

# **Bioaktive Sekundärmetabolite aus endophytischen Pilzen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Andreas Marmann**

aus Haan

Hilden, März 2014

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: 5.5.2014

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
**„Bioaktive Sekundärmetabolite aus endophytischen Pilzen“**  
selbst angefertigt habe. Außer den angegebenen Quellen und  
Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch  
in abgewandelter Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Düsseldorf, den 17.3.2014

Andreas Marmann

## Zusammenfassung

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen sind in den letzten Jahrzehnten insbesondere endophytische Pilze in den Mittelpunkt der Betrachtung gerückt. Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass endophytische Pilze eine Quelle von chemisch diversen Naturstoffen sind, welche über ein breites Wirkungspotential verfügen. Insbesondere Stämme endophytischer Pilze, welche extremen Habitaten entspringen, wie beispielsweise Wüstenregionen oder Mangrovenwäldern, scheinen besonders vielversprechend zu sein. Der ökologische Druck, sich an diese Nischen im Wettbewerb mit anderen Organismen anzupassen, wird hierfür als entscheidender Grund angesehen.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Sekundärmetaboliten aus endophytischen Pilzen, welche aus terrestrischen Pflanzen extremer Habitate stammten. Die isolierten Substanzen wurden strukturell aufgeklärt und systematisch auf ihr biologisches Potential hin untersucht. Insgesamt wurden fünf endophytische Pilze als Quelle ausgewählt: *Rhizoctonia* sp., *Pleospora* sp., *Penicillium glabrum*, *Fusarium lateritium* und *Nigrospora sphaerica*. Diese Pilze wurden aufgrund ihrer positiven Ergebnisse in vorausgehenden Bioassays ausgewählt. Das pflanzliche Ursprungsmaterial wurde im Falle von *Rhizoctonia* sp. in Usbekistan, von *Pleospora* sp. sowie *Penicillium glabrum* in Marokko und im Falle der letzten zwei in China gesammelt. Die Pilzkulturen wurden auf festem Reismedium für die Dauer von ca. vier Wochen stehend kultiviert und nach ihrer Extraktion mit organischem Lösungsmittel einer Auftrennung mittels unterschiedlicher chromatographischer Verfahren unterzogen.

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels moderner instrumenteller Analytik, wie z.B. Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (NMR). Zudem wurden die Substanz mittels HPLC-DAD charakterisiert und optisch aktive Substanzen mittels Polarimetrie untersucht. Alle isolierten Substanzen wurden in zytotoxischen und antimikrobiellen Assays untersucht.

### 1. *Rhizoctonia* sp.

Der Pilz *Rhizoctonia* sp. wurde aus den Wurzeln von *Mentha asiatica* (Lamiaceae) isoliert. Die Pflanze wurde im Stadtgebiet von Taschkent, Usbekistan gesammelt. Insgesamt wurden zehn Substanzen isoliert, welche zu den Stoffklassen der Indolderivate und Benzoessäurederivate gehören. Von den isolierten Verbindungen zeigten die Phenyllessigsäure und das Protocatechualdehyd einen leichten antibiotischen Effekt gegenüber *S. aureus* mit einem MIC von 32 µg/mL.

### 2. *Pleospora* sp.

Der Endophyt *Pleospora* sp. wurde aus den Blättern von *Thymelaea lythroides* (Thymelaeaceae) isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde am Stadtrand von Rabat, Marokko gesammelt. Insgesamt wurden 28 Substanzen aus diesem Pilz isoliert, welche hauptsächlich der Klasse der Anthrachinone zuzuordnen waren. Neben diesen konnte

auch eine Vielzahl von Pyron-, Coumarin-, Isocoumarin- und Naphthalenonderivaten beobachtet werden. In den biologischen Untersuchungen zeigten vor allem die Anthrachinonderivate Altersolanol A und Altersolanol C signifikante Wirkungen, sowohl gegen diverse Krebszelllinien, als auch gegen grampositive Problemkeime wie MRSA. Um eine Strukturwirkungsbeziehung herzustellen, wurden die Derivate Altersolanol A und C zusätzlich semisynthetisch modifiziert.

### 3. *Penicillium glabrum*

Der Pilz *Penicillium glabrum* wurde aus *Carpobrotus rossii* (Aizoaceae) isoliert. Die Pflanze wurde im botanischen Garten von Rabat, Marokko gesammelt. Insgesamt wurden sechs Verbindungen isoliert, welche den Stoffklassen der Anthrachinone, Benzoesäurederivate und Pyrone zugeordnet werden konnten. In den Bioassaysystemen zeigt insbesondere das Sulochrin einen signifikanten Effekt auf die murine Lymphomzelllinie L5178Y.

### 4. *Nigrospora sphaerica*

*Nigrospora sphaerica* ist ein Isolat aus *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* (Rhizophoraceae), welche wie auch *Sonneratia apetala* in Hainan, China, gesammelt wurde. Insgesamt konnten aus diesem Pilz vier Verbindungen isoliert werden, welche alle der Stoffklasse der Benzofurane entstammen. Insbesondere das isolierte Griesofulvin zeigte stark zytotoxische Effekte gegen die murine Lymphomzelllinie L5178Y.

### 5. *Fusarium lateritium*

Der Pilzstamm *Fusarium lateritium* konnte, wie auch *Nigrospora sphaerica*, aus *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* (Rhizophoraceae), ebenfalls in Hainan gesammelt, isoliert werden. Aus diesem Pilz konnten insgesamt zwei Verbindungen isoliert werden, welche zu den Isocoumarin- und Anthrachinonderivaten gehören. Das isolierte Acylmacrosporin zeigte einen selektiven antibiotischen Effekt gegenüber *S. aureus* mit einer MHK von 32 µg/mL.

## Summary

In the ongoing search for new drugs, especially endophytic fungi move to center of focus in the last decades. It has been demonstrated that endophytic fungi can form a variety of chemically diverse secondary metabolites, which have a broad pharmacologic potential. In particular, strains of endophytic fungi living in extreme habitats, such as desert regions or mangrove forests appear to be a promising source. The ecological pressure to conform in these niches, in a competition with other organisms, is considered to be a crucial reason for this.

The aim of this work was the isolation of secondary metabolites from plant derived endophytic fungi. The isolated compounds were structurally elucidated and systematically investigated for their biological potential. A total of five endophytes were selected as the source: *Rhizoctonia* sp., *Pleospora* sp., *Penicillium glabrum*, *Fusarium lateritium* and *Nigrospora sphaerica*. These fungi were chosen based on their positive results in preliminary bioassays. In the case of *Rhizoctonia* sp. the plant material was collected in Uzbekistan, in the case of *Pleospora* sp. and *Penicillium glabrum* in Morocco and in the case of the last two, in China. The fungal cultures were fermented static on solid rice medium for about four weeks, extracted with organic solvents and the extracts subjected to chromatographic separation methods.

The structure elucidation was carried out by modern analytical methods, such as mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). In addition, the substances were characterized by HPLC -DAD and optically active substances were evaluated by polarimetry. All isolated compounds were systematically examined in cytotoxic and antimicrobial assays.

### 1. *Rhizoctonia* sp.

The fungus *Rhizoctonia* sp. was isolated from the roots of *Mentha asiatica* (Lamiaceae). The plant was collected in the urban area of Tashkent, Uzbekistan. Ten compounds were isolated, which belong to the classes of indole and benzoic acid derivatives. From the isolated compounds, phenylacetic acid and protocatechualdehyde showed a slight antimicrobial effect against *S. aureus* with a MIC of 32 ug/mL.

### 2. *Pleospora* sp.

The endophyte *Pleospora* sp. was isolated from the leaves of *Thymelaea lythroides* (Thymelaeaceae). The plant material was collected on the outskirts of Rabat, Morocco. A total of 28 substances were isolated from this fungus, which mainly consisted of anthraquinones. In addition, pyrone, coumarin, isocoumarin and naphthalenone derivatives were observed. In the biological studies especially the anthraquinones altersolanol A and C showed significant effects, both against various cancer cell lines, as well as against

gram-positive bacteria like MRSA. For an evaluation of structure-activity relationships, altersolanol A and C were modified semisynthetically.

3. *Penicillium glabrum*

The fungus *Penicillium glabrum* was isolated from *Carpobrotus rossii* (Aizoaceae). The plant was collected in the botanical garden of Rabat, Morocco. A total of six compounds were isolated which were assigned to the classes of anthraquinones, benzoic acid derivatives and pyrones. In particular, sulochrin showed a significant effect on the murine lymphoma cell line L5178Y.

4. *Nigrospora sphaerica*

*Nigrospora sphaerica* is an isolate from *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* (Rhizophoraceae), which was collected in Hainan, China. Overall four compounds were isolated from this fungus, which belong to the class of benzofurans. In particular, the isolated griesofulvin showed a strong cytotoxic effect on the murine lymphoma cell line L5178Y.

5. *Fusarium lateritium*

The fungal strain *Fusarium lateritium* was isolated, like *Nigrospora sphaerica*, from *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* (Rhizophoraceae), which was also collected in Hainan. For this fungus yielded in total two compounds, which belonged to classes the isocoumarin and anthraquinone derivatives. The isolated acylmacrosporin showed a selective antibiotic effect against *S. aureus* with a MIC of 32 µg/mL.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Naturstoffe</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Naturstoffe in der Arzneimitteltherapie</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Pilze als Symbionten</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Interaktionen zwischen Pflanze und Pilz</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5 Arzneilich relevante Metabolite aus endophytischen Pilzen</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6 Interaktion von Mikroorganismen untereinander</b> .....	<b>11</b>
<b>1.7 Die Wahl des Pflanzenmaterials</b> .....	<b>12</b>
<b>1.8 Zielsetzung</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Biologische Materialien .....	14
2.1.1.1 Pflanzenmaterial .....	14
2.1.2 Kulturmedien.....	16
2.1.2.1 Malz-Agarplatten zur Kultivierung und Aufreinigung.....	16
2.1.2.2 Agar-Medium zur permanenten Lagerung .....	16
2.1.2.4 Kartoffelmedium .....	17
2.1.2.5 Rübenmedium.....	17
2.1.2.6 Bohnenmedium.....	17
2.1.3 Chemikalien .....	18
2.1.3.1 Laborchemikalien .....	18
2.1.3.3 Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten.....	19
2.1.4 Chromatographie .....	20
2.1.4.1 Stationäre Phasen für die Chromatographie .....	20
2.1.4.2 Sprühreagenzien .....	20
2.1.5 Lösungsmittel .....	21
2.1.5.1 Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie.....	21
2.1.5.2 Lösungsmittel für die Säulenchromatographie.....	21
2.1.5.3 Lösungsmittel für HPLC .....	21
2.1.5.4 Lösungsmittel für LC/MS.....	22
2.1.5.5 Lösungsmittel für die Polarimetrie .....	22
2.1.5.6 Lösungsmittel für NMR .....	22
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Isolierung von endophytischen Pilzen aus pflanzlichem Material .....	23
2.2.2 Kultivierung der endophytischen Pilze .....	23
2.2.2.1 Kultivierung der endophytischen Pilze für die unmittelbare Verwendung .....	23

2.2.2.2 Kultivierung zur dauerhaften Aufbewahrung von endophytischen Pilzen .....	23
2.2.2.3 Kultivierung von Pilzen zur Durchführung von Screenings und Isolierung von Sekundärmetaboliten.....	24
2.2.3 Extraktion der Kulturen .....	25
2.2.3.1 Extraktion der Pilzkulturen .....	25
2.2.4 Flüssig/Flüssig Extraktion .....	26
2.2.5 Identifizierung und Taxonomie der endophytischen Pilze.....	27
2.2.5.1 Identifizierung der endophytischen Pilze.....	27
2.2.5.2 Taxonomie .....	29
2.2.6 Isolierung der Sekundärmetabolite aus endophytischen Pilzen.....	34
2.2.6.1 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Rhizoctonia</i> sp.....	34
2.2.6.2 Isolierung und Modifizierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Pleospora</i> sp. ....	35
2.2.6.2.1 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Pleospora</i> sp. ....	35
2.2.6.2.2 Modifizierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Pleospora</i> sp. ....	36
2.2.6.3 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Penicillium glabrum</i> .....	38
2.2.6.4 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Nigrospora sphaerica</i> .....	39
2.2.6.5 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Fusarium lateritium</i> .....	39
2.2.7 Chromatographische Methoden .....	40
2.2.7.1 Dünnschichtchromatographie .....	40
2.2.7.2 Säulenchromatographie.....	40
2.2.7.2.1 Säulenchromatographie.....	40
2.2.7.2.2 Vakuum Flüssigkeitschromatographie - Vacuum Liquid Chromatography ...	41
2.2.7.3 Präparative HPLC .....	41
2.2.8.4 Semipräparative HPLC .....	42
2.2.7.5 Analytische HPLC .....	43
2.2.8 Strukturaufklärung der isolierten Sekundärmetabolite .....	44
2.2.8.1 Massenspektrometrie .....	44
2.2.8.1.1 ESI-MS .....	45
2.2.8.1.2 LCMS.....	45
2.2.8.1.3 EI-MS.....	46
2.2.8.1.4 MALDI-TOF .....	46
2.2.8.1.5 HR-MS.....	46
2.2.8.2 Kernspinresonanzspektroskopie - Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).....	47
2.2.8.3 Optische Aktivität .....	47
2.2.9 Testung der biologischen Aktivität.....	48
2.2.9.1 Antibakterielle Testungen .....	48
2.2.9.2 Antifungale Tests .....	49

2.2.9.3 Zytotoxische Testungen.....	49
2.2.9.4 Hsp90 Testungen.....	50
2.2.9.5 Hemmung der TNF $\alpha$ induzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B.....	51
2.2.11 Generelle Laborgeräte.....	52
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1 Isolierte Verbindungen aus endophytischen Pilzen.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1.1 Isolierte Verbindungen aus <i>Rhizoctonia</i> sp. ....</b>	<b>54</b>
3.1.1.1 Isolierte Verbindungen aus dem Bohnenextrakt von <i>Rhizoctona</i> sp. ....	55
3.1.1.2 Isolierte Verbindungen aus dem Reisextrakt von <i>Rhizoctonia</i> sp. ....	74
<b>3.1.2 Isolierte Verbindungen aus <i>Pleospora</i> sp. ....</b>	<b>80</b>
3.1.2.1 Naturstoffe aus <i>Pleospora</i> sp.....	80
3.1.3.2 Semisynthetische Verbindungen aus <i>Pleospora</i> sp. Metaboliten.....	176
<b>3.1.3 Isolierte Verbindungen aus <i>Penicillium glabrum</i>.....</b>	<b>187</b>
<b>3.1.4 Isolierte Verbindungen aus <i>Nigrospora sphaerica</i>.....</b>	<b>205</b>
<b>3.1.5 Isolierte Verbindungen aus <i>Fusarium lateritium</i>.....</b>	<b>221</b>
<b>3.2 Bioaktivitäten der isolierten Substanzen.....</b>	<b>227</b>
3.2.1 Bioaktivitäten der aus <i>Rhizoctonia</i> sp. isolierten Substanzen.....	228
3.2.2 Bioaktivitäten der aus <i>Pleospora</i> sp. isolierten Substanzen.....	229
3.2.3 Bioaktivitäten der aus <i>Penicillium glabrum</i> isolierten Substanzen.....	234
3.2.4 Bioaktivitäten der aus <i>Nigrospora sphaerica</i> isolierten Substanzen.....	235
3.2.5 Bioaktivitäten der aus <i>Fusarium lateritium</i> isolierten Substanzen.....	235
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>236</b>
<b>4.1 Isolierte Naturstoffe aus <i>Rhizoctonia</i> sp. ....</b>	<b>236</b>
<b>4.2 Isolierte Naturstoffe aus <i>Pleospora</i> sp.....</b>	<b>243</b>
<b>4.3 Isolierte Naturstoffe aus <i>Penicillium glabrum</i>.....</b>	<b>255</b>
<b>4.4 Isolierte Naturstoffe aus <i>Nigrospora sphaerica</i>.....</b>	<b>259</b>
<b>4.5 Isolierte Naturstoffe aus <i>Fusarium lateritium</i>.....</b>	<b>262</b>
<b>5. Schlussfolgerung.....</b>	<b>263</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>265</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>285</b>
<b>8. Anhänge.....</b>	<b>290</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>316</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>317</b>



