurkat T-Zellen (Lymphoblastom- bzw. Leukämiezellen) auf, und zum anderen fördern sie die Expression des Glykoproteins CD69 in T-Zellen und NK-Zellen sowie des MHC-Klasse-II-Proteinkomplexes in Macrophagen, was eine Aktivierung dieser Immunzellen bedeutet.

8 Literaturverzeichnis

- Adachi K, Takeda Y, Senoh S und Kita H (1964) Metabolism of p-hydroxyphenylacetic acid in *Pseudomonas ovalis*. *Biochim Biophys Acta* 93(3): 483-493.
- Allgeier K (1987) Mit der Bibel heilen : medizinisches Uraltwissen neu entdeckt. Genf. Ariston Verlag.
- Alves M N, Sartoratto A und Trigo J R (2007) Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs, and induced response. *J Chem Ecol* 33(2): 297-309.
- Aly A, Debbab A, Kjer J und Proksch P (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 41(1): 1-16.
- Aly A H, Debbab A und Proksch P (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(6): 1829-1845.
- Amarnath V und Amarnath K (1995) Intermediates in the Paal-Knorr Synthesis of furans. *J Org Chem* 60(2): 301-307.
- Amna T, Puri S C, Verma V, Sharma J P, Khajuria R K, Musarrat J, Spiteller M und Qazi G N (2006) Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Can J Microbiol* 52(3): 189-196.
- Amundsen D W (1996) Medicine, society, and faith in the ancient and medieval worlds. Baltimore. Johns Hopkins University Press.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri M C, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat F J, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G und Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13(9): 1050-1059.
- Arai Y, Nakagawa T, Hitosugi M, Shiojima K, Ageta H, Basher O und Abdel H (1998) Chemical constituents of aquatic fern *Azolla nilotica*. *Phytochemistry* 48(3): 471-474.
- Artelt W (1968) Studien zur Geschichte der Begriffe "Heilmittel" und "Gift" : Urzeit, Homer, Corpus Hippocraticum. Darmstadt. Wissenschaftliche Buchgesellschaft
- Asahina Y und Fujikawa F (1935) Untersuchungen über Flechtenstoffe, LV, Mitteil.: Über Endocrocin, ein neues Oxy-anthrachinon-Derivat. *Ber Dtsch Chem Ges* 68(B): 1558-1565.

- Avent A G, Hanson J R und Truneh A (1992) The biosynthesis of nectriapyrone and vermopyrone. *Phytochemistry* 31(10): 3447-3449.
- Babich H, Sedletcaia A und Kenigsberg B (2002) In vitro cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacol Toxicol* 91(5): 245-253.
- Baltruschat H, Fodor J, Harrach B D, Niemczyk E, Barna B, Gullner G, Janeczko A, Kogel K H, Schafer P, Schwarczinger I, Zuccaro A und Skoczowski A (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol* 180(2): 501-510.
- Barker J L und Frost J W (2001) Microbial synthesis of p-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol Bioeng* 76(4): 376-390.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A und Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12(8): 1679-1719.
- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58(1): 1-26.
- Beytur A, Ciftci O, Aydin M, Cakir O, Timurkaan N und Yilmaz F (2012) Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats. *Andrologia* 44(1): 454-461.
- Bezemer T M, Wagenaar I R, van Dam N M, van der Putten W H und Wackers F L (2004) Above- and below-ground terpenoid aldehyde induction in cotton, *Gossypium herbaceum*, following root and leaf injury. *J Chem Ecol* 30(1): 53-67.
- Bode H B, Bethe B, Hofs R und Zeeck A (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* 3(7): 619-627.
- Borate A R, Suralkar A A, Deshpande A D, Malusare P V und Bangale P A (2012) Hypolipidemic activity of protocatechuic acid in atherogenic diet induced hyperlipidemic rats. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars* 1(1): 29.
- Bot A (2010) The landmark approval of Provenge®, what it means to immunology and "in this issue": the complex relation between vaccines and autoimmunity. *Int Rev Immunol* 29(3): 235-238.
- Breinholt J, Demuth H, Lange L, Kjaer A und Pedersen C (1993) Xanthofusin, an antifungal tetronic acid from *Fusicoccum* sp.: production, isolation and structure. *J Antibiot* 46(6): 1013-1015.
- Bundestag, Fünfundzwanzigste Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften, BT-Drucks. 130/11, Berlin, 2011
- Butler M S (2008) Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Commun* 25(3): 475-516.