## 1. Einleitung

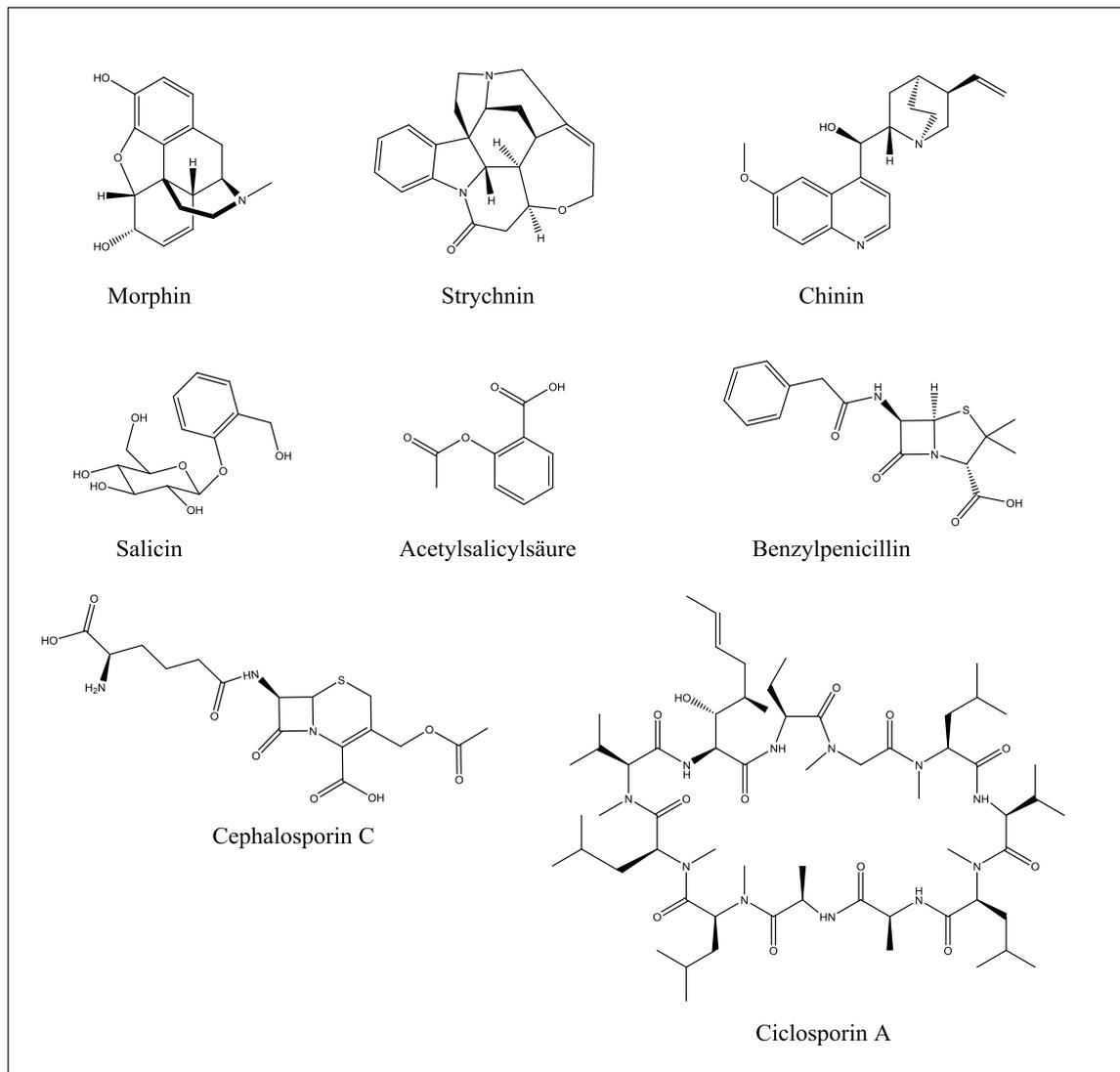
### 1.1 Naturstoffe

Der Begriff „Naturstoff“ definiert sich als Stoff, welcher von Pflanzen, Tieren, Bakterien oder Pilzen produziert wird. Naturstoffe lassen sich in zwei große Kategorien unterteilen, die primären Naturstoffe und die sekundären Naturstoffe. Unter primären Naturstoffen versteht man chemische Verbindungen, wie Aminosäuren, Fettsäuren, organische Säuren und Kohlenhydrate, welche artübergreifend in allen Organismen zu finden sind. Diese spielen für das Wachstum und die Reproduktion eine entscheidende Rolle (Drew and Demain, 1977). Ein Wegfall dieser Stoffe würde unweigerlich zum Absterben des Organismus führen (Croteau, *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu sind sekundäre Naturstoffe spezifisch für Familien oder Arten. Ihre Produktion ist für den produzierenden Organismus nicht zwingend notwendig (Williams, *et al.*, 1989), verbessert jedoch eine Anpassung an einen Standort, unterstützt die Reproduktion oder dient der Abwehr von Schädlingen (Drew and Demain, 1977), wobei nicht immer alle Funktionen bekannt sind (Croteau, *et al.*, 2000). Oftmals gehen die strukturell vielfältigen sekundären Naturstoffe, die für bestimmte Taxa häufig einzigartig sind aus den primären Naturstoffen hervor. Die molekulare Größe dieser Stoffe ist meist kleiner als 3000 Da (Williams, *et al.*, 1989), welche sie auf der Basis ihres biologischen Potentials und der Anwendung der „Lipinski rule of five“ (Lipinski, *et al.*, 1997) bereits in der Vergangenheit zu erfolgreichen Wirkstoffen in der Arzneimitteltherapie machte oder dazu führte, dass sie als Leitstrukturen Pate standen.

### 1.2 Naturstoffe in der Arzneimitteltherapie

Zu Beginn der Naturstoffforschung beschränkten sich die Untersuchungen oftmals auf Pflanzen. Mit der Entdeckung des Morphins aus *Papaver somniferum* durch den deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Adam Sertürner um 1803/1804 und dessen Beobachtung der Wirkung auf den Menschen, welche er 1817 publizierte, wurde erstmals das Potential von rein isolierten Naturstoffen erkannt. Wenig später konnten durch die französischen Apotheker Pierre-Joseph Pelletier und Joseph Bienaimé Caventou Strychnin (1818) und Chinin (1819) isoliert werden (Jurna, 2003). Spätestens mit der Entdeckung des Salicins durch den Pharmazieprofessor Johann Buchner im Jahre 1828, dessen strukturelle Aufklärung 1859 durch Hermann Kolbe und der Modifizierung durch den französischen Chemielehrer Charles Frederic Gerhardt 1853 zur heute noch weitverbreitet eingesetzten Acetylsalicylsäure, war das Potential von Naturstoffen deutlich geworden. Am 10. August 1897 konnte diese Verbindung schließlich durch den Chemiker Felix Hoffmann der Firma Bayer erstmals rein dargestellt werden und wurde zwei Jahre später als Aspirin® vermarktet. Noch heute beträgt der Umsatz mit acetylsalicylsäurehaltigen Produkten mehr als 350 Mio. Euro pro Jahr (Kuhnert, 1999).

Mit der Zufallsentdeckung des Antibiotikums Penicillin durch Sir Alexander Fleming im Jahre 1928 (Fleming, 1944) wurde der Blick zunehmend auf Mikroorganismen als Produzenten arzneilich relevanter Stoffe gerichtet. Wenig später, im Jahre 1945, gelang es Giuseppe Brotzu aus *Acremonium chrysogenum* (früher: *Cephalosporium acremonium*) eine Substanz zu isolieren, welche ebenfalls das bakterielle Wachstum einzuschränken vermochte (Abraham, 1962). Die Substanz konnte jedoch erst zu Beginn der 1950er Jahre durch den Briten Burton isoliert und als Cephalosporin C identifiziert werden (Burton and Abraham, 1951). Spätestens jedoch mit der Entdeckung des Immunsuppressivums Ciclosporin A aus dem Schlauchpilz *Trichoderma polysporum* im Jahre 1969 (Dreyfuss, *et al.*, 1976) zeigte sich das große Potential von Pilzen als Produzenten von Arzneistoffen. Mit der Entdeckung der Ivermectine und deren Wirkung auf Milben, sowie auf pflanzliche Parasiten, zeigte sich, dass pilzliche Sekundärmetabolite nicht nur eine Anwendbarkeit im Bereich der Humanmedizin, sondern auch im veterinärmedizinischen Bereich haben (Campbell, *et al.*, 1983). Die Tatsache, dass rund 64 % aller zwischen 1981 und 2010 zugelassenen Arzneimittel biologischen Ursprungs sind oder aus natürlichen Verbindungen abgeleitet wurden (Newman and Cragg, 2012), zeigt dass die Untersuchung von Naturstoffen noch immer vielversprechend ist.



**Abb. 1.1:** Einige Naturstoffe oder deren Derivate in der Arzneimitteltherapie.

### 1.3 Pilze als Symbionten

Breits 1885 konnte Janse *et al.* eine Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen durch die Entdeckung der Mykorrhiza beweisen (Janse, 1897). Diese Verflechtung zwischen Pilz und Pflanze auf Ebene der Wurzeln lässt sich in die zwei großen Gruppen Ekto- und Endomykorrhiza unterteilen. Die Ektomykorrhiza tritt hauptsächlich im Bereich der apikalen Wurzeln auf und penetriert nicht die pflanzlichen Zellen. Insgesamt kann sie bis zu 90 % der Wurzelmasse ausmachen. Endomykorrhiza, welche fast nie im apikalen Bereich der Wurzel vorzufinden ist, tritt durch Eintrittsstellen in den Pflanzenkörper ein, um mit ihm zu interagieren (Marschner and Dell, 1994). Hierbei kann die Wurzel bis zu 2000 x pro cm von den Hyphen des Pilzes durchdrungen werden (Meyer, 1989). In beiden Fällen profitieren Pilz und Pflanze voneinander: die Mykorrhiza vermögen Phosphor, Nitrat, Kalium, Calcium, Sulfat, Kupfer, Zink, Eisen, Ammonium und Wasser aus einem großen Bereich um die Wurzeln herum für die Pflanze

zugänglich zu machen. Im Gegenzug erhalten die Pilze bis zu 20 % der durch Photosynthese hergestellten Kohlenhydrate (Marschner and Dell, 1994). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Endomykorrhiza die pflanzliche Terpen-Biosynthese induzieren kann (Zhao, *et al.*, 2006). Es konnte über fossile Funde bereits nachgewiesen werden, dass sowohl Endophyten (Krings, *et al.*, 2007), als auch Mykorrhiza (Redecker, *et al.*, 2000) mindestens seit 400 Mio. Jahren mit Pflanzen assoziiert sind. Weltweit sind Gräser und verholzte Pflanzen mit Endophyten besiedelt (Bills, *et al.*, 1996, Kowalski and Kehr, 1996, Petrini, 1986, Saikkonen, *et al.*, 1998). Untersuchungen der biologischen Vielfalt konnten zeigen, dass die taxonomische Varietät von Pilzen in verholzten Pflanzen größer ist, als in Gräsern (Petrini, 1991, Petrini, *et al.*, 1993). Hierbei treten die Endophyten insbesondere in den Blättern, den Blattstielen, Stängeln oder der Rinde auf (Saikkonen, *et al.*, 1998).

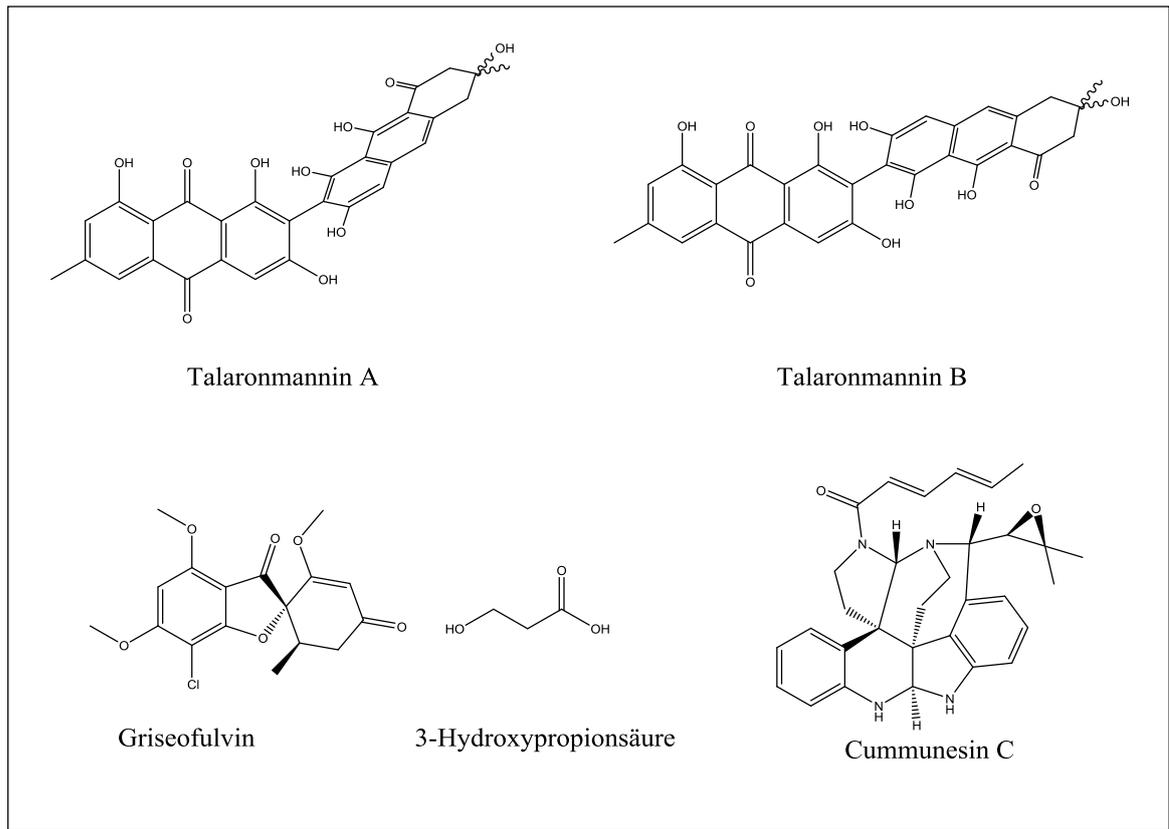
Diese Art der engen Verflechtung wird nur noch durch Flechten und beispielsweise von der Blattschneiderameise übertroffen. Die Blattschneiderameise (*Acromyrmex* sp.) ernährt sich von dem Pilz *Leucoagaricus* sp., welchen sie in ihrem Bau kultiviert. Hierzu zerschneidet sie frisches Blattmaterial, zerkaut dieses und führt es dem Pilz als Substrat zu. Erstaunlich ist die Tatsache, dass die Blattschneiderameise sich ausschließlich von dem Pilzmaterial ernähren kann. Um eine Kontamination ihrer Pilzkultur zu vermeiden, wird das Pflanzenmaterial, wie auch die Arbeiterinnen selber durch den säurehaltigen Speichel der Tiere desinfiziert. Die einmal rein gewonnene Kultur des Pilzes wird von einer Generation zur nächsten durch eine junge Königin, welche ein kleines Stück der Kultur in ihrer Maultasche in eine neue Kolonie überführt, fortgeführt (Cherrett, *et al.*, 1989).

Eine weitere Möglichkeit der pilzlichen Symbiose ist das Vorkommen des Pilzes in einem pflanzlichen Vegetationskörper. Diese Pilze werden als „Endophyt“ bezeichnet, was sich aus dem griechischen Wort „endon“ = „innen“ und „phyton“ = „Pflanze“ ableitet. Hierdurch wird eindeutig die Art und Weise des Lebensraums von endophytischen Pilzen charakterisiert. Neben endophytischen Pilzen umfasst der Sammelbegriff „Endophyt“ auch im Inneren von pflanzlichen Vegetationskörpern lebende Bakterien (Chanway, 1996). Dieses Zusammenleben kann als eine mutualistische Symbiose gesehen werden. Sie beschreibt ein gegenseitiges Nutzenverhältnis, welches auf einer sensiblen Balance beruht, nämlich dem Gleichgewicht zwischen pflanzlicher Abwehrkraft und pilzlicher Pathogenität. Kommt es beispielsweise zu einer Schwächung des pflanzlichen Abwehrsystems, können einige endophytische Pilze auch selber Krankheitssymptome hervorrufen (Schulz, *et al.*, 2002). Prominente Beispiele sind *Alternaria* sp. (Nishimura and Kohmoto, 1983), *Fusarium* sp. (Matsuo and Ueno, 1983) und *Stemphylium* sp. (Trigos, *et al.*, 2011), die als Fäulnispilze aus Degradationsprozessen von abgestorbenem Pflanzenmaterial bekannt sind.

#### 1.4 Interaktionen zwischen Pflanze und Pilz

Dieses Zusammenleben der Mikro- und Makroorganismen kann als mutualistische Symbiose gesehen werden (Saikkonen, *et al.*, 1998). Die Wirtspflanze schützt die Mikroorganismen vor äußeren Einflussfaktoren, wie UV-Strahlung (Van de Staaij, *et al.*, 2001) und anderen Mikroorganismen und stellt Nährstoffe zur Verfügung (Marschner and Dell, 1994). Im Gegenzug bieten die Mikroorganismen der Wirtspflanze Stoffe an, welche vor Fraßfeinden wie Insekten (Saikkonen, *et al.*, 1998) und Infektionen mit anderen Mikroorganismen schützen. Stellvertretend können hierfür die zytotoxischen Substanzen Paclitaxel (Stierle, *et al.*, 1993) und Camptothecin (Rehman, *et al.*, 2008), die antibiotischen Substanzen Talaromanin A und B (Bara, *et al.*, 2013) und Griseofulvin (Xia, *et al.*, 2011), sowie die insektiziden Substanzen 3-Hydroxypropionsäure (Schwarz, *et al.*, 2004) und Cummunesin C (Hayashi, *et al.*, 2004) gesehen werden. Durch die Produktion von hygroskopischen und osmotisch aktiven Substanzen wie Manitol, Inositol, Arabitol und Glycerol können Standortvorteile in besonders trockenen Regionen geschaffen werden (Bacon, 1993). Ein beeindruckendes Beispiel für Standortvorteile, die durch eine mutualistische Symbiose zwischen Pilz und Pflanze geschaffen werden können, ist die Besiedelung von *Dichanthelium lanuginosum* mit *Curvularia languginosum*. Sowohl Pflanze, als auch Pilz ermöglicht dies auf geothermalen Quellen zu wachsen, wohingegen die axenischen Organismen keine Temperatur über 38 °C tolerierten (Redman, *et al.*, 2002). Die Produktion von zytotoxischen, antibiotischen und insektiziden Substanzen durch die Endophyten kann als eine Art erworbene Abwehr der Pflanze angesehen werden. Pflanzen sind Standort gebunden und besitzen eine relativ geringe Zellteilungsrate. Im Gegensatz zu den Pflanzen besitzen Mikroorganismen i.d.R. jedoch eine hohe Zellteilungsrate und ein hohes genetisches Rekombinationsvermögen, welches ihnen hilft sich schnell an ändernde Umweltfaktoren anzupassen. Diese Vorteile können von der Pflanze „gezielt“ genutzt werden um sich gegen Konkurrenten durchzusetzen (Carroll, 1988). Es bleibt jedoch die Frage offen, ob die Infektion der Pflanze mit endophytischen Pilzen systemisch ist, oder nicht. Das individuelle Vermögen der endophytischen Pilze Stoffe zu bilden, welche als Mediatoren der Verteidigung eingesetzt werden können, ist an die möglichst breite Distribution dieser Stoffe im pflanzlichen Organismus geknüpft. Einige Autoren gehen von einer generellen, nicht systemischen (Petrini, *et al.*, 1993) Infektion aus, andere wiederum von einer systemischen (Schulthess and Faeth, 1998). Dies deutete darauf hin, dass beide Formen wahrscheinlich simultan vorliegen. Die Bewertung des Nutzens und der Bedeutung von pilzlichen Metaboliten ist jedoch an die Verteilung des Pilzes im pflanzlichen Organismus geknüpft. Systemisch verteilte endophytische Pilze können über zwei Wege von einer Pflanze auf eine andere übertragen werden. Zum einen besteht die Möglichkeit eines vertikalen Transfers durch das Einschließen der Hyphen in die Samen der Pflanze, zum anderen die eines horizontalen Transfer durch Sporen (Carroll, 1988, Schardl and Clay, 1997). Dies bedeutet reproduktionsbiologisch betrachtet die klonale oder die sexuelle Vermehrung mit

der Möglichkeit einer genetischen Rekombination. Horizontale Transfers können unter anderem durch herbivore Insekten ermöglicht werden. Dies ist sowohl durch die Weitertragung von Sporen, als auch durch die Wundbildung und damit verbundene Penetration der Sporen möglich (Faeth and Hammon, 1997a, b, Saikkonen, *et al.*, 1998). Insbesondere die vertikale Verbreitung zeigt damit eine Wirtspräferenz, welche den Standortvorteil des Pilzes in der Pflanze unterstreicht. Dies in Kombination mit der fehlenden genetischen Rekombination zeigt aber auch, dass die so verbreiteten endophytischen Pilze nur begrenzt als eine Art des adaptiven Immunsystems der Pflanze gesehen werden können. Jedoch können die durch horizontalen Transfer übertragenen Pilze die mikrobielle Gemeinschaft einer Pflanze ständig verändern und damit eine Art des erworbenen Immunsystems darstellen (Faeth and Hammon, 1997a, b, Saikkonen, *et al.*, 1998). Betrachtet man insbesondere die Endophyten von verholzten Pflanzen, so zeigt sich, dass die meisten von ihnen mit pathogenen Pilzen verwandt sind, jedoch über eine reduzierte Virulenz oder verlängerte Latenzphase verfügen (Petrini, *et al.*, 1993, White Jr, *et al.*, 1993). Neben diesen Interaktionen wird diskutiert, ob ein genetischer Transfer zwischen Pflanzen und Pilzen stattfinden kann. So gibt es die Beobachtung, dass einige typische Pflanzenmetabolite, wie beispielsweise Taxol (Stierle, *et al.*, 1993, Strobel, *et al.*, 1996a), Podophyllotoxin (Puri, *et al.*, 2006), Hypericin (Kusari, *et al.*, 2008) und Camptothecin (Pur, *et al.*, 2007) auch von endophytischen Pilzen gebildet werden können. Hieraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass eine genetische Rekombination zwischen Wirt und Symbiont stattfindet - der sogenannte horizontale Gentransfer - so dass die Pilze die Fähigkeit zur Biosynthese pflanzlicher Metabolite erlangen (Strobel, *et al.*, 1996b). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in einem solchen Gentransfer die übertragenen DNA Fragmente komplex variiert werden können (Khaldi, *et al.*, 2008). Daneben können endophytische Pilze auch die Genexpression in ihrer Wirtspflanze beeinflussen (Bailey, *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite konnte aber auch gezeigt werden, dass das sowohl aus *Hypericum perforatum* wie auch *Thielavia subthermophila* isolierte Hypericin (Kusari, *et al.*, 2008) in beiden Organismen über unterschiedliche Biosynthesewege dargestellt wird (Kusari, *et al.*, 2009). Ein aus *Camptotheca accuminata* isolierter *Fusarium solani* zeigte die Fähigkeit zur Biosynthese von Camptothecin, welche jedoch im Laufe der Zeit verloren ging. Eine Reinfektion der Pflanze mit dem Endophyten und der erneuten Isolierung konnte den ursprünglichen Zustand nicht mehr herstellen, welches auf die Instabilität einiger Biosynthesegene zurückzuführen ist (Kusari, *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Interaktionen zwischen den Organismen noch nicht vollständig verstanden sind. Auch bleibt die Frage offen, wie eine Interaktion im natürlichen Habitat zwischen mehreren involvierten Organismen beschaffen ist.



**Abb. 1.2:** Einige bioaktive Stoffe aus endophytischen Pilzen.

### 1.5 Arzneilich relevante Metabolite aus endophytischen Pilzen

Sekundärmetabolite endophytischer Pilze spielen heute eine zunehmende Rolle in der Therapie von Krebserkrankungen, Fettstoffwechselstörungen und Organtransplantationen.

Das bekannteste und kommerziell erfolgreichste Produkt aus endophytischen Pilzen ist das Diterpen Paclitaxel. Paclitaxel wurde erstmals in den 1970er Jahren aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert (Wani, *et al.*, 1971). Durch die Polymerisierung von Tubulin, ohne die Anwesenheit von weiteren Co-Faktoren, kommt es durch Paclitaxel zu einer Störung beim Aufbau des zur Zellteilung essentiellen Spindelapparates. Hierdurch verweilt die Zelle in der G<sub>2</sub>-Phase, unfähig sich zu teilen (Horwitz, 1992). Diese Eigenschaften ermöglichten den Einsatz von Paclitaxel (Taxol®) in der Therapie von Ovarial-, Bronchial, Prostata- und Mammakarzinomen. Als problematisch erwies sich jedoch der geringe Gehalt an Paclitaxel in der pazifischen Eibe. In der Kombination mit einem sehr langsamen Wachstum, hätte dies in seiner Konsequenz zur Ausrottung der pazifischen Eibe geführt (Horwitz, 1992). Auf der Suche nach neuen Quellen zur Darstellung von Paclitaxels wurde unter anderem die Kalluskultur von *Taxus baccata*, wie auch die semisynthetische Abwandlung von 10-Deacetylbaccatin III aus den Nadeln der europäischen Eibe (Lavelle, *et al.*, 1993) erschlossen. 1993 konnte Paclitaxel erstmals auch aus dem endophytischen Pilz *Taxomyces andreanae* isoliert werden, welcher aus dem Phloem von *Taxus brevifolia* isoliert wurde (Stierle, *et al.*, 1993). In den darauf folgenden Jahren folgten weitere

Endophyten, wie *Pestalotiopsis microspora* (Strobel, *et al.*, 1996a), *Phyllosticta spinarum* (Senthil Kumaran, *et al.*, 2008), *Cladosporium cladosporides* (Zhang, *et al.*, 2009a) und *Aspergillus candidus* (Zhang, *et al.*, 2009b). Als weitere Beispiele für Naturstoffe, die zunächst im Pflanzenreich entdeckt wurden, sind Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus roseus* zu nennen. Die dimeren Alkaloide binden, genau wie das Paclitaxel an die Mikrotubuli und verhindern durch die Interaktion mit dem Spindelapparat die Zellteilung (Owellen, *et al.*, 1972). Daher haben diese beiden Substanzen ebenfalls Einzug in die Behandlung von Krebserkrankungen gehalten. Mittlerweile konnten auch diese Verbindungen bereits aus endophytischen Pilzen, wie z.B. *Mycelia sterilia* 97CY<sub>3</sub> (Xianzhi, *et al.*, 2003) und *Fusarium oxysporum* (Kumar, *et al.*, 2013) isoliert werden. Ähnlich verhält es sich mit Podophyllotoxin. Erstmals 1880 rein dargestellt, wurde es aus *Podophyllum peltatum* isoliert und zeigte in ersten Tierversuchen bereits eine hohe Toxizität (Podwyssotzki, 1880). Das Spindelgift, das aufgrund seiner hohen Toxizität heute nur noch in der Behandlung von Feigwarzen eingesetzt wird (Condylox ®), diente als Vorlage für die Entwicklung der Topoisomerase-II-Hemmstoffe Etoposid und Teniposid. Diese führen neben der Inhibierung der Topoisomerase II zusätzlich durch eine Fixierung des Enzym-DNA-Komplexes und der damit verbundenen fehlenden Wiederverknüpfung der DNA zu DNA Doppelstrangbrüchen (Van Maanen, *et al.*, 1988). Später konnte Podophyllotoxin auch aus den endophytischen Pilzen *Trametes hirsuta* (Puri, *et al.*, 2006), *Phialocephala fortinii* (Eyberger, *et al.*, 2006) und *Fusarium oxysporum* (Kour, *et al.*, 2008) isoliert werden. Analog zum Beispiel von Podophyllotoxin wurde Camptothecin 1966 zunächst aus *Camptotheca accuminata* isoliert (Wall, *et al.*, 1966). Durch die Inhibierung der Topoisomerase I führt Camptothecin zu DNA Einzelstrangbrüchen (Hsiang, *et al.*, 1985). Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und des starken Nebenwirkungspotentials wurden die halbsynthetischen Derivate Irinotecan und Topotecan dargestellt (Houghton, *et al.*, 1995), welche heute noch in der Behandlung von metastasierendem Kolonkarzinom bzw. Ovarialkarzinom und kleinzelligem Bronchialkarzinom eingesetzt werden. Wie auch bei allen zuvor beschriebenen Verbindungen konnte das Camptothecin auch aus endophytischen Pilzen gewonnen werden. So sind als Quelle *Entrophospora infrequens* (Pur, *et al.*, 2007), *Trichoderma atroviride* (Pu, *et al.*, 2013), *Neurospora* sp. (Rehman, *et al.*, 2008), *Nodulisporium* sp. (Rehman, *et al.*, 2009) und *Fusarium solani* (Shweta, *et al.*, 2010) beschrieben worden.

Neben den Beispielen von zytotoxischen Substanzen gibt es weitere Beispiele von bioaktiven Verbindungen, welche in der Arzneimitteltherapie eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist Lovastatin. Das im Jahre 1980 als Sekundärstoffwechselmetabolit aus *Aspergillus terreus* entdeckte Lovastatin war neben dem 1976 aus *Penicillium citrinum* isoliertem Mevastatin (Compactin) einer der ersten Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Durch die Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase, einem Schlüsselenzym des Acetat-Mevalonat Weges, kommt es zunächst zu einer verringerten Bildung

von Isopreneinheiten, was sich im Rahmen der Terpenbiosynthese in einer Senkung der Triterpene, insbesondere des Cholesterins bemerkbar macht (Alberts, 1988). Viele Derivate dieser ursprünglichen Verbindungen aus der Klasse der Statine sind daher heute zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen als Fertigarzneimittel erhältlich. Lovastatin und dessen Derivate wurden zudem aus den endophytischen Pilzen *Aspergillus terreus* aus *Taxus baccata* (Goswami, *et al.*, 2012) und *Diaporthe* sp. aus *Camptotheca acuminata* (Liu, *et al.*, 2013) isoliert. Hypericin, welches auch als Bestandteil des Extraktes von *Hypericum perforatum* bekannt ist, der zur Behandlung von leichten bis mittleren Depressionen eingesetzt wird, konnte aus dem endopytischen Pilz *Thielavia subthermophila* isoliert werden (Kusari, *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zu der lichtkatalysierten Umsetzung von Protohypericin zu Hypericin, die Umsetzung im Pilz lichtunabhängig stattfindet (Kusari, *et al.*, 2009)

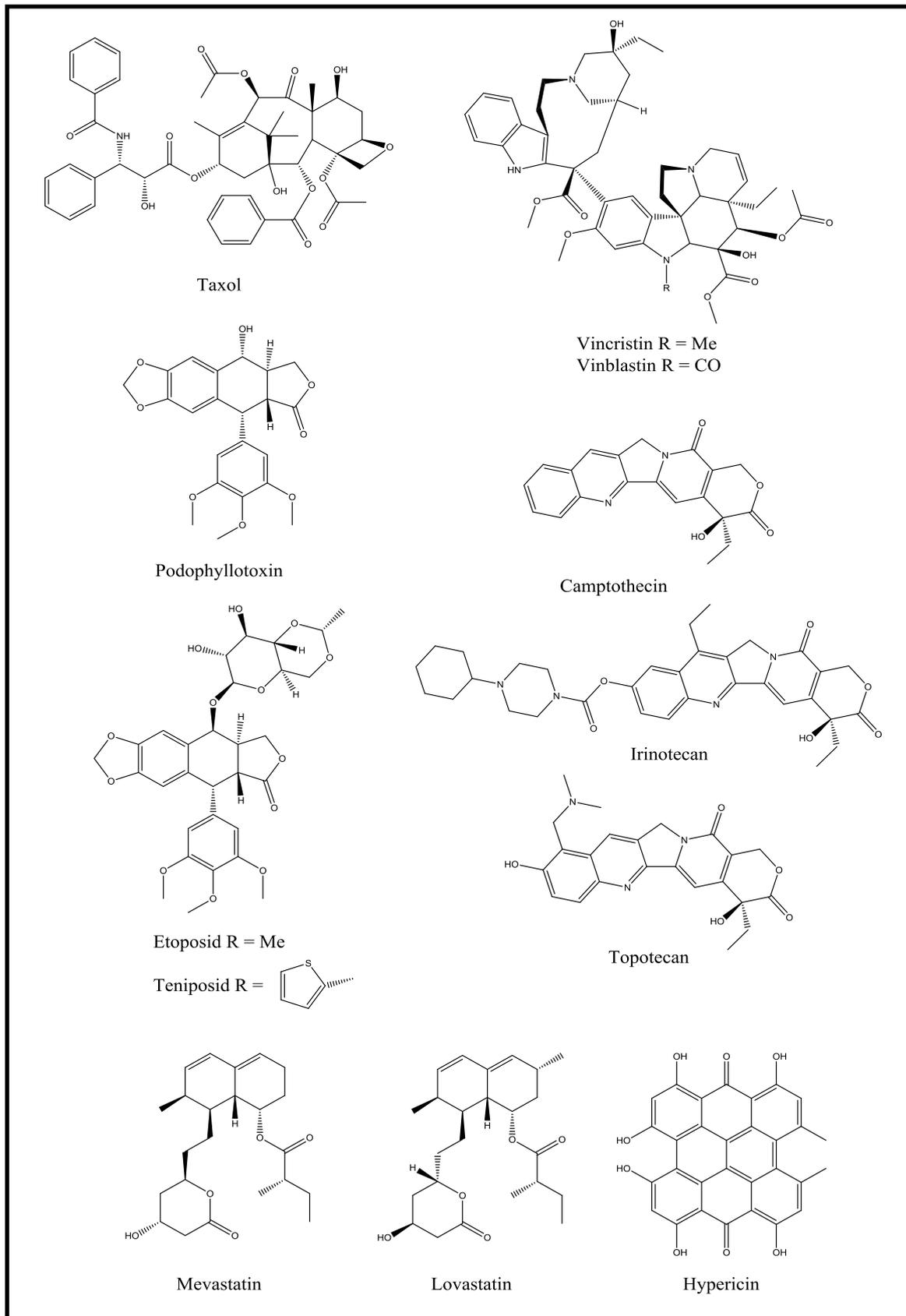


Abb. 1.3: Einige pilzliche Naturstoffe oder deren semisynthetische Derivate in der Arzneimitteltherapie