- Chakraborty M, Abrams S I, Coleman C N, Camphausen K, Schlom J und Hodge J W (2004) External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res* 64(12): 4328-4337.
- Chanway C P (1996) Endophytes: they're not just fungi! *Can J Bot* 74(3): 321-322.
- Cheatham M L (2008) The Death of George Washington: an end to the controversy? *Am Surg* 74(8): 770-774.
- Chen J-J, Hung H-C, Sung P-J, Chen I-S und Kuo W-L (2011) Aporphine alkaloids and cytotoxic lignans from the roots of *Illigera luzonensis*. *Phytochemistry* 72(6): 523-532.
- Chiang Y M, Szewczyk E, Davidson A D, Entwistle R, Keller N P, Wang C C und Oakley B R (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 76(7): 2067-2074.
- Clay K und Holah J (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285(5434): 1742-1745.
- Cortesi N (1981) Characterization of virgin and refined olive oils by HPLC of polar components: preliminary note. *Riv Ital Sostanze Grasse* 58(3): 108.
- Cragg G M, Grothaus P G und Newman D J, (2012) Natural Products in Drug Discovery: Recent Advances. In: Cechinel-Filho, V. (Ed.), Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp. 1-27.
- Della Greca M, Monaco P und Previtera L (1990) Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J Nat Prod* 53(6): 1430-1435.
- Demain A L und Vaishnav P (2011) Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 4(6): 687-699.
- Dioscurides P (1996) The Greek herbal of Dioscorides. *Materia medica*. New York. Classics of Medicine Library
- Drebin J A, Link V C, Stern D F, Weinberg R A und Greene M I (1985) Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41(3): 697-706.
- El-Seedi H R, El-Barbary M A, El-Ghorab D M, Bohlin L, Borg-Karlson A K, Goransson U und Verpoorte R (2010) Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. *Curr Med Chem* 17(9): 854-901.
- Ellestad G A, McGahren W J und Kunstmann M P (1972) Structure of a new fungal lactone, LL-P880 α , from an unidentified *Penicillium* sp. *J Org Chem* 37(12): 2045-2047.

- Endo A, Kuroda M und Tsujita Y (1976) ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 29(12): 1346-1348.
- Eyberger A L, Dondapati R und Porter J R (2006) Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J Nat Prod* 69(8): 1121-1124.
- Feng T, Su J, Ding Z-H, Zheng Y-T, Li Y, Leng Y und Liu J-K (2011) Chemical Constituents and Their Bioactivities of "Tongling White Ginger" (*Zingiber officinale*). *J Agric Food Chem* 59(21): 11690-11695.
- Firn R D und Jones C G (2003) Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Nat Prod Rep* 20(4): 382-391.
- Fleming A (1929) The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10(1): 226-236.
- Fries L (1977) Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenylacetic acid on *Fucus spiralis* L. (Phaeophyceae, Fucales) in axenic culture. *Phycologia* 16(4): 451-455.
- Fusetani N (2004) Biofouling and antifouling. *Nat Prod Rep* 21(1): 94-104.
- Gerwick W H und Moore B S (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol* 19(1): 85-98.
- Gray A I, Igoli J O und Edrada-Ebel R, (2012) Natural Products Isolation in Modern Drug Discovery Programs. In: Sarker, S.D., Nahar, L. (Eds.), Natural Products Isolation. Springer, New York [u.a.], pp. 515-534.
- Gressler M, Zaehle C, Scherlach K, Hertweck C und Brock M (2011) Multifactorial Induction of an Orphan PKS-NRPS Gene Cluster in *Aspergillus terreus*. *Chem Biol* 18(2): 198-209.
- Hänsel R und Sticher O (2007) Pharmakognosie - Phytopharmazie. Heidelberg. Springer Verlag.
- Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.
- Heil M und Bostock R M (2002) Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany* 89(5): 503-512.
- Helmstädter A (2011) Leitfaden der Pharmaziegeschichte. Eschborn. Govi.
- Huang Y-T, Chang H-S, Wang G-J, Cheng M-J, Chen C-H, Yang Y-J und Chen I-S (2011) Anti-inflammatory endiandric acid analogues from the roots of *Beilschmiedia tsangii*. *J Nat Prod* 74(9): 1875-1880.