## 1.6 Interaktion von Mikroorganismen untereinander

Auf der ständigen Suche nach neuen Naturstoffen, die in der Arzneimitteltherapie eingesetzt werden können, wurde eine Vielzahl von Anstrengungen unternommen die Produktivität, sowie das Sekundärstoffwechselprofil von endophytischen Pilzen im Labormaßstab zu beeinflussen. Ein wichtiger Ansatz hierzu war die OSMAC Strategie (One strain many compounds), welche durch die Veränderung von pH, Nährstoffangebot, Belüftung, Salinität, Änderung des Fermentationstyps und der Fermentationszeit das Sekundärmetabolitenprofil verändern kann. So können aus einem axenisch kultivierten Pilzstamm aus jeder Kultivierungsbedingung unterschiedliche Sekundärmetabolite isoliert werden (Bode, *et al.*, 2002, Knight, *et al.*, 2003). Weitere Ansätze wie die UV-induzierte Genommutation (Bode, *et al.*, 2002), Stressinduktion durch Hitzeschock (Doull, *et al.*, 1993), sowie epigenomische Manipulationen, beispielsweise durch Modifizierung des Histon-Acetylierungsgrades (Cichewicz, 2010, Fisch, *et al.*, 2009, Henrikson, *et al.*, 2009, Shwab, *et al.*, 2007), stellen weitere wichtige Methoden dar. Jedoch berücksichtigte keiner dieser Ansätze die Gegebenheiten des natürlichen Habitats. In einem neuen Ansatz der Co-Kultivierung von Pilzen untereinander oder Pilzen mit Bakterien konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass der Versuch eines Mimikry des natürlichen Lebensraumes zur Entdeckung neuer Substanzen führen kann. Als interessante Beispiele hierfür sind die Kultivierungen des endophytischen Pilzes *Fusarium tricinctum* mit *Fusarium begoniae* (Wang, *et al.*, 2013) oder mit dem Bodenbakterium *Bacillus subtilis* (Ola, *et al.*, 2013) zu nennen. Wang *et al.* konnten hierbei die Induktion der neuen Stoffwechselmetaboliten Subenniatin A und B beobachten, Ola *et al.* isolierte auf diese Weise die neuen Verbindungen Macrocarpon C, 2-(Carboxymethylamino)benzoesäure und (-)-Citreisocoumarinol, welche jeweils in den axenischen Kulturen nicht zu beobachten waren. Ein weiteres Beispiel ist die Produktion der Lipoaminopeptide Acremostatin A, B und C, welche aus einer gemischten Fermentierung des Endophyten *Acremonium* sp. mit dem Mycoparasiten *Mycogone rosae* isoliert wurden (Degenkolb, *et al.*, 2002). Neben der Induktion von neuen Stoffwechselmetaboliten konnte auch gezeigt werden, dass eine Co-Kultivierung zur vermehrten Bildung bereits vorhandener Stoffe führen kann. So führte beispielsweise die Co-Kultivierung des endophytischen Pilzes *Paraconiothyrium* sp., isoliert aus der pazifischen Eibe, zusammen mit den Endophyten *Alternaria* sp. und *Phomopsis* sp. aus derselben Quelle, zu einer exponentiellen Zunahme des konstitutiv vorkommenden Paclitaxels (Soliman and Raizada, 2013). Detaillierte molekularbiologische Untersuchungen des vollständig sequenzierten Modelorganismus *Aspergillus nidulans* mit dem Bakterium *Streptomyces rapamycinicus* zeigte, dass die Induktion neuer Naturstoffe auf einer Modifizierung des Histon-Acetylierungsgrades, ähnlich dem der durch den Histon Deacetylase Inhibitor SAHA verursacht wird (König, *et al.*, 2013, Nützmann, *et al.*, 2011). Es konnte durch mehrere Studien gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen den Mikroorganismen durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden kann. Zum einen

konnte die Notwendigkeit eines direkten Zell-Zell-Kontaktes nachgewiesen werden (König, *et al.*, 2013, Nützmann, *et al.*, 2011, Oh, *et al.*, 2005), zum anderen konnte aber auch eine Induktion von neuen Naturstoffen über niedermolekulare Stoffe beobachtet werden (Sonnenbichler, *et al.*, 1994). Neben diesen Aspekten sollte jedoch nicht aus dem Auge verloren werden, dass auch ein horizontaler Gentransfer zwischen den Mikroorganismen eine Rolle spielen kann, wie er z.B. für die Bakterien *Rhodococcus facians* und *Streptomyces padanus* beschrieben ist (Kurosawa, *et al.*, 2008), was das Interaktionspotential zusätzlich vergrößert. Auch der horizontale Gentransfer zwischen Pilzen und Bakterien, durch welchen beispielsweise eine Polyketidsynthase zwischen den Organismen ausgetauscht werden kann, wurde bereits beschrieben (Schmitt and Lumbsch, 2009). Dies zeigt eindrucksvoll die vielseitigen Facetten mikrobieller Gemeinschaften und die damit verbundene schwere Vorhersagbarkeit optimaler Fermentationsbedingungen. Es zeigt aber auch, dass die Fermentation im Labormaßstab bei weitem noch nicht das volle Potential an Sekundärmetaboliten ausschöpft.

### **1.7 Die Wahl des Pflanzenmaterials**

Weltweit, sowohl in den arktischen (Rosa, *et al.*, 2009) und tropischen Regionen (Arnold, *et al.*, 2003), wie auch den Wüstenregionen (Bashyal, *et al.*, 2005) sind Pflanzen von endophytischen Pilzen besiedelt. Das zeigt, dass die Symbiose zwischen Pflanzen und Pilz ein Erfolgskonzept ist, von dem beide Partner profitieren. Da nahezu alle Pflanzen Endophyten enthalten (Petrini, 1986, Strobel and Daisy, 2003) muss es das Ziel sein, möglichst vielversprechende Pilzstämme zu isolieren. Um diese hohe Diversität an Endophyten zu erhalten schlagen einige Autoren vor, Pflanzen aus einzigartigen Habitaten oder mit ungewöhnlichen Eigenschaften als Quelle zu wählen. Insbesondere Pflanzen mit einzigartigen Überlebensstrategien, ethnobotanisch schon seit Jahrhunderten in Gebrauch, endemisch verbreitet sind, oder aus biodiversen Habitaten eignen sich im Besonderen zur Isolierung von endophytischen Pilzen (dual Banerjee, 2011).

## 1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es endophytische Pilze aus Pflanzen extremer Habitats zu isolieren und sie unter der besonderen Berücksichtigung einer potentiellen medizinischen Anwendung auf ihr biologisches Potential hin systematisch zu untersuchen. Hierzu wurden endophytische Pilze aus Pflanzen des subtropischen (Hainan, China), des kontinentalen (Taschkent, Usbekistan) und mediterranen Klimas (Rabat, Marokko) isoliert, aufgereinigt und aus ihnen gewonnene Extrakte systematisch auf ihr zytotoxisches und antibiotisches Potential hin untersucht. Aus diesem Screening heraus zeigten sich sechs interessante Pilze, *Rhizoctonia sp.*, *Pleospora sp.*, *Penicillium glabrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium lateritium* und *Nigrospora sphaerica*, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Sekundärstoffwechselprodukte untersucht wurden.

Zur Isolierung der Sekundärmetaboliten wurden die Pilze zunächst für einen Zeitraum von ca. vier Wochen auf einem Feststoffmedium, wie Reis oder Bohnen kultiviert und die Kultur anschließend mit organischen Lösungsmitteln erschöpfend extrahiert. Die so gewonnenen Extrakte wurden zunächst mittels HPLC-DAD und LC-MS charakterisiert, bevor sie durch chromatographische Methoden bis zu den Reinstoffen aufgetrennt wurden.

Gewonnene Reinsubstanzen wurden neben der Untersuchung mittels HPLC-DAD und LC-MS, durch ein- und zweidimensionale Kernresonanzspektroskopie, hochauflösende Massenspektrometrie und Polarimetrie charakterisiert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Darüberhinaus wurden die identifizierten Substanzen ausgewählten Bioassays zugeführt, welche in Kooperation mit Prof. M. Kassack (Universität Düsseldorf), Prof. W.E.G. Müller (Universität Mainz), Prof. H. Brötz-Oesterhelt (Universität Düsseldorf) und Dr. A. Pretsch (SeaLifePharma, Tulln) durchgeführt wurden. Hierbei wurde sowohl der Effekt auf murine und humane Krebszelllinien, als auch auf klinisch relevante Problemkeime untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Biologische Materialien**

##### **2.1.1.1 Pflanzenmaterial**

Ein Teil des Pflanzenmaterials aus welchem die endophytischen Pilze isoliert wurden, stellte Frau Prof. Elena Kamillova (Universität Taschkent, Usbekistan) zur Verfügung. Die Pflanzen wurden durch sie selbst und Prof. Peter Proksch identifiziert.

Ein anderer Teil wurde im Rahmen einer Exkursion von Prof. Peter Proksch in den Mangrovenwäldern in Hainan in China gesammelt.

Weiteres Pflanzenmaterial wurde im Rahmen einer Exkursion von Dr. Abdessamd Debbab und mir im botanischen Garten von Rabat, Marokko, gesammelt. Die Identität der Pflanzen wurde mit Hilfe der Beschilderung und zusätzlichem Abgleich mit der Fachliteratur bestimmt.

Das Pflanzenmaterial wurde frisch in Form von Blüten, Blättern, Stängeln, Rinden und Wurzeln gesammelt und unmittelbar in Falcon Reaktionsgefäße verpackt, mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C gelagert bis die Endophyten isoliert wurden.

## 2.1.1.2 Isolierte endopyhtische Pilze

Quelle	Stamm	Code	Identität		
<i>Mentha asiatica</i>	EK11	2	<i>Chaetonium globosum</i>		
		7.1	<i>Chaetonium globosum</i>		
		8.2	unidentifiziert		
		8.5	<i>Rhizoctonia</i> sp.		
<i>Thymelaea lythroides</i>	MM10F MM10L MM10S	L1	<i>Epicoccum nigrum</i>		
		L2	unidentifiziert		
		L3	unidentifiziert		
		L4	unidentifiziert		
		L5-1	<i>Epicoccum nigrum</i>		
		L5-2	<i>Alternaria alternata</i>		
		F1	unidentifiziert		
		F2	<i>Pleospora</i> sp.		
		F3	<i>Cladosporium</i> sp.		
		S1	unidentifiziert		
		S2	unidentifiziert		
		S3	unidentifiziert		
		S3-1	<i>Cladosporium</i> sp.		
		<i>Carpobrotus rossii</i>	MM11FTop MM11FBottom MM11L MM11S	FTop1	unidentifiziert
				FTop2	unidentifiziert
FTop3	<i>Penicillium glabrum</i>				
FTop4	unidentifiziert				
FBottom1	unidentifiziert				
<i>Bruguiera sexangula</i> var. <i>Rhynchoptala</i>	BS	S	<i>Fusarium lateritium</i>		
		L	<i>Nigrospora sphaerica</i>		

### **2.1.2 Kulturmedien**

Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch bei 121 °C 20 min autoklaviert.

#### **2.1.2.1 Malz-Agarplatten zur Kultivierung und Aufreinigung**

Dieses Medium wurde zur Isolierung, Aufreinigung und Kurzzeitkultivierung verwendet. Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Agar-agar:	15,0 g
Malz-Extrakt:	15,0 g
Destilliertes Wasser:	ad 1000,0 mL
pH	7,4-7,8 (eingestellt mit NaOH oder HCl)

Medium, das zur Isolierung und Aufreinigung verwendet wurde, enthielt zusätzlich Chloramphenicol (0,1 g/L) und Streptomycin (0,2 g/L) um eine Kontamination mit Bakterien zu vermeiden. Aufgrund seiner Thermolabilität wurde das Streptomycin erst nach dem Autoklavieren des Mediums unter einer Sterilbank zugesetzt.

#### **2.1.2.2 Agar-Medium zur permanenten Lagerung**

Um eine permanente Lagerung der Pilze bei -86 °C zu ermöglichen wurde ein Medium mit folgender Komposition hergestellt:

Agar-agar:	13,0 g
Malz-Extrakt:	20,0 g
Weizen-Extrakt:	0,1 g
Glycerin:	50 mL
Destilliertes Wasser:	ad 1000,0 mL

#### **2.1.2.3 Reismedium**

Dieses Medium wurde zur large-scale-Kultivierung eingesetzt. Es setzt sich wie folgt zusammen:

Milchreis (ORYZA):	100,0 g
Destilliertes Wasser:	110,0 mL

Der Reis wurde zur Quellung ca. 24 Stunden im Wasser stehen gelassen bevor dieser autoklaviert wurde.

#### **2.1.2.4 Kartoffelmedium**

Zwei Varianten wurden verwendet:

Variante 1:

Kartoffel, ungeschält:	140,0 g
Destilliertes Wasser:	60,0 mL

Variante 2:

Kartoffel, geschält:	140,0 g
Destilliertes Wasser:	60,0 mL

Verwendet wurde Solara (festkochend) von Sonnenstrahl L-05/01 W-580. In beiden Fällen wurden die Kartoffeln in etwa 5x5 mm große Stücke zerschnitten, in einen Erlenmeyerkolben (1000 mL) gegeben, mit Wasser überschichtet und unmittelbar autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das überschüssige Wasser unter einer Sterilbank mittels einer Pipette entfernt.

#### **2.1.2.5 Rübenmedium**

Dieses Medium wurde zur large-scale-Kultivierung eingesetzt. Es setzt sich wie folgt zusammen:

Rübe:	130,0 g
Destilliertes Wasser:	70,0 mL

Die Rübe wurde zunächst geschält und in Stücke der Größe von 5x5mm zerschnitten. Die Stücke wurden in einen Erlenmeyerkolben (1000 mL) gegeben, mit Wasser überschichtet und unmittelbar autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das überschüssige Wasser unter einer Sterilbank mittels einer Pipette entfernt.

#### **2.1.2.6 Bohnenmedium**

Dieses Medium wurde zur large-scale Kultivierung eingesetzt. Es setzt sich wie folgt zusammen:

Weißer Bohnen:	80,0 g
Destilliertes Wasser:	soviel, bis die Bohnen vollständig bedeckt sind

Die Bohnen wurden zunächst in einen Erlenmeyerkolben (1000 mL) gegeben und mit Wasser überschichtet. Der Ansatz wurde über Nacht stehen gelassen um den Bohnen eine Quellung zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Anpassung des Wasserspiegels auf Oberflächenhöhe gefolgt von der Autoklavierung.

### **2.1.2.7 Wickerhammedium**

Dieses Medium wurde für Kultivierungsexperimente und für die Lagerung der Kulturen bei -86 °C eingesetzt. Es setzt sich wie folgt zusammen:

Weizen Extrakt	3,0 g
Malz-Extrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Glukose-Monohydrat	10,0 g
Destilliertes Wasser	ad 1000,0 mL
pH:	7,2-7,4 (eingestellt mit NaOH oder HCl)

Für die Verwendung des Mediums als Dauerkultur wurde dem Medium 20 % Glycerol zugesetzt.

### **2.1.3 Chemikalien**

#### **2.1.3.1 Laborchemikalien**

2-Butanol	Merck
Aceton	Aus dem Chemikalienlager der HHU
Ameisensäure	Merck
Ammoniak konzentriert	Grünwald
Anisaldehyd	Merck
Dimethylsulfoxid	Merck
Eisessig	Merck
Essigsäureanhydrid	Merck
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
o-Phosphorsäure 85 %	Merck
Pyridin	Merck
Salzsäure 36 %	Merck
Schwefelsäure 95 %	Merck
Trifluoressigsäure	Merck
Vanillin	Merck

Verwendet wurden ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades p.a..

### **2.1.3.2 Chemikalien zur Herstellung der Kulturmedien**

Agar-Agar	Galke
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser	Gewonnen aus einer NANOPURE ®-Anlage von Barnsted
Glukose-Monohydrat	Caelo
Malz-Extrakt	Merck
Pepton	BD
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Weizen-Extrakt	Sigma-Aldrich

### **2.1.3.3 Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten**

Agarose	Biozym
Qiagen Gelextraction-Kit	Qiagen
SBYR Safe	Invitrogen
TBE-Puffer	Merck
Zymo Research DNA Isolation -Kit	Zymo Research

### **2.1.4 Chromatographie**

#### **2.1.4.1 Stationäre Phasen für die Chromatographie**

Dünnschichtchromatographieplatten Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0,2 mm	Merck
Kieselgel, Porengröße 0,04 mm – 0,063 mm	Merck
Dünnschichtchromatographieplatten RP-18, F254, Schichtdicke 0,2 mm	Merck
RP-18, Porengröße 0,04 mm - 0,063 mm	Merck
Sephadex LH20	Sigma-Aldrich
Diaion HP20	Mitsubishi-Chemicals

#### **2.1.4.2 Sprühreagenzien**

Die Sprühreagenzien wurden erst zur unmittelbaren Verwendung hergestellt, so dass eine Zersetzung der Chemikalien ausgeschlossen werden konnte. Die DC-Entwicklung mittels Sprühreagenzien wurde eingesetzt um die Trennung nach einer Säulenchromatographie aber auch den Reinheitsgrad von Reinsubstanzen beurteilen zu können. Daneben konnten durch den gezielten Einsatz von Dünnschichtchromatographie Fließmittelsysteme für die Säulenchromatographie entwickelt werden.

#### **Anisaldehyd-Sprühreagenz**

Methanol:	85,0 mL
Eisessig:	10,0 mL
Schwefelsäure 95 %:	5,0 mL
Anisaldehyd:	0,5 mL

#### **Vanillin-Sprühreagenz**

Methanol:	85,0 mL
Schwefelsäure 95 %:	15,0 mL
Vanillin:	1,0 g

## **2.1.5 Lösungsmittel**

### **2.1.5.1 Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie**

Destilliertes Wasser	NANOPURE®-Anlage von Barnsted
Ethanol	Merck
Ethylacetat	Merck
Dichlormethan*	*Bezogen wurden alle diese Lösungsmittel vom Zentralen Chemikalienlager der HHU in technischer Qualität und im Institut durch Destillation weiter aufgereinigt
<i>n</i> -Hexan*	
Methanol*	

### **2.1.5.2 Lösungsmittel für die Säulenchromatographie**

Aceton	Merck
Destilliertes Wasser	NANOPURE®-Anlage von Barnsted
Ethanol	Merck
Toloul	Merck
Ethylacetat	Merck
Dichlormethan*	*Bezogen wurden diese Lösungsmittel vom Zentralen Chemikalienlager der HHU in technischer Qualität und im Institut durch Destillation weiter aufgereinigt
Hexan*	
Methanol*	

### **2.1.5.3 Lösungsmittel für HPLC**

Acetonitril	LiChroSolv HPLC grade Merck
Methanol	LiChroSolv HPLC grade Merck
Wasser	NANOPURE®-Anlage von Barnsted
Ameisensäure konz.	Merck

**2.1.5.4 Lösungsmittel für LC/MS**

Acetonitril	LiChroSolv HPLC grade Merck
Methanol	LiChroSolv HPLC grade Merck
Wasser	NANOPURE®-Anlage von Barnsted
Ameisensäure konz.	Merck

**2.1.5.5 Lösungsmittel für die Polarimetrie**

Aceton	AlfaAesar
Chloroform	AlfaAesar
Ethanol	AlfaAesar
Methanol	AlfaAesar

**2.1.5.6 Lösungsmittel für NMR**

Aceton- $d_6$	Uvasol, Merck
Chloroform- $d$	Uvasol, Merck
DMF- $d_7$	Uvasol, Merck
DMSO- $d_6$	Uvasol, Merck
Methanol- $d_4$	Uvasol, Merck
Pyridin- $d_5$	Uvasol, Merck

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung von endophytischen Pilzen aus pflanzlichem Material**

Das Pflanzenmaterial, befördert in einer Kühlkette bis in das Labo, wurde zunächst unter einer Sterilbank oberflächendesinfiziert. Dafür wurde das Material in eine 70 %ige ethanolische Lösung eingelegt und dort für ein bis zwei Minuten belassen. Die Dauer wurde in Abhängigkeit der morphologischen Ausprägung des Pflanzenmaterials gewählt: xeromorphe Pflanzen wurden länger desinfiziert als Hygrophyten, da eine zu lange Desinfektionszeit zum Abtöten der Endophyten geführt hätte. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Desinfizierung wurde das Pflanzenorgan bzw. die gesamte Pflanze auf eine Agarplatte aufgelegt. Diese wurde unmittelbar verschlossen und nach sieben Tagen auf eine Kontaminierung hin untersucht.

Die Pflanzenorgane bzw. die gesamte Pflanze wurde anschließend in einer sterilisierten Petrieschale in kleine Stücke zerschnitten. Die Pflanzenstücke wurden dann auf antibiotikahaltige Agarplatten aufgebracht, so dass die Schnittstellen in unmittelbarem Kontakt zum Agar standen. Der unmittelbare Kontakt ist wichtig, um ein optimales Herauswachsen der Pilze zu ermöglichen.

Es erfolgte eine tägliche Sichtprüfung um die herauswachsenden Hyphen zu erkennen und sofort mittels eines Verdünnungsausstrichs auf neue Agarplatten zu übertragen. Alle Platten wurden gemeinsam mit einer Kontrolle angefertigt um eine Kontamination auszuschließen. Reinkulturen wurden durch wiederholtes Ausstreichen gewonnen (s. Abb. 2.1).

### **2.2.2 Kultivierung der endophytischen Pilze**

#### **2.2.2.1 Kultivierung der endophytischen Pilze für die unmittelbare Verwendung**

Pilze wurden zur unmittelbaren Verwendung auf MA-Platten mit einer Größe von 70 mm kultiviert. Sobald die Platte nahezu vollständig bewachsen war, wurde diese für eine maximale Dauer von sechs Monaten in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert. War eine unmittelbare Wiederverwendung nötig, wurde eine frische Kopie dieser Platte angefertigt. Im Falle einer dauerhaften Lagerung wurde nach 2.2.2.2 verfahren.

#### **2.2.2.2 Kultivierung zur dauerhaften Aufbewahrung von endophytischen Pilzen**

Pilzekulturen zur dauerhaften Aufbewahrung wurden nach einem kürzlich beschriebenen Verfahren angelegt (Kitamoto, *et al.*, 2002). Anstelle des dort beschriebenen Mediums wurde Wickerham-Medium verwendet. In diesem wurden die Pilze für zwei bis drei Tage kultiviert, anschließend mit 10 % Glycerol versetzt, in Kryotubes überführt und bei -86 °C tiefgefroren. Zur Kontrolle, ob die Pilze erneut angezogen werden können, wurden die Proben nach zwei Wochen aufgetaut und auf MA-Platten ausgestrichen. Plattendoppel erfolgreich konservierter Proben wurden anschließend vernichtet.

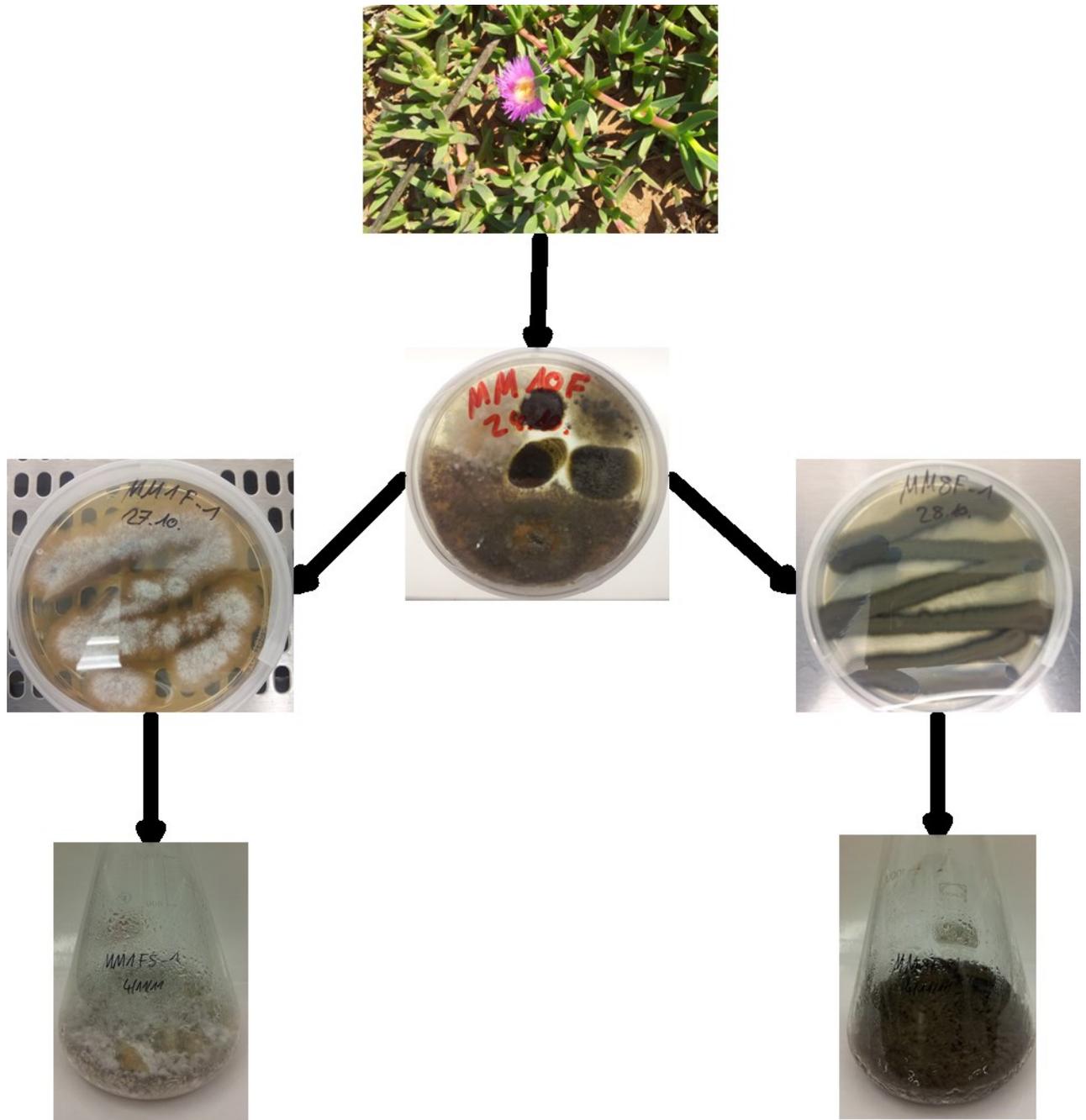
Eine weitere Möglichkeit für die dauerhafte Lagerung der Pilze besteht in der Verwendung des unter 2.1.2.2 beschriebenen Mediums. Der Pilz wird auf dem Medium herangezogen bis ungefähr

3 bis 4 cm<sup>2</sup> bewachsen sind. Anschließend wird der Pilz mit autoklavierten Strohhalmen mit einem Durchmesser von 4 mm ausgestochen. Der Strohalm wird ungefähr einen Zentimeter hoch mit Pilzmaterial befüllt und anschließend abgeschnitten. Das Strohalmstück wird in ein Kryoröhrchen überführt und eingefroren. Die Kontrolle erfolgte analog nach dem oben beschriebenen Verfahren.

### **2.2.2.3 Kultivierung von Pilzen zur Durchführung von Screenings und Isolierung von Sekundärmetaboliten**

Zur Kultivierung von Pilzen wurden grundsätzlich 1000 mL Erlenmeyerkolben verwendet, welche mit denen unter 2.1.2 beschriebenen Medien befüllt wurden. Die Kolben wurden nach dem Animpfen bei 21 °C solange kultiviert, bis das Medium vollständig mit Myzelium durch- und überwuchert war.

Im Falle eines Screenings wurde eine sogenannte small-scale-Kultivierung durchgeführt bei der lediglich ein Kolben pro Pilz verwendet wurde. Zur Isolierung und Identifizierung von Sekundärmetaboliten wurde eine large-scale-Kultivierung in 10 bis 30 Kolben durchgeführt. Die Anzahl der Kolben richtete sich nach der Ergiebigkeit der small-scale-Kultivierung.



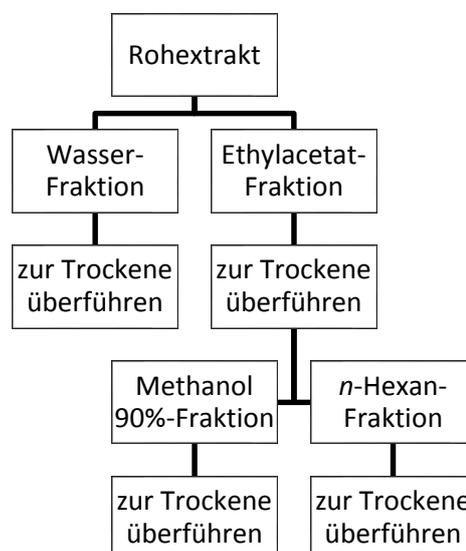
**Abb. 2.1:** Schema der Isolierung von Endophyten aus pflanzlichem Material bis hin zur Reinkultur.

## 2.2.3 Extraktion der Kulturen

### 2.2.3.1 Extraktion der Pilzkulturen

Die Rohextrakte wurden durch Überschichten der Pilzkulturen mit 400 mL Ethylacetat gewonnen. Es folgte eine Inkubation für 8 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Medien mit Hilfe von Spatel und Messer zerkleinert. Die Extraktion der Kolben erfolgte durch schütteln mit 150 rpm auf einer Schüttelplatte für 24 h. Das Ethylacetat wurde mit Hilfe einer Nutsche und Filterpapier von den festen Bestandteilen getrennt. Der Rückstand wurde zwei weitere Male mit diesem Verfahren extrahiert.

Die gewonnene Ethylacetatfraktion wurde anschließend durch Ausschütteln mit Wasser weiter aufgereinigt. Beide Fraktionen wurden danach getrocknet. Der Ethylacetat-Rückstand wurde durch eine weitere flüssig/flüssig Aufarbeitung mit 90 %igen wässrigen Methanol und *n*-Hexan weiter getrennt. Das Extraktionsverfahren ist im Flussdiagramm dargestellt (s.Abb. 2.2)



**Abb. 2.2:** Schema der flüssig/flüssig Verteilung des Rohextraktes.

### 2.2.4 Flüssig/Flüssig Extraktion

Die flüssig/flüssig Extraktion ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Substanzgemische nach ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften zu trennen. Die zu trennenden Substanzen müssen dazu in Lösung vorliegen. Dabei wird ausgenutzt, dass unter der Verwendung zweier nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten unterschiedlicher Polarität, die Substanzen sich in der Phase anreichern, in der sie am besten löslich sind. Die Verteilung einer Substanz kann durch den Verteilungskoeffizienten [K] angegeben werden:

$$K = \frac{[\text{Konzentration Substanz obere Phase}]}{[\text{Konzentration Substanz untere Phase}]}$$

Die Voraussetzungen für dieses Verfahren sind die Nicht-Mischbarkeit der beiden Phasen, die Inertheit gegenüber den Analyten und nach Möglichkeit ein niedriger Siedepunkt damit die Lösungsmittel anschließend einfach wieder entfernt werden können.

Während dieser Studie wurde dieses Verfahren routinemäßig angewandt, um in einem ersten Schritt - durch eine Wasser-Ethylacetat Extraktion - störende polare Komponenten wie z.B. Salze und Zucker und im zweiten Schritt durch die Methanol-*n*-Hexan Extraktion Fette und andere lipophile Stoffe von semipolaren Substanzen abzutrennen.

## **2.2.5 Identifizierung und Taxonomie der endophytischen Pilze**

### **2.2.5.1 Identifizierung der endophytischen Pilze**

Zur Identifizierung der endophytischen Pilze erfolgte eine Amplifizierung und Sequenzierung der ITS Region (internal transcribed spacer) nach Protokoll. Die Amplifizierung mittels PCR wurde in unserem Institut durchgeführt, die Sequenzierung erfolgte durch das BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum der HHU) bzw. durch die Firma GATC nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger. Die Auswertung der Basensequenz erfolgte mittels BioEdit und NCBI BLAST-Vergleich.

#### **DNA Isolierung**

Die DNA wurde mittels unterschiedlicher Kits der Firma Hiss Diagnostics isoliert und aufgereinigt. Es handelte sich um die Kits „Zymoclean“ und „ZR Fungal Bacterial DNA MiniPrep“. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte gemäß Hertsellerprotokoll.

#### **DNA Amplifizierung**

Die isolierte DNA wurde mittels einer Polymerase Kettenreaktion Reaktion (PCR) amplifiziert.

Die Primer ITS1 (Basensequenz: TCCGTAGGTGAACCTGCGG) und ITS4 (Basensequenz: TCCTCCGCTTATTGATATGC) wurden mit dem HotStarTaq Mastermix (QIAGEN) und dem DNA Template gemischt. Die Gesamtkonzentration der einzelnen Bestandteile betrug 1 U HotStarTaq, 5 bis 10 ng genomischer DNA und 1  $\mu$ M der beiden Primer ITS1 und ITS4 in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ L. Anschließend erfolgte die PCR mittels folgenden Programms in einem Thermocycler (BIORAD):

1. Initiale Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 min
2. Denaturierung: 1 min bei 95 °C, Anneling: 1 min 56 °C, Extension: 1 min 72 °C (35 Wiederholungen)
3. Finale Extension 10 min 72 °C
4. Kühlen auf 6 °C bis zur Probenentnahme

#### **Aufreinigung der PCR Produkte**

Die PCR Produkte wurden mittels einer Gelelektrophorese aufgereinigt. Hierzu wurde ein 1%iges Agarose-Gel verwendet, welches mittels SYBR-SAFE® (Invitrogen) angefärbt wurde. Als Referenz wurde eine 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 75 V für 45 min. durchgeführt. Produkte, die eine Größe von 550 bp hatten, wurden ausgeschnitten und mittels des Gelextraktions Kits „Zymoclean“ (HISS Diagnostics) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Das Kit beruht auf einer Bindung der DNA an Silicamembranen. Im finalen Schritt wurde die DNA mittels eines Elutionspuffers oder sterilem Wasser eluiert. Das Volumen der DNA-Lösung

## ***Material und Methoden***

---

betrug zwischen 10 und 30  $\mu\text{L}$ . Um die Konzentration der DNA zu bestimmen wurde mit 10  $\mu\text{L}$  der Probe eine weitere Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Intensität der Bande wurde mit der Referenzbande der DNA-Leiter mit Hilfe des Programms „GelQuant“ verglichen und die Konzentration durch Dreisatz bestimmt. Die so aufgereinigte DNA wurde anschließend zur Sequenzierung verschickt.

### BLAST-Suche

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden zunächst mit der Software „BioEdit“ auf ihre Vollständigkeit hin überprüft und eventuell auftretende Lesefehler manuell korrigiert. Die komplette Sequenz wurde anschließend mit Hilfe von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mit Sequenzen in GenBank, RefSeq Nucleotides, EMNL, DDBJ und PDB verglichen. Durch die ausgegebene Ergebnisliste und der Prüfung der Alignments konnte in der Regel die Identität des Pilzes durch den Eintrag mit höchster prozentualer Übereinstimmung festgestellt werden.

### 2.2.5.2 Taxonomie

#### *Rhizoctonia* sp.

Der Pilz *Rhizoctonia* sp. wurde aus den frischen Wurzeln von *Mentha asiatica* (Lamiaceae) isoliert. Die Pflanze wurde Mai 2011 in Taschkent, Usbekistan, gesammelt.