- Hyde K D und Lee S Y (1995) Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling: what gaps occur in our knowledge? *Hydrobiologia* 295(1): 107-118.
- Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, Danwisetkanjana K, Tanticharoen M und Thebtaranonth Y (2001) Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J Nat Prod* 64(8): 1015-1018.
- Katsui N, Matsue H, Hirata T und Masamune T (1972) Phytosterols and triterpenes in the roots of the "kidney bean" (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bull Chem Soc Jpn* 45(1): 223-226.
- Kawahara N, Sekita S, Satake M, Udagawa S und Kawai K (1994) Structures of a New Dihydroxanthone Derivative, Nidulalin A, and a New Benzophenone Derivative, Nidulalin B, from *Emericella nidulans*. *Chem Pharm Bull* 42(9): 1720-1723.
- Kayano S, Kikuzaki H, Fukutsuka N, Mitani T und Nakatani N (2002) Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J Agric Food Chem* 50(13): 3708-3712.
- Keightley D N (1978) Sources of Shang history : The Oracle-bone Inscriptions of Bronze Age China. Berkeley. University of California Press.
- Kimura Y, Katagiri K, Inoue T und Tamura S (1971) Isolation and biological activity of pestalotin, a gibberellin synergist from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. *Agric Biol Chem* 35(8): 1313-1314.
- Kjer J (2009) New natural products from endophytic fungi from Mangrove plants : structure elucidation and biological screening. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Knight V, Sanglier J J, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, Hughes D und Zhang L (2003) Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(5-6): 446-458.
- Krick A, Kehraus S, Gerhauser C, Klimo K, Nieger M, Maier A, Fiebig H H, Atodiresei I, Raabe G, Fleischhauer J und König G M (2007) Potential cancer chemopreventive in vitro activities of monomeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. *J Nat Prod* 70(3): 353-360.
- Kurobane I, Iwahashi S und Fukuda A (1987) Cytostatic activity of naturally isolated isomers of secalonic acids and their chemically rearranged dimers. *Drugs Exp Clin Res* 13(6): 339-344.
- Kurobane I, Vining L C, McInnes A G, Walter J A und Wright J L C (1978) Biosynthesis of secalonic acid A. The pathway indicated by a ¹³C nuclear magnetic resonance study of acetate incorporation. *Tetrahedron Lett* 19(16): 1379-1382.
- Kusari S, Lamshöft M und Spiteller M (2009) *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of

- the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J Appl Microbiol* 107(3): 1019-1030.
- Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S und Spiteller M (2008) An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J Nat Prod* 71(2): 159-162.
- Lafont O (2007) Du saule à l'aspirine. *Rev Hist Pharm* 55(354): 209-216.
- Lee J C, Yang X, Schwartz M, Strobel G und Clardy J (1995) The relationship between an endangered north american tree and an endophytic fungus. *Chem Biol* 2(11): 721-727.
- Lees N D, Skaggs B, Kirsch D R und Bard M (1995) Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* - a review. *Lipids* 30(3): 221-226.
- Lesch B und Bräse S (2004) A Short, Atom-Economical Entry to Tetrahydroxanthenones. *Angew Chem Int Ed* 43(1): 115-118.
- Leu Y-L, Lin C-L und Kuo P-C (2011) Constituents from *Senecio scandens* and their antioxidant bioactivity. *Arch Pharm Res* 34(3): 377-382.
- Leven K-H (2008) Geschichte der Medizin : von der Antike bis zur Gegenwart. München. Beck.
- Li P, Wang X Q, Wang H Z und Wu Y N (1993) High performance liquid chromatographic determination of phenolic acids in fruits and vegetables. *Biomed Environ Sci* 6(4): 389-398.
- Li Y, Yu L, Gong W, Qian M, Huang S und Chen X (2012) China Patentnummer CN 102653725
- Libbert E (1993) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie : mit 14 Tabellen. Jena. Gustav Fischer Verlag.
- Lichter W, Wellham L L, Van der Werf B A, Middlebrook R E, Sigel M M und Weinheimer A J (1972) Biological Activities Exerted by Extracts of *Ecteina scidia turbinata*. In: Worthen, L.R. (Ed.), *Food-drugs from the Sea. Proceedings*. Kingston, Rhode Island. Marine Technology Society, Washington, D.C., pp. 117-127.
- Liu C-Y, Chen Y-W, Cheng M-J, Lee S-J, Abd El-Razek M H, Chang W-H, Chen Y-J und Chen I-S (2008) Cytotoxic constituents from the root wood of formosan *Michelia compressa*. *J Chil Chem Soc* 53(2): 1523-1524.
- Lösgen S, Schlörke O, Meindl K, Herbst-Irmer R und Zeeck A (2007) Structure and Biosynthesis of Chaetocyclinones, New Polyketides Produced by an Endosymbiotic Fungus. *Eur J Org Chem* 2007(13): 2191-2196.
- Lu P, Zhang A, Dennis L M, Dahl-Roshak A M, Xia Y Q, Arison B, An Z und Tkacz J S (2005) A gene (pks2) encoding a putative 6-methylsalicylic acid synthase from *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics* 273(2): 207-216.