#### Taxonomie

Klasse: Agaricomycetes

Unterklasse: incertae sedis

Ordnung: Cantharellales

Familie: *Thanatephorus*

Gattung: *Rhizoctonia* sp. (anamorphe Form von *Thanatephorus cucumeris*)

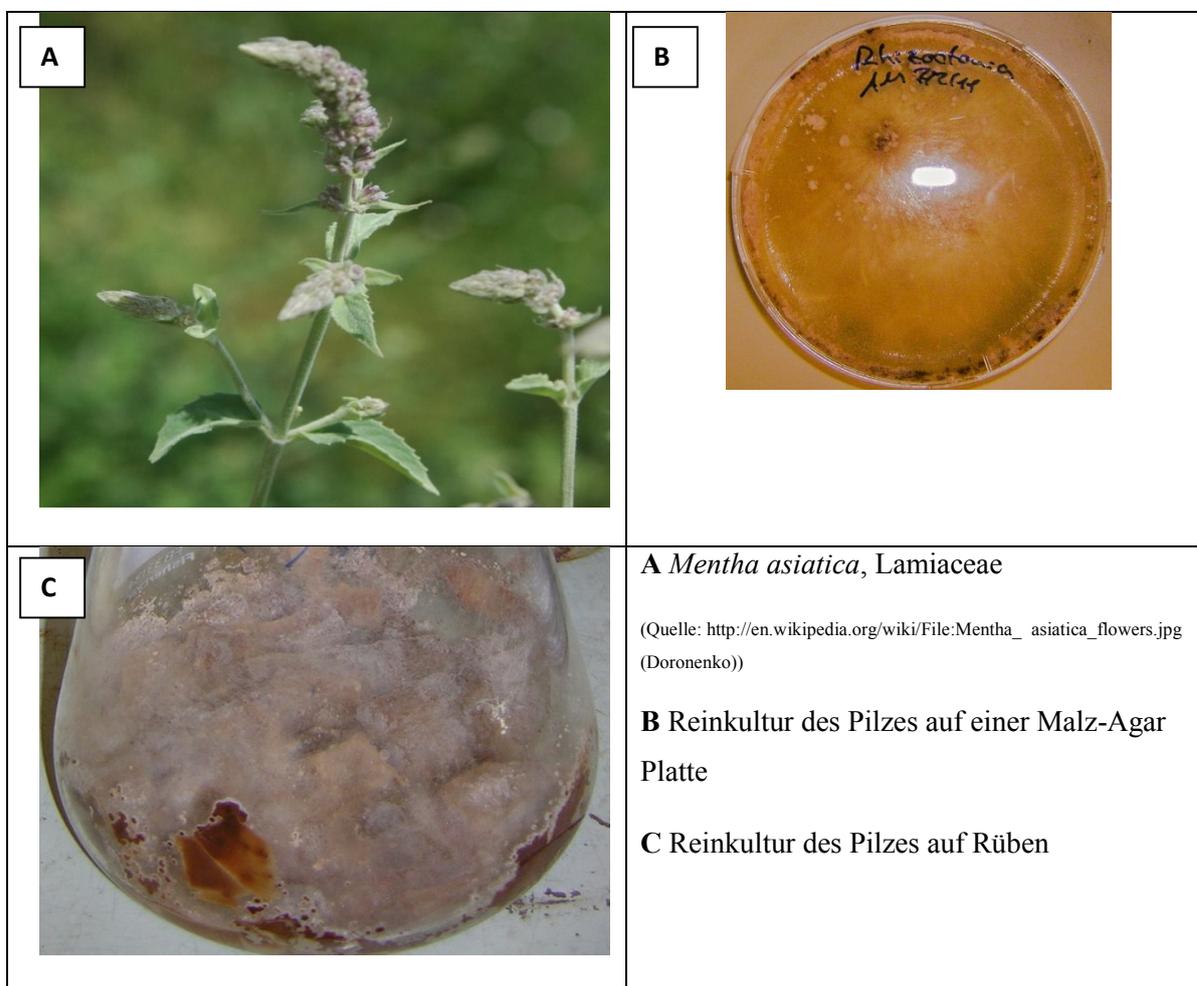


Abb. 2.3: *Rhizoctonia* sp.

## Material und Methoden

### *Pleospora* sp.

Der Pilz *Pleospora* sp. wurde aus den Blüten von *Thymelaea lythroides* (Thymelaeaceae) isoliert. Die Pflanze wurde als Ganzes im Oktober 2011 in Rabat, Marokko, gesammelt.

### Taxonomie

Klasse: Dothideomycetes

Unterklasse: Pleosporomycetidae

Ordnung: Pleosporales

Familie: Pleosporaceae

Gattung: *Stemphylium*

Art: *Pleospora* sp.

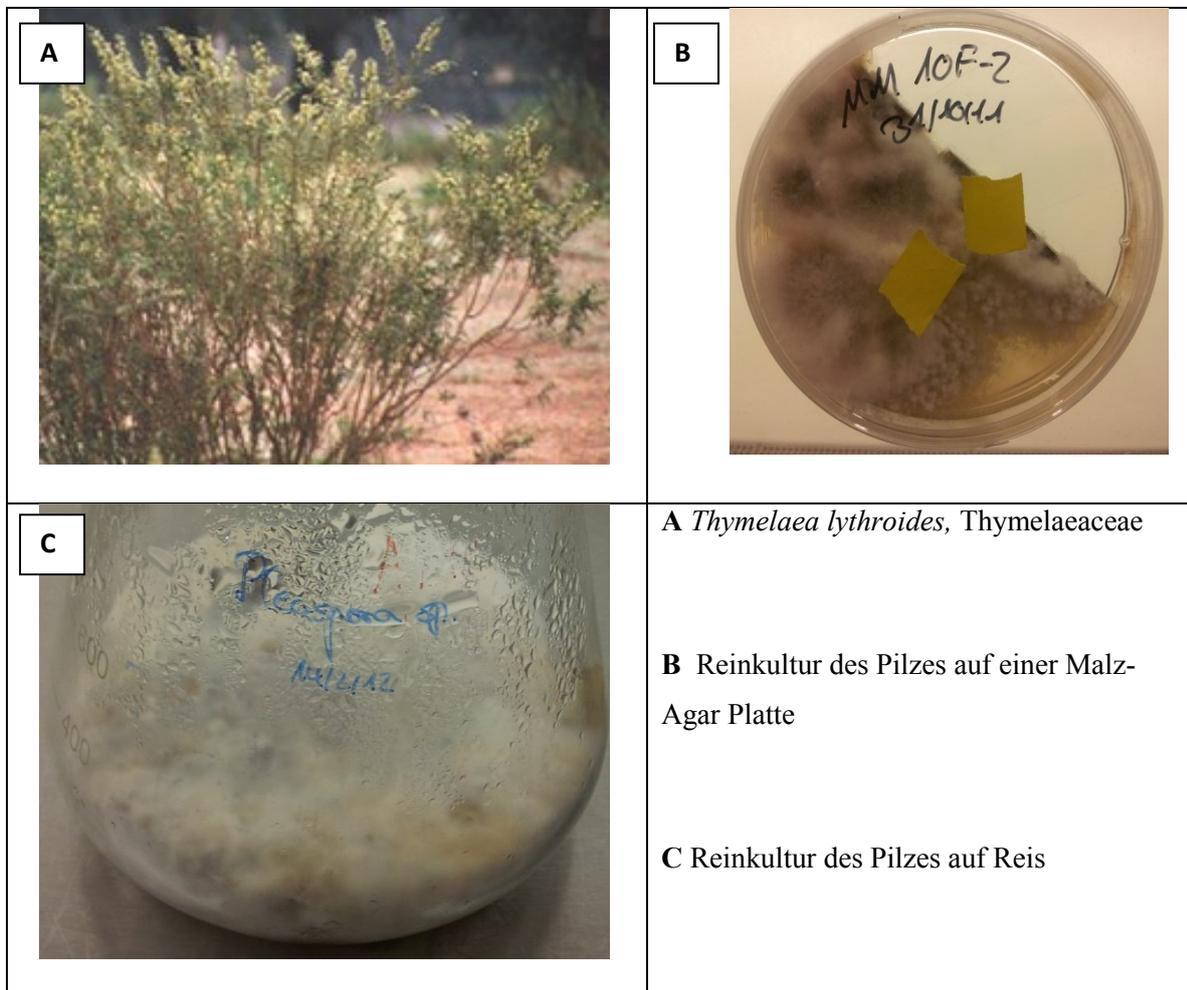


Abb. 2.4: *Pleospora* sp.

***Penicillium glabrum***

Der Pilz *Penicillium glabrum* wurde aus den Blättern von *Carpobrotus rossii* (Aizoaceae) isoliert. Die Pflanze wurde im Oktober 2011 am Wegesrand in Rabat, Marokko, gesammelt.

**Taxonomie**

Klasse: Eurotiomycetes

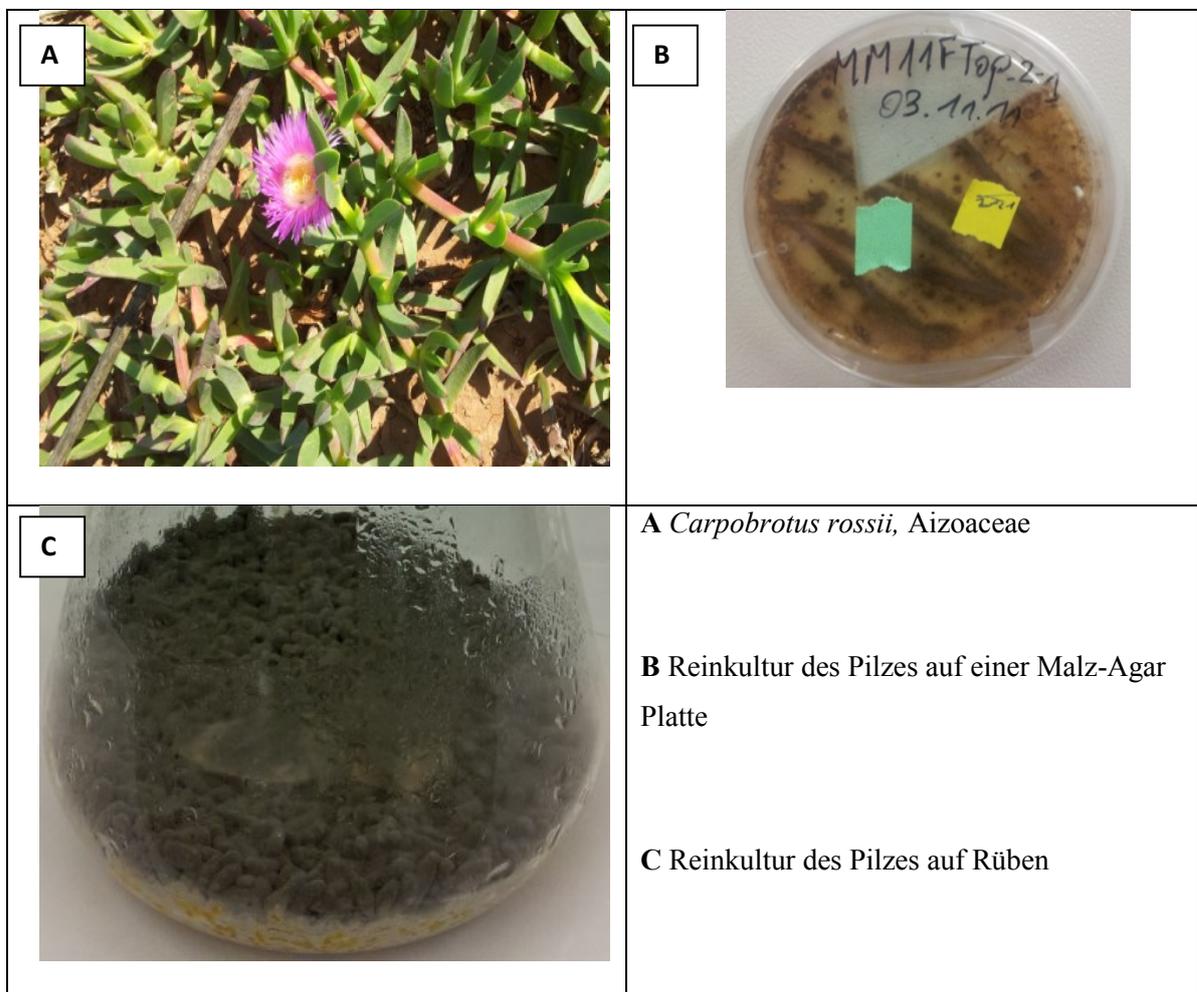
Unterklasse: Eurotiomycetidae

Ordnung: Eurotiales

Familie: Trichocomaceae

Gattung: *Penicillium*

Art: *Penicillium glabrum*



**Abb. 2.5:** *Penicillium glabrum*



***Fusarium lateritium***

Der Pilz *Fusarium lateritium* wurde aus den frischen Blättern von *Bruguiera sexangula* var. *Rhynchopetala* (Rhizophoraceae) isoliert. Die Pflanze wurde Mai 2013 in Hainan, China, gesammelt.

**Taxonomie**

Klasse: Sordariomycetes

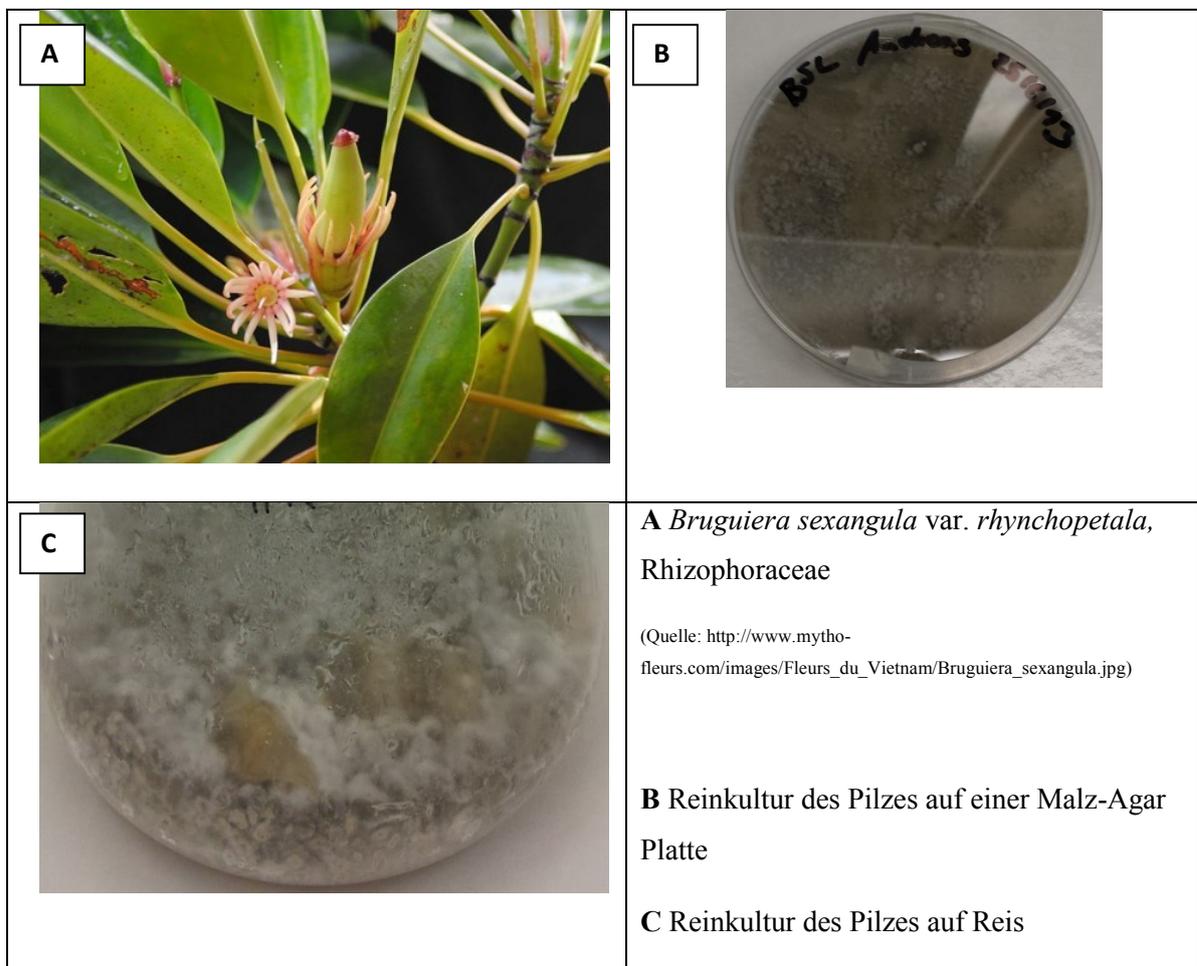
Unterklasse: Hypocreomycetidae

Ordnung: Hypocreales

Familie: Nectriaceae

Gattung: *Fusarium*

Art: *Fusarium lateritium*



**Abb. 2.7:** *Fusarium lateritium*

## 2.2.6 Isolierung der Sekundärmetabolite aus endophytischen Pilzen

### 2.2.6.1 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Rhizoctonia* sp.

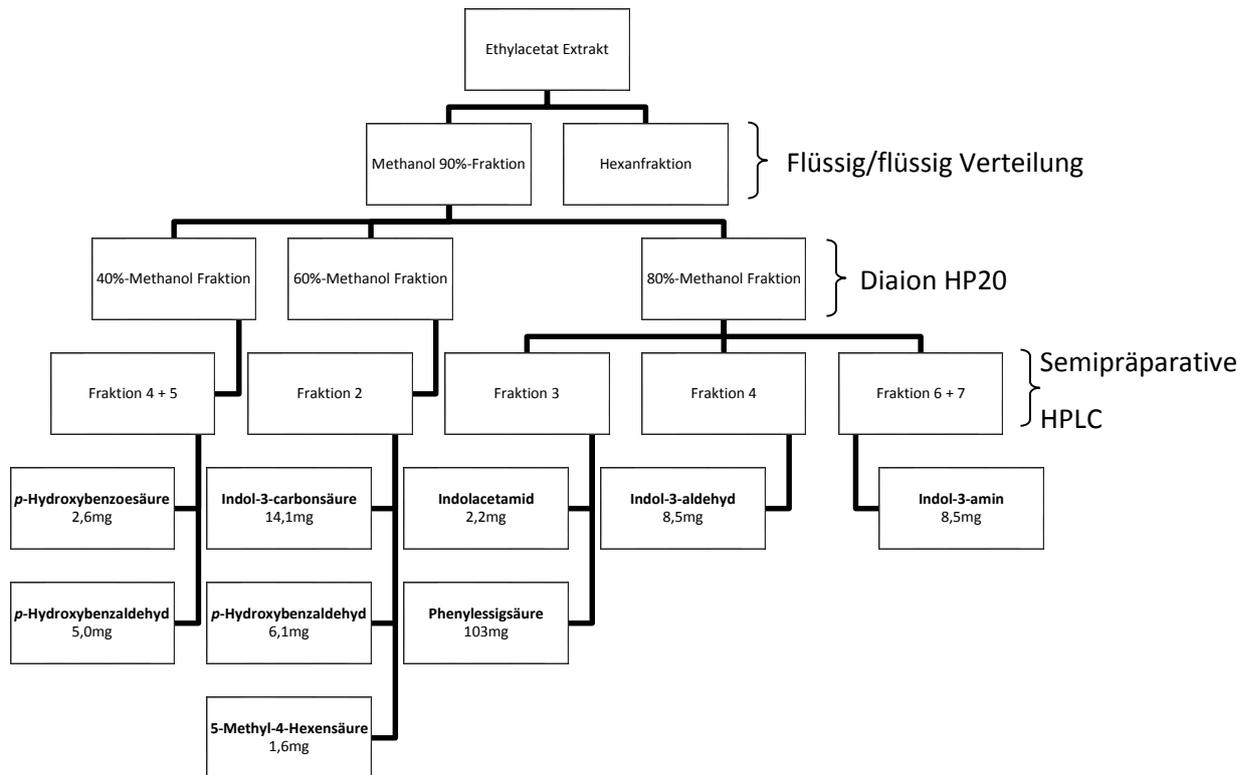


Abb. 2.8: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Rhizoctonia* sp.

2.2.6.2 Isolierung und Modifizierung von Sekundärmetaboliten aus *Pleospora* sp.

2.2.6.2.1 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Pleospora* sp.

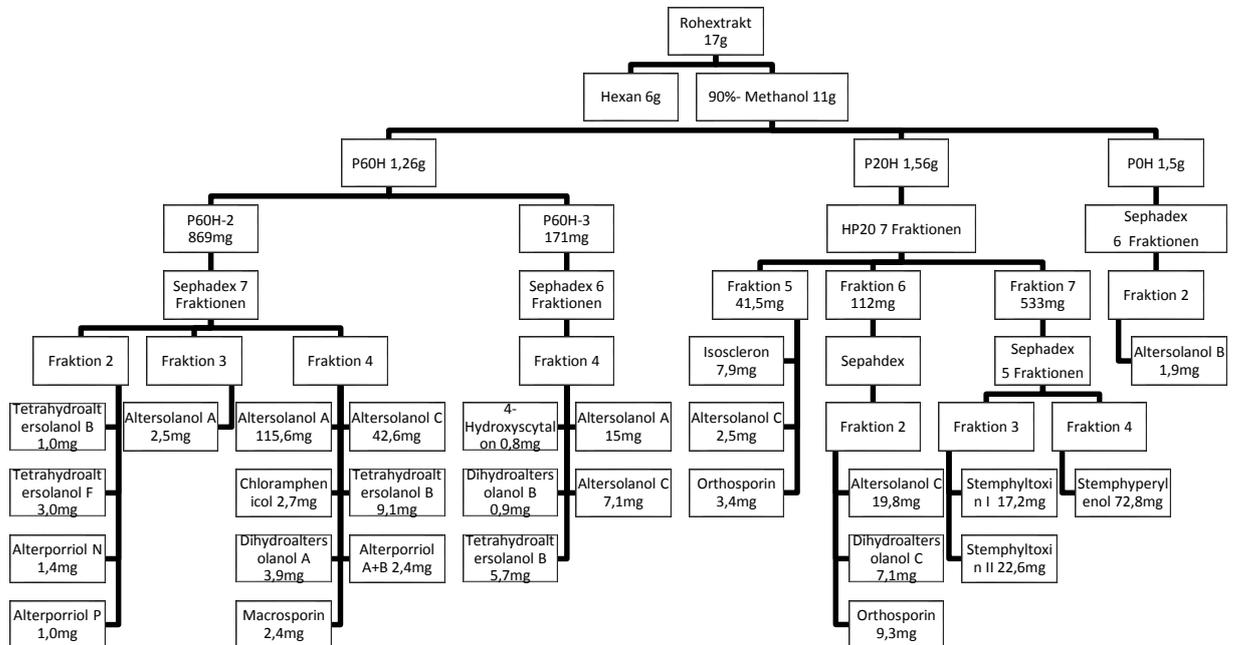


Abb. 2.9a: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Pleospora* sp.

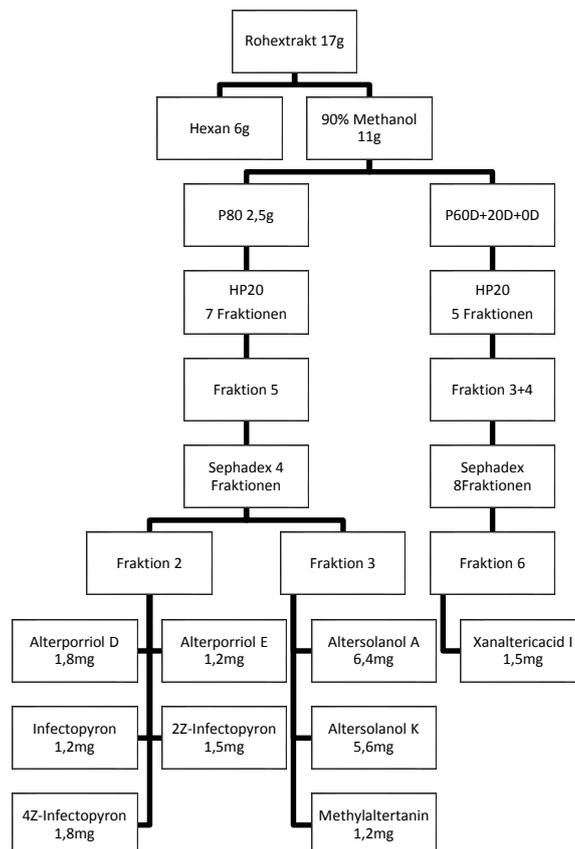
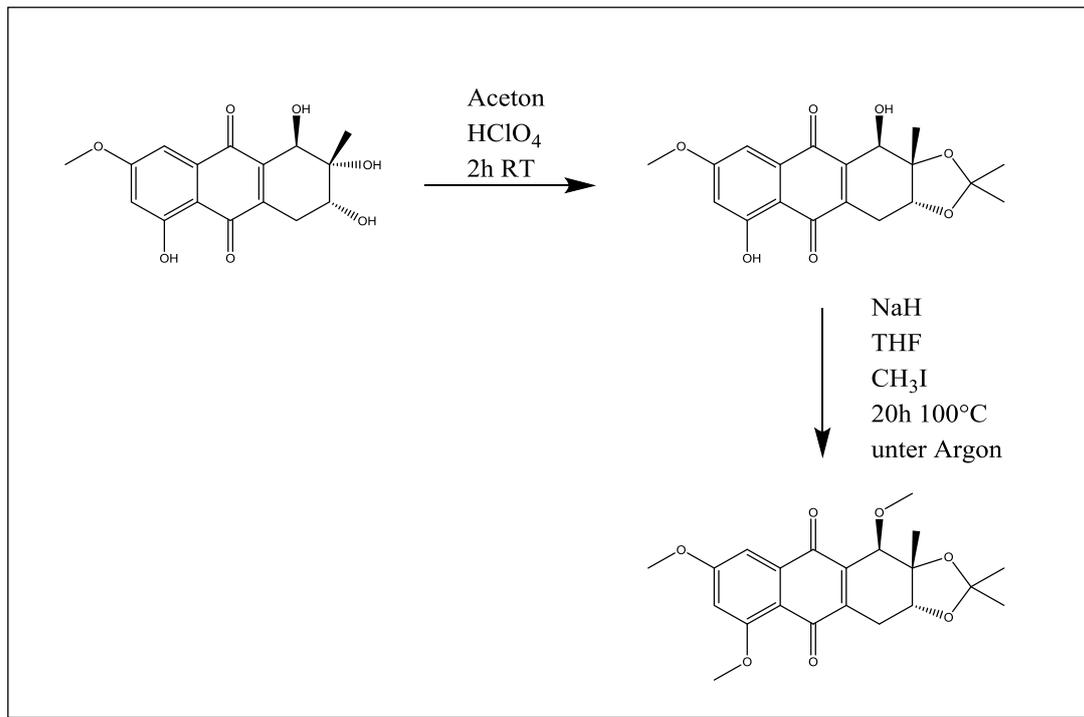


Abb. 2.9b: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Pleospora* sp.

### 2.2.6.2.2 Modifizierung von Sekundärmetaboliten aus *Pleospora* sp.

Um eine Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen den isolierten Naturstoffen aufbauen zu können wurden zwei der isolierten Derivate, Altersolanol A und Altersolanol B, semisynthetisch modifiziert. Hierzu wurde analog zu bekannten Protokollen von Kanamaru *et al.* und Suemitsu *et al.* verfahren (Kanamaru, *et al.*, 2012, Suemitsu, *et al.*, 1989b) (s. Abb. 2.12). 20 mg der zu modifizierenden Substanz wurde in 4,5 mL wasserfreiem Aceton gelöst und mit 45 µL wasserfreier Perchlorsäure versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das resultierende Acetonid wurde in einer Ausbeute von ca. 90 % gewonnen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Zu einer Mischung von 15 mg Natriumhydrid und 0,25 mL Methyljodid in 2,5 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran wurden 10 mg des aufgereinigten Acetonides, gelöst in 2 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran, tropfenweise in einer Argonatmosphäre zugesetzt und das Reaktionsgemisch 20 h unter Rückfluss erhitzt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden anschließend mit einer 0,2 M Natriumhydroxidlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem trocknen der Ethylacetatphase konnte die vollständig *O*-methylierten Verbindungen mittels präparativer HPLC isoliert werden.



**Abb. 2.10:** Schematische Darstellung der semisynthetischen Modifikationen von Altersolanol C.

2.2.6.3 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Penicillium glabrum*

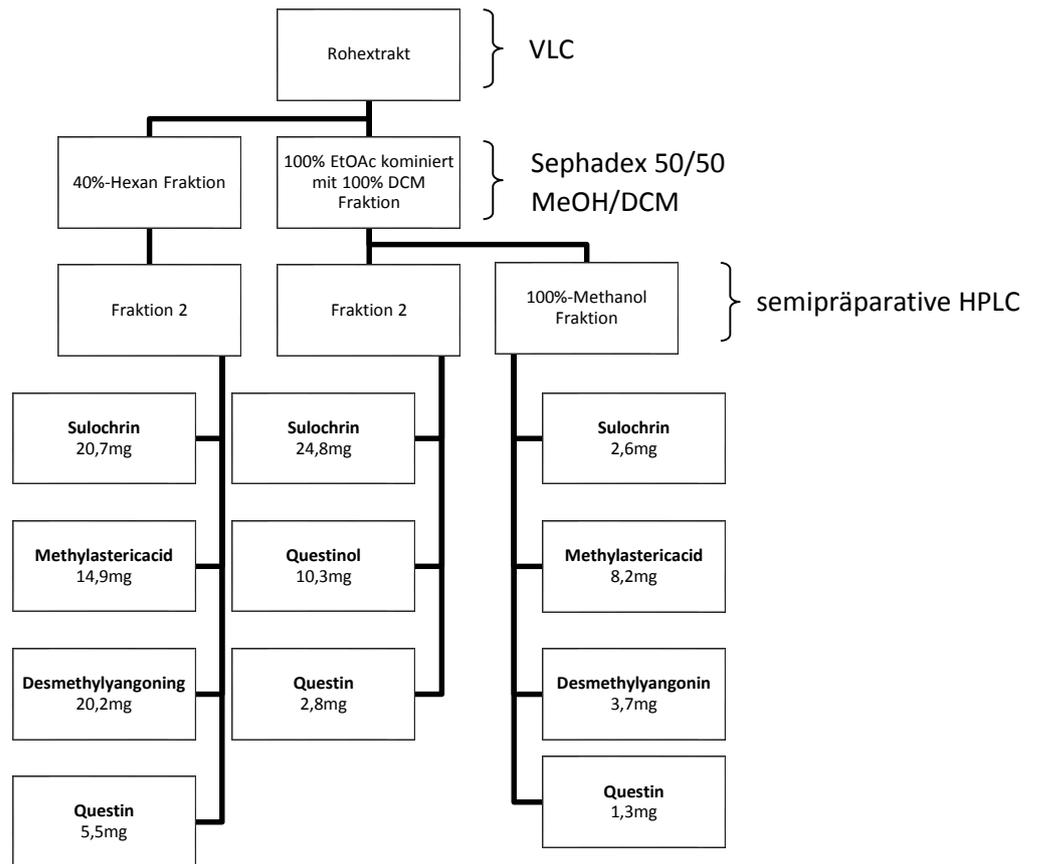


Abb. 2.11: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Penicillium glabrum*.

2.2.6.4 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Nigrospora sphaerica*

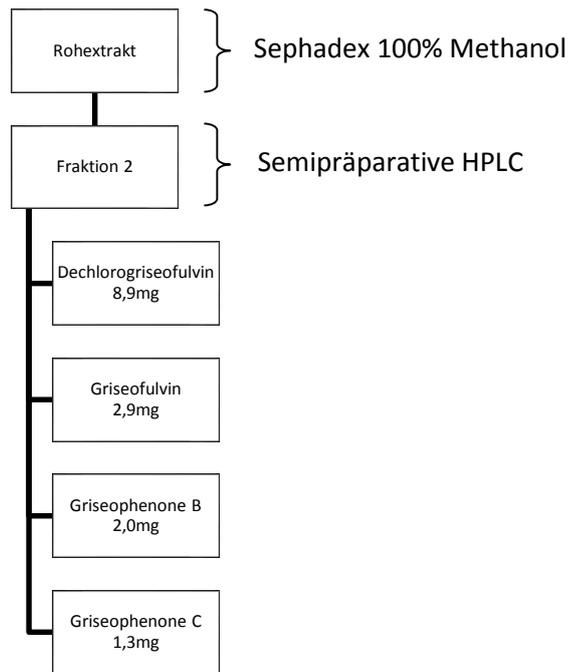


Abb. 2.12: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Nigrospora sphaerica*.

2.2.6.5 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Fusarium lateritium*

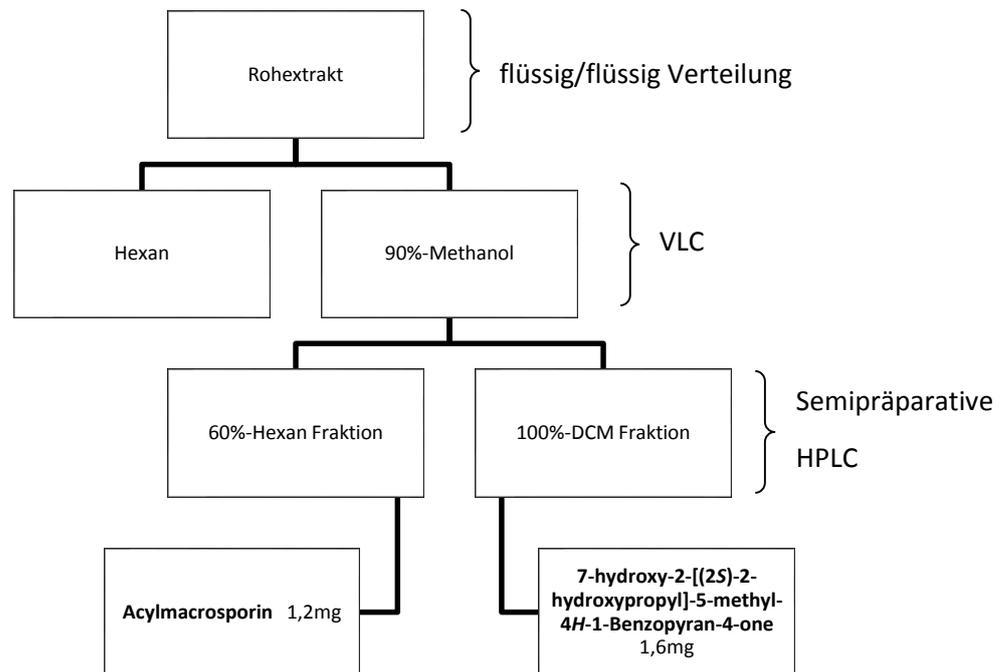


Abb. 2.13: Isolierungsschema der Verbindungen gewonnen aus *Fusarium lateritium*.