- Ludewig R (2006) Wolfgang Amadeus Mozart (1756–1791): Genaue Todesursache bleibt unerkannt. *Dtsch Arztebl Int* 103(4): 172-176.
- Mann J (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2(2): 143-148.
- Marak H, Biere A und Van Damme J M M (2002) Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (Rob.) Niessel. *J Chem Ecol* 28(12): 2429-2448.
- Markert A, Steffan N, Ploss K, Hellwig S, Steiner U, Drewke C, Li S M, Boland W und Leistner E (2008) Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a clavicipitalean fungus. *Plant Physiol* 147(1): 296-305.
- Masters K-S und Bräse S (2012) Xanthonen from Fungi, Lichens, and Bacteria: The Natural Products and Their Synthesis. *Chem Rev* 112(7): 3717-3776.
- Matsumori N, Kaneno D, Murata M, Nakamura H und Tachibana K (1999) Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products. *J Org Chem* 64(3): 866-876.
- McGahren W J, Ellestad G A, Morton G O, Kunstmann M P und Mullen P (1973) A new fungal lactone, LL-P880 β , and a new pyrone, LL-P880 γ , from a *Penicillium* sp. *J Org Chem* 38(20): 3542-3544.
- McGlacken G P und Fairlamb I J S (2005) 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity. *Nat Prod Rep* 22(3): 369-385.
- Mendes L W, Taketani R G, Navarrete A A und Tsai S M (2012) Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Res Microbiol* 163(5): 366-377.
- Mishra B B und Tiwari V K (2011) Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem* 46(10): 4769-4807.
- Mraja A, Unsicker S B, Reichelt M, Gershenzon J und Roscher C (2011) Plant community diversity influences allocation to direct chemical defence in *Plantago lanceolata*. *PLoS ONE* 6(12): e28055.
- Nair M S R und Carey S T (1975) Metabolites of pyrenomycetes. II. Nectriapyrone, an antibiotic monoterpene. *Tetrahedron Lett* 19(20): 1655-1658.
- Nakamura Y, Torikai K, Ohto Y, Murakami A, Tanaka T und Ohigashi H (2000) A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis* 21(10): 1899-1907.

- Newman D J und Cragg G M (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70(3): 461-477.
- Newman D J und Cragg G M (2009) Microbial antitumor drugs: natural products of microbial origin as anticancer agents. *Curr Opin Investig Drugs* 10(12): 1280-1296.
- Newman D J und Cragg G M (2009) Natural product scaffolds as leads to drugs. *Future Med Chem* 1(8): 1415-1427.
- Nuhn P (2006) Naturstoffchemie : mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe ; mit 80 Tabellen. Stuttgart. Hirzel Verlag.
- Oh D C, Kauffman C A, Jensen P R und Fenical W (2007) Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *J Nat Prod* 70(4): 515-520.
- Olivera B M (1997) E.E. Just Lecture, 1996: *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8(11): 2101-2109.
- Patterson E L, Vanmeter J C und Bohonos N (1964) Isolation of Cephalosporin C. *J Med Chem* 7(1): 689.
- Paul V J, Ritson-Williams R und Sharp K (2011) Marine chemical ecology in benthic environments. *Nat Prod Rep* 28(2): 345-387.
- Pean E, Klaar S, Berglund E G, Salmonson T, Borregaard J, Hofland K F, Ersboll J, Abadie E, Giuliani R und Pignatti F (2012) The european medicines agency review of eribulin for the treatment of patients with locally advanced or metastatic breast cancer: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. *Clin Cancer Res* 18(17): 4491-4497.
- Pettit R K (2009) Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 83(1): 19-25.
- Piel J (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 26(3): 338-362.
- Porrás-Alfaro A und Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291-315.
- Power F B und Browning H (1912) CCLII.-The constituents of *taraxacum* root. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1012:411-2429.
- Putz A und Proksch P, (2009) Chemical Defence in Marine Ecosystems. In: Wink, M. (Ed.), Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, 3 ed. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 162-213.
- Ravindran C, Naveenan T, Varatharajan Govindaswamy R, Rajasabapathy R und Meena Ram M, (2012) Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. *Botanica Marina*, p. 269.