## **2.2.7 Chromatographische Methoden**

### **2.2.7.1 Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie stellt ein Verfahren dar, das auf der Verteilung von Substanzen zwischen stationärer und mobiler Phase beruht. Die Substanzen in einem Stoffgemisch werden hierbei durch ihre unterschiedlichen Affinitäten zu diesen Phasen aufgetrennt, was sich in einer unterschiedlichen Fließgeschwindigkeit äußert.

Die Dünnschichtchromatographien wurden auf vorgefertigten Platten durchgeführt (s.2.1.4.1).

Als Fließmittel kamen unterschiedliche Lösungsmittelgemische zum Einsatz, die je nach Polarität der Stoffe ausgewählt wurden.

Für polare Stoffe: EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (30:5:4, 30:6:5 und 30:7:6)

Für semipolare Stoffe: DCM:MeOH (95:5, 90:10, 85:15, 80:20 und 70:30)

DCM:MeOH:EtOAc (90:10:5 und 80:20:10)

Für unpolare Stoffe: *n*-Hexan:EtOAc (95:5, 90:10, 85:15, 80:20 und 70:30)

*n*-Hexan:MeOH (95:5 und 90:10)

Des Weiteren wurden zur Auftrennung polarer Substanzen DCs auch auf RP18 F254 Platten durchgeführt (s. 2.1.4.1). Hierbei wurden folgende Fließmittelsysteme verwendet:

MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10, 80:20, 70:30 und 60:40).

Nach der Auswertung der DC-Platten unter einem UV-Betrachter bei den Wellenlängen von 254 nm und 366 nm, erfolgte die Entwicklung der Platten mit Anisaldehyd- oder Vanilin-Sprühreagenz. Nach dem Besprühen wurden die Platten zur Auswertung auf einer Heizplatte bei 110° C erwärmt bis die Farbentwicklung abgeschlossen war.

### **2.2.7.2 Säulenchromatographie**

#### **2.2.7.2.1 Säulenchromatographie**

Säulenchromatographische Aufarbeitungen wurden in Glassäulen, die an ihrem unteren Ende mit einer Glasfritte der Porengröße 3 und einem Hahn versehen waren, durchgeführt. Dies ermöglichte das Säulenmaterial in der Säule zurückzuhalten und eine optimale

Tropfgeschwindigkeit einzustellen. Verwendet wurden die Materialien Sephadex LH-20 (Größenausschlusschromatographie), RP-18, Kieselgel und Diaion HP-20 (Ionentauscher) (s. 2.1.4.1). Das Säuleneluat wurde im Fall der ersten drei Materialien mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen, welcher in zeitlich individuell definierten Intervallen eine neue Fraktion sammelte. Die Fraktionen der HP-20 Säulen wurden in Rundkolben aufgefangen. Die verwendeten Lösungsmittelgemische wurden anhand des HPLC Profils der analytischen HPLC oder Dünnschichtchromatographie bestimmt.

#### **2.2.7.2.2 Vakuum Flüssigkeitschromatographie - Vacuum Liquid Chromatography**

Die Vakuum Flüssigkeitschromatographie (VLC) ist ein Verfahren, welches als eine initiale Auftrennungsmethode verwendet werden kann um größere Extraktmengen vorzufractionieren. Hierbei wurde eine 50 cm lange Glassäule mit 12 cm Durchmesser verwendet, die am unteren Ende mit einer Glasfritte versehen ist, über einen Normschliff am Auslass verfügte und einen Vakuumananschluss besitzt. Für kleinere Fraktionen wurde eine 25 cm lange Säule mit 5 cm Durchmesser verwendet.

Zunächst wurde mittels Vakuum ein 5 bis 10 cm hoher Kuchen von Silicagel 60 oder RP-18 in die Säule gepackt. Das Material wurde verdichtet und mit *n*-Hexan, bzw. Wasser gewaschen. Die Probe wurde in gelöster Form separat auf eine kleine Menge Silicagel aufgebracht. Nachdem die Probe getrocknet war, wurde sie auf die Säule gegeben. Um während der Auftrennung die Oberfläche der Säule vor Verwirbelungen zu schützen, wurde die Probe mit einer Seesandschicht von 2 cm und einem Glaswollpfropf versehen.

Zum Eluieren der einzelnen Fraktionen wurde im Fall des Kieselgels schrittweise ein elutroper Gradient mit Lösungsmitteln von apolar nach polar erzeugt. Hierbei wurde in der Regel mit *n*-Hexan begonnen, mit Ethylacetat polarisiert und mit Methanol polarisiertem DCM fortgeführt. Im Fall des RP-18 Materials wurde ein Fließmittelgradient von Wasser nach Methanol verwendet.

Nachdem ein Lösungsmittelgemisch durch die Säule gegeben wurde, wurde sie vollständig trocken laufen gelassen. Eventuell verbleibende Rückstände auf dem Säulenmaterial konnten durch den Zusatz von 1% Trifluoressigsäure in Methanol oder DMF von der Säule eluiert werden.

#### **2.2.7.3 Präparative HPLC**

Dieses Verfahren wurde angewendet um Verbindungen aus einer Fraktion zu isolieren und aufzureinigen, welche zuvor in größeren Mengen als Fraktionen einer Säulenchromatographie angefallen waren. Üblicherweise wurde als Lösungsmittelsystem Methanol und Nanopure®-Wasser verwendet, welches gegebenenfalls mit 0,01 oder 0,1 % TFA angesäuert war. Der Gradient der Lösungsmittelkonzentration bzw. die Konzentration der Lösungsmittel in einem isokratischen Gemisch wurde anhand der Retentionszeit und damit der Polarität der Substanzen

## ***Material und Methoden***

---

auf der analytischen HPLC bestimmt. In einer Injektion konnten bis zu 80 mg Probe, in einem totalen Volumen von bis zu 1000  $\mu\text{L}$ , auf die Säule aufgebracht werden. Es erwies sich jedoch als vorteilhaft kleinere Volumen von maximal 400  $\mu\text{L}$  einzusetzen um ein Tailing zu vermeiden. Die Flussrate betrug 20 mL/min. Die Substanzen wurden mittels UV-Detektor detektiert und in Erlenmeyerkolben gesammelt.

Das System wies folgende Spezifikationen auf:

Pumpe	Varian, PrepStar 218
Detektor	Varian, ProStar 320 UV-Vis detector
Software	Varian Star (V. 6)
Säulen	Varian Dynamax (250 $\times$ 4,6 mm und 250 $\times$ 21,4 mm), gefüllt mit Microsorb 60-8 C18 mit integrierter Vorsäule

### **2.2.8.4 Semipräparative HPLC**

Dieses Verfahren wurde angewendet um Verbindungen aus einer Fraktion zu isolieren und aufzureinigen, welche zuvor in kleineren Mengen als Fraktionen einer Säulenchromatographie angefallen waren. Üblicherweise wurde als Lösungsmittelsystem Methanol und Nanopure®-Wasser verwendet, welches gegebenenfalls mit 0,01 oder 0,1 % TFA angesäuert war. Der Gradient der Lösungsmittelkonzentration, bzw. die Konzentration der Lösungsmittel in einem isokratischen Gemisch wurde anhand der Retentionszeit und damit der Polarität der Substanzen auf der analytischen HPLC bestimmt. In einer Injektion konnten bis zu 3 mg der Probe, in einem totalen Volumen von 100  $\mu\text{L}$ , auf die Säule aufgebracht werden. Die Flussrate betrug 5 mL/min. Die Substanzen wurden mittels UV-Detektor detektiert und in Reagenzglasern gesammelt.

Die Systeme wiesen folgende Spezifikationen auf:

Pumpe Merck Hitachi L-7100

Detektor Merck Hitachi UV detector L-7400

Rekorder Kipp & Zonen

Säulen Knauer (300 × 8 mm), gefüllt mit Eurospher  
100-10 C18 mit integrierter Vorsäule

**Oder**

Pumpe LabAlliance Series III

Detektor LabAlliance Model 201

Software CSChrome Plus V3.6

Säulen Grace Alltima (250 mm x 10 mm), gefüllt mit Eurospher 100-10 C18  
mit integrierter Vorsäule

**Oder**

Pumpe Merck Hitachi L-7400

Detektor Merck Hitachi UV detector L-7400

Software Chromstar V6.1

Säulen Knauer (300 × 8 mm), gefüllt mit Eurospher  
100-10 C18 mit integrierter Vorsäule

### **2.2.7.5 Analytische HPLC**

Die analytische HPLC wurde sowohl verwendet um Stoffmuster in Extrakten und Fraktionen zu erkennen, als auch um die Reinheit von isolierten Verbindungen zu bestimmen. Üblicherweise wurde hierzu ein Gradient aus Methanol und mit 0,1 % Ameisensäure angesäuertem Wasser verwendet, der sich wie folgt beschreiben lässt:

## ***Material und Methoden***

---

min	Verhältnis (MeOH:Wasser)
0-5	10:90
5-35	100:0
35-50	100:0
50-60	10:90

Bei Bedarf wurde dieses Programm variiert. Das Injektionsvolumen konnte zwischen 5  $\mu\text{L}$  und 250  $\mu\text{L}$  gewählt werden. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Folgende Komponenten kamen zum Einsatz:

Pumpe	Dionex LPG 3400SD
Detektor	Dionex DAD 3000RS
Autosampler	Dionex ASI-100T
Säulenofen	Dionex STH 585
Reservoir	Dionex Solvent Rack
Software	Chromleon V6.80 SR10
Säule	Knauer (125 $\times$ 4 mm), gefüllt mit Eurosphere 100-5 C18, mit integrierter Vorsäule

Zusätzlich verfügt die analytische HPLC über eine interne Datenbank, welche den Abgleich mit bereits isolierten Substanzen ermöglicht. Hierbei wurden insbesondere die UV-Spektren miteinander verglichen.

### **2.2.8 Strukturaufklärung der isolierten Sekundärmetabolite**

#### **2.2.8.1 Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie stellt ein elementares Werkzeug für die Strukturaufklärung dar. Das grundlegende Prinzip der Massenspektrometrie ist die Erzeugung von Ionen, zumeist im Hochvakuum, die Trennung der Ionen nach dem Masse/Ladungsverhältnis und die anschließende Detektion der Ionen. Die Massenfeinbestimmung kann neben der Ermittlung des Molekulargewichtes ebenfalls zur Berechnung der Summenformel genutzt werden.

Zur Analyse der Ionen ist es immer notwendig die Ionen in die Gasphase zu überführen. Der ursprüngliche Aggregatzustand kann sowohl fest, flüssig als auch gasförmig sein.

### **2.2.8.1.1 ESI-MS**

Als standardmäßiges Verfahren der Massenspektrometrie wurde die ESI-MS in unserem Institut verwendet. Das Prinzip weicht gegenüber den anderen Verfahren dadurch ab, dass die Ionisierung bei Atmosphärendruck erfolgt. Die Ionen werden durch eine Wechsellspannung von 2 bis 5 kV von einer Sprühnadel in eine Heizkapillare beschleunigt. Mittels eines variierenden Magnetfelds im Quadrupol werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die Ionen treffen hinter dem Quadrupol auf einen Sekundärionenvervielfältiger, wodurch das Signal kaskadenartig verstärkt wird. Das verstärkte Signal wird von einem Datenverarbeitungssystem in ein MS-Spektrum umgerechnet. Das System zeichnet sich durch einen breiten Polaritäts- und Massenbereich aus und bietet auch die Möglichkeit Ionen hoher Massen zu detektieren. Die Injektionsmenge lag standardmäßig bei 5 µL Analytenlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL, bei einem totalen Fluss von 0,25 mL/min.

Verwendet wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Quadrupol-Iontrap LCQ Deca Massenspektrometer der Firma ThermoFisher in Kombination mit der Datenverarbeitungssoftware Xcalibur 6.0.

### **2.2.8.1.2 LCMS**

Die LCMS stellt eine Kopplung einer HPLC mit einem ESI oder APCI Massenspektrometer dar. Hierdurch können komplexe Substanzgemische aufgetrennt und die einzelnen Molekulargewichte analysiert werden. Hierdurch können Extrakte und Fraktionen bereits frühzeitig charakterisiert werden. Diese Methode wurde eingesetzt um neben der Ermittlung von Molekulargewichten aus Mischungen auch die Reinheit von isolierten Substanzen beurteilen zu können. Verwendet wurde eine Kopplung von HPLC und ESI-MS. Der Fließmittelgradient wurde analog 2.2.7.5 verwendet um eine Vergleichbarkeit zwischen analytischer HPLC und LCMS zu gewährleisten. Als HPLC Komponenten kamen zum Einsatz:

Pumpe	Agilent HP1100series
Detektor	Agilent HP1100series
Autosampler	Agilent HP1100series
Degaser	Agilent HP1050series
Reservoir	Agilent HP1100series
Software	Xcalibur V6.0
Säule	Knauer (100 × 2,5 mm), gefüllt mit Eurospher 100-3 C18 mit integrierter Vorsäule

### **2.2.8.1.3 EI-MS**

Die EI-MS stellt insbesondere für niedermolekulare und polare Substanzen eine gute alternative Methode zur ESI dar. In diesem Fall wird die Probe durch den Beschuss von Elektronen im Hochvakuum ionisiert. Die Elektronen werden durch das Beheizen einer Glühkathode, welche im rechten Winkel zur Probe angeordnet ist, erzeugt und durch die Probe auf eine Kollektoranode geleitet. Die auf die Probe auftreffenden Elektronen führen in der Regel zu einer Elektronenaufnahme oder deren Abgabe. Das Ionisierungspotential bei dieser Methode liegt zwischen 8 und 15 eV. Dieses Verfahren kann besonders gut zur Strukturaufklärung genutzt werden, da sich nach strikten Regeln Fragmente bilden. Als wichtigste Reaktionen, welche in der Gasphase stattfinden, sind die McLafferty-Umlagerung und die alpha-Spaltung zu nennen. Durch diese Fragmentierung weisen alle Substanzen ein charakteristisches Fragmentationsmuster auf, welches mit Datenbanken abgeglichen werden kann.

Verwendet wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Triple-Quadrupol TSQ700 Finnigan MAT. Die Messungen wurden von Ralf Bürgel von der Abteilung Massenspektrometrie der Anorganischen und Organischen Chemie an der Heinrich-Heine Universität durchgeführt.

### **2.2.8.1.4 MALDI-TOF**

In der MALDI Massenspektrometrie können insbesondere Moleküle hoher Masse analysiert werden. Bei diesem Verfahren wird eine Lösung der Probe mit einer Lösung einer Matrix, die in der Regel aus Benzoesäurederivaten besteht, vermischt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels entsteht eine polykristalline Schicht, welche mit einem gepulsten Stickstofflaser (337 nm, 1 ns) beschossen wird. Das Prinzip der Ionisierung ist bis heute noch nicht völlig verstanden, man geht jedoch davon aus, dass die Energie des Lasers über die Matrix an die Probe weitergegeben wird. Bei diesem Verfahren gehen alle Ionen unter der Bildung von Quasimolekülonen gleichzeitig in die Gasphase über (Desorption). Die Trennung der Ionen erfolgt durch einen „Time of Flight“ (TOF) Analysator. Hierbei werden leichte Ionen schneller beschleunigt als schwere und treffen somit früher auf den Detektor auf.

Verwendet wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bruker UltraFlex I mit einem Auflösungsvermögen von 25.000. Die Messungen wurden von Dr. Peter Tommes von der Abteilung Massenspektrometrie der Anorganischen und Organischen Chemie an der Heinrich-Heine Universität durchgeführt.

### **2.2.8.1.5 HR-MS**

Die hochauflösende Massenspektrometrie, auch als Massenfeinbestimmung bekannt, ist ein Verfahren, welches eingesetzt wird um Massen so hoch aufzulösen, dass Substanzen einwandfrei identifiziert und deren Summenformel ermittelt werden kann. Die hohe Auflösung wird durch unterschiedliche Systeme ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden TOF-Systeme verwendet.

Die Messungen wurden auf einem Micromass QTOF II am Helmholtz Institut für Infektionserkrankung in Braunschweig, oder auf einem Bruker Daltonics maXis g4 in der Abteilung für Massenspektrometrie der Anorganischen und Organischen Chemie an der Heinrich-Heine Universität von Herrn Dr. Peter Tommes durchgeführt.

### **2.2.8.2 Kernspinresonanzspektroskopie - Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)**

Kernspinresonanz ist ein physikalischer Effekt der auftritt, wenn Atome in einem statischen magnetischen Feld befindlich einem zweiten oszillierenden Magnetfeld ausgesetzt sind. Hierbei richten sich die Kerne im magnetischen Feld aus und werden von außen durch ein senkrecht dazu angelegtes Feld, in der Regel ein Radiowellenfeld, bestrahlt. Kerne welche über eine ungerade Spinzahl verfügen, z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , oder  $^{15}\text{N}$ , nehmen die elektromagnetische Energie auf und ändern ihre Orientierung im elektromagnetischen Feld. Kurze Zeit nach Beendigung des Energieeintrags nehmen die Kerne ihre ursprüngliche Orientierung im Hauptmagnetfeld wieder ein und geben die aufgenommene Energie wieder frei. Diese freigesetzte Energie (FID = freier Induktionsabfall) wird durch außenliegende Spulen in Form einer induktiven Energie detektiert. Die aufgenommenen Signale werden mittels einer Fouriertransformation von einer zeitabhängigen Darstellung in eine frequenzabhängige Darstellung umgerechnet. Da