- Rawlings B J (1999) Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat Prod Rep* 16(4): 425-484.
- Reichling J, (2009) Plant-Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. In: Wink, M. (Ed.), Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, 3 ed. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 214-347.
- Rinehart K L (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med Res Rev* 20(1): 1-27.
- Sakagami H, Kawase M, Wakabayashi H und Kurihara T (2007) Factors that affect the type of cell death induced by chemicals. *Autophagy* 3(5): 493-495.
- San Feliciano A, Castro M A, Lopez-Perez J L und del Olmo E, (2012) The Importance of structural manipulation of natural compounds in drug discovery and development. In: Cechinel-Filho, V. (Ed.), Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp. 127-153.
- Sang S, Lapsley K, Jeong W S, Lachance P A, Ho C T und Rosen R T (2002) Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem* 50(8): 2459-2463.
- Schlee D (1982) Zur ökologischen Bedeutung sekundärer Naturstoffe - Beispiel: Alkaloide. *Biol Rdsch* 2017-32.
- Schlegel H G (1999) Geschichte der Mikrobiologie. Halle (Saale). Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina.
- Schneider G (2011) Arzneidroge.
- Schneider I, Kressel G, Meyer A, Krings U, Berger R G und Hahn A (2011) Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *J Funct Foods* 3(1): 17-24.
- Shwab E K und Keller N P (2008) Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol Res* 112(2): 225-230.
- Solinas M (1982) Determination of olive oil phenolic compounds by GLC and HPLC: hypothetical role of tyrosol in determining virgin olive oil in mixtures with refined oils. *Riv Soc Ital Sci Aliment* 11(4): 223.
- Sowemimo A A, Edrada-Ebel R, Ebel R, Proksch P, Omobuwajo O R und Adesanya S A (2008) Major constituents of the predominant endophytic fungi from the Nigerian plants *Bryophyllum pinnatum*, *Morinda lucida* and *Jathropa gossypifolia*. *Nat Prod Commun* 3(9): 1217-1222.
- Sparnins V L, Anderson J J, Omans J und Dagley S (1978) Degradation of 4-hydroxyphenylacetic acid by *Trichosporon cutaneum*. *J Bacteriol* 136(1): 449-451.

- Sparnins V L, Chapman P J und Dagley S (1974) Bacterial degradation of 4-hydroxyphenylacetic acid and homoprotocatechuic acid. *J Bacteriol* 120(1): 159-167.
- Spiegl D A (2008) Synthese enantiomerenreiner Tetrahydroxanthenone unter Verwendung Palladium-katalysierter Domino-Reaktionen. *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen
- Stewart M, Capon R J, White J M, Lacey E, Tennant S, Gill J H und Shaddock M P (2004) Rugulotrosins A and B: Two new antibacterial metabolites from an australian isolate of a *Penicillium* sp. *J Nat Prod* 67(4): 728-730.
- Steyn P S (1992) The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins. *Pure Appl Chem* 52(1): 189-204.
- Stoll U (1992) Das 'Lorscher Arzneibuch' : ein medizinisches Kompendium des 8. Jahrhunderts ; Text, Übersetzung und Fachglossar. Stuttgart. Franz Steiner Verlag.
- Stone J K, Bacon C W und White J F, (2000) An Overview of endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: Bacon, C.W., White, J.F. (Eds.), *Microbial Endophytes*. M. Dekker, New York, pp. 3-29.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U und Harper J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 67(2): 257-268.
- Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu R S und Hess W M (1996) Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142(2): 435-440.
- Tanaka T, Tanaka T und Tanaka M (2011) Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid. *J Exp Clin Med* 3(1): 27-33.
- Taylor T N und Taylor E L, (2000) The Rhynie Chert Ecosystem: A Model for Understanding Fungal Interactions. In: Bacon, C.W., White, J.F. (Eds.), *Microbial Endophytes*. M. Dekker, New York, pp. 31-47.
- Thaler J S, Humphrey P T und Whiteman N K (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17(5): 260-270.
- Tomlinson P (1986) The botany of mangroves. Cambridge [u.a.]. Cambridge University Press.
- Turner W B (1978) The isolation and structures of the fungal metabolites lapidosin and diversonol. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*(12): 1621-1621.
- Ueda J, Saito N, Shimazu Y und Ozawa T (1996) A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 333(2): 377-384.

- Venkatasubbaiah P und Van Dyke C G (1991) Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis oenotherae*, a pathogen of evening primrose. *Phytochemistry* 30(5): 1471-1474.
- Waser M, Lackner B, Zuschraeder J, Müller N und Falk H (2005) An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin. *Tetrahedron Lett* 46(14): 2377-2380.
- Whiteside T L (2006) Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16(1): 3-15.
- Williams R B, Henrikson J C, Hoover A R, Lee A E und Cichewicz R H (2008) Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem* 6(11): 1895-1897.
- Wolters B (1999) Die ältesten Arzneipflanzen : Phytotherapie der Altsteinzeit. *Dtsch Apoth Ztg* 139(39): 3675-3682.
- Wu X-y, Li M-l, Hu G-p, Lin Y-c und Vrijmoed L L P (2002) Metabolites of the endophyte fungus No. 2508 in the mangrove tree from the South China seacoast. *Journal of Zhongshan University* 41(3): 34.
- Xu J (2011) Biomolecules produced by mangrove-associated microbes. *Curr Med Chem* 18(34): 5224-5266.
- Xu J, Aly A H, Wray V und Proksch P (2011) Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Lett* 52(1): 21-25.
- Xue Y und Sherman D H (2000) Alternative modular polyketide synthase expression controls macrolactone structure. *Nature* 403(6769): 571-575.
- Yang R, Yang X, Feng L und Zeng Q (2010) Crosstalk between terpenoid biosynthetic pathways in *Artemisia annua*. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine* 27(5): 535-543.
- Zhang W, Krohn K, Zia U, Flörke U, Pescitelli G, Di Bari L, Antus S, Kurtán T, Rheinheimer J, Draeger S und Schulz B (2008) New mono- and dimeric members of the secalonic acid family: Blennolides A–G isolated from the fungus *Blennoria* sp. *Chem Eur J* 14(16): 4913-4923.
- Zhu F, Chen G, Chen X, Huang M und Wan X (2011) Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chemistry of Natural Compounds* 47(5): 767-769.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Andre F, Tesniere A und Kroemer G (2008) The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 118(6): 1991-2001.

9 Wissenschaftliche Leistung

9.1 Publikationen

Rönsberg D, Debbab A, Mándi A, Wray V, Dai H, Kurtán T, Proksch P und Aly A H (2013) Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters* 54(25): 3256-3259.

Rönsberg D, Debbab A, Mándi A, Vasylyeva V, Böhler P, Stork B, Engelke L, Hamacher A, Sawadogo R, Diederich M, Wray V, Lin WH, Kassack M, Janiak C, Scheu S, Wesselborg S, Kurtán T, Aly AH, Proksch P (2013). Pro-apoptotic and immunostimulatory tetrahydroxanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla*. *Journal of Medicinal Chemistry*. *Submitted*

Rönsberg D, Aly, A H, [...], Proksch, P (2013). New secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis longicolla*. *Intended to be submitted*

9.2 Poster

Rönsberg D, Wray V, Lin WH, Proksch P, Aly AH (2012) New Secondary Metabolites from the Mangrove-Derived Fungus *Pestalotiopsis virgatula* Isolated from *Sonneratia caseolaris*. 3. Young Researcher Meeting “Phytotherapeutika in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen”, 02. und 03. März 2012, Universität Münster

10 Abkürzungen

Tabelle 10.I: Liste der verwendeten Abkürzungen.

Abb.	Abbildung
b	Breites NMR-Signal
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform
CHCl ₃	Chloroform
CD ₂ Cl ₂	Deuteriertes Dichlormethan
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
cm	Zentimeter
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> 6	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ED ₅₀	Mittlere effektive Dosis
EI	Electron Impact Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
h	Stunde
HR	High Resolution
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
HMBC	Hetero Multinuclear Bond Coherence
HMQC	Hetero Multinuclear Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure

IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration (bei halbmaximaler Wirkung)
L	Liter
<i>m</i>	Multiplett
M	Molar (mol/L)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
<i>m/z</i>	Masse pro Ladung
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NS	Naturstoff
mL	Milliliter
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OR	Optical Rotation
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoffionen-Exponent
ppm	Parts per Million
<i>q</i>	Quartett
q.s.	Quantum satis (so viel als nötig)
ROESY	Rotating-Frame Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
<i>s</i>	Singulett
SAR	Structure Activity Relationship (dt.: Struktur-Aktivitätsbeziehung)
sp.	Species (Art)
<i>t</i>	Triplett
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
VLC	Vakuum-Flüssigchromatographie
v/v	Volumenkonzentration
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (mmol/L)

11 Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe und Anerkennung vieler Kollegen, Freunde und meiner Familie möglich gewesen. Ich möchte daher diese Seiten nutzen, um mich bei allen diesen Unterstützern zu bedanken:

- Prof. Dr. P. Proksch, für das Überlassen dieses Themas.
- Prof. Dr. Matthias Kassack für die Übernahme des Korreferats, sowie seinen Mitarbeiterinnen Dr. Alexandra Hamacher, Laura Engelke und Kathrin Christoph für die praktische Durchführung der zahlreichen „Zytotox-Messungen“.
- Prof. Dr. Claus Passreiter, für die Antriebskraft und den organisatorischen Überblick bei der Revitalisierung der einwöchigen Botanikexkursion. Es hat mir viel Freude bereitet diese großartige Veranstaltung mit Herrn Prof. Dr. Passreiter wieder auf die Beine stellen zu dürfen. Des Weiteren ein großes Dankeschön für die vielen aufbauenden und abwechslungsreichen Gespräche und fachlichen Diskussionen.
- Dr. Amal Hassan, die viele Stunden damit verbracht hat mit mir über meine Spektraldaten und Strukturen zu diskutieren. Besonders möchte ich Amal auch für die Hilfe bei der Erarbeitung und das anschließende Korrekturlesen der Manuskripte danken, ohne die diese Dissertationsarbeit so nicht hätte entstehen können.
- Dr. Bartosz Lipowicz und Achim Braukmann, für die Hilfe bei Problemen jeder Art und die Ratschläge und anregenden Diskussionen. Die Zeit mit Euch an der Uni – immerhin fast 10 Jahre – ist (rückblickend) eine tolle Zeit gewesen! Ich bin froh Euch als Freunde gewonnen zu haben!
- Herrn Krankenhausapothekenleiterstellvertreter Tim Heller, dessen Organisationstalent ich nur bewundern kann und dem ich viel privaten und sportlichen Ausgleich zu verdanken habe.
- Dr. Julia Kjer, Wera Döring, Dr. Weaam Ebrahim und Dr. Sherif Elsayed für die warmherzige Aufnahme ins Institut, die vielen Tipps und netten Gespräche.
- Dr. Jandirk Sendker, der mir den Einstieg in die Lehrveranstaltungen „Pharmazeutische Biologie III“ und „Arzneipflanzenexkursionen und Bestimmungsübungen“ erleichtert hat und auch neben der Studentenbetreuung stets für fachliche Fragen ansprechbar war. Des Weiteren

verdanke ich Herrn Sendker den größten Teil meines praktischen Wissens zur Instandhaltung und -setzung analytischer sowie präparativer HPLC-Anlagen.

- Meinem Kollegen Andreas Marmann für die gemeinsam durchgeführte Weiterentwicklung des Praktikums „Pharmazeutische Biologie III“ und die Unterstützung bei der Einführung des „neuen“ Efeu-HPLC-Versuches in dem von mir betreuten Praktikumsblock.
- Meinen lieben WPP-Guppen: Valeska Keller und Anja Schlages (WS 09/10), Sibel Ferah, geb. Gürsoy und Gülcin Uyar (SS 10), Nergiz Cinar und Aysegül Peltek (WS 10/11) sowie Caudia Bonna und Nadine Engelskirchen (SS 11); mit denen die Laborarbeit gleich dreimal so Spaß und produktiv von der Hand ging.
- Ich danke meinen Kollegen Mi-Young Chung, Georgios Daletos, Kirsten Famulla, Imke Form, Lena Hammerschmidt, Ingo Kolb, Arta Kuci, Clemens Lux, Antonius Ola, Robert Bara, Catalina Pérez Hemphill, Dhana Thomy und allen, die ich im Eifer des Gefechts vergessen habe, für eine gute Zusammenarbeit, für das Teilen der Sorgen und Ängste, für die Hilfsbereitschaft und für die vielen schönen gemeinsamen Stunden bei diversen Freizeitaktivitäten, v.a. die kicker.de-Runde, initiiert von Herrn Apotheker Hendrik Niemann. Im Besonderen auch den TA Katja Friedrich, Heike Goldbach-Gecke, Dieter Jansen, Simone Miljanovic, Waltraud Schlag und Eva Müller sowie „unserer“ Sekretärin Claudia Eckelskemper für ihre stets fröhliche und hilfsbereite Art.
- Fortuna
- Herrn Robin Visse für die freundliche Hilfestellung bei CD-spektroskopischen Messungen in den Räumlichkeiten des „AK Braun“.
- Herrn Peter Behm, Frau Andrea Berger, Frau Maria Beuer, Herrn Philip Böhler, Herrn Ralf Bürgel, Frau Christel Kakoschke, Frau Sonja Kropp, Herrn Dr. Tibor Kurtán, Herrn Dr. Alexander Pretsch (und Mitarbeitern), Frau Renate Steffen, Herrn Dr. Björn Storck und Herrn Dr. Peter Tommes für die sorgfältig durchgeführten Messungen, die unkomplizierte Ansprechbarkeit, die gute Kooperation und das Erfüllen von „Sonderwünschen“.
- Den Diplom-Biologen Lutz Kettler und Julius Orłowski die mir mit so manchem, an der ULB Düsseldorf nicht verfügbaren Paper schnell aushelfen, und damit meinen Wissensdurst vorübergehend stillen konnten.
- Meinem Laborpartner Cong-Dat Pham für jedes freundliche „Guten Morgen“ (Falsett) und besonders für die freundschaftliche Atmosphäre, sowie für die schöne gemeinsame Zeit im Labor. So viel Unvergessbares!

- Frau Dipl. Biol. Catherine Schumacher für die vielen Gespräche und Unternehmungen in und vor allem auch außerhalb der Uni! Gerade gegen Ende meiner Laborarbeit taten Deine Besuche sehr gut!
- Herrn M.Sc. Dominik Schumacher für die große und vor allem großartige Hilfe und spätabendliche, fernmündliche Beratung in Sachen Reaktionsmechanismen.
- Meinen Eltern – Dominique und Karl-Ludwig Rösberg - und meinem Bruder Patrick sowie seiner Ehefrau Annalena für das große Interesse an dem was ich vier Jahre lang mit den Pflanzen und Schimmelpilzen fabriziert habe und für alles, was sie in den letzten drei Jahrzehnten für mich getan haben.
- Dr. Stephanie Schumacher für das stets offene Ohr, für viel Verständnis, für viel Nachsicht und für die immerwährende moralische Unterstützung. Durch Dich habe ich immer die notwendige Motivation gefunden. Ich liebe Dich!

12 Erklärung

Die vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die meisten der für die Anfertigung dieser Arbeit erforderlichen Methoden wurden vom Autor selbständig durchgeführt. Folgende Methoden wurden in anderen Institutionen durchgeführt:

Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie (EI-MS): Die Messungen wurden durch Herrn Dr. Peter Tommes und Herrn Ralf Bürgel am Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan TSQ 7000 durchgeführt.

HR-ESI-Massenspektrometrie: Die Messungen wurden durch Frau Andrea Berger am Institut für Biophysikalische Analytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig an einem Micromass Qtof2 Massenspektrometer durchgeführt.

NMR-Spektroskopie (^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY): Die Messungen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Bruker DRX-500) durch Herrn Peter Behm und am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie (Bruker Avance III 600) durch Frau Maria Beuer sowie am Institut für Biophysikalische Analytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig (Bruker AM-300, ARX-400 und DMX-600) durch Frau Christel Kakoschke durchgeführt.

CD-Spektroskopie: Die Messungen wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter durch Herrn Dr. Tibor Kurtán am Department of Organic Chemistry der Universität Debrecen in Ungarn durchgeführt.

Zytotoxizität: Die Untersuchungen auf zytotoxische Aktivität an cisplatin-sensitiven sowie cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom- (A2780), Ösophaguskarzinom- (KYSE510) sowie oralen Spinaliom-Zellen (CAL27) wurden durch Mitarbeiter des AK Kassack am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Untersuchungen auf zytotoxische Aktivität an Maus-Lymphom-Zellen (L5178Y) wurden durch Frau Renate Steffen am Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Messungen zur Zytotoxizität an menschlichen Leukämie- und Lymphoblastom-Zelllinien (DG75, Jurkat) wurden am Institut für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Herrn Dr. Björn Stork und Herrn Philip Böhler durchgeführt.

Antimikrobielle Aktivität: Die Untersuchung auf antimikrobielle Aktivität wurde von Mitarbeitern von Herrn Dr. A. Pretsch in den Laboratorien der Sealife Pharma GmbH in Tulln, Österreich durchgeführt.

Immunmodulatorische Aktivität: Die Untersuchungen wurden von der AG Scheu am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Kristallstrukturanalyse: Die Untersuchungen wurden vom AK Janiak am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Genehmigungen zur Veröffentlichung der Publikationen im Rahmen dieser Dissertation wurden von den entsprechenden Verlagen eingeholt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 31.05.2013

(David Rönsberg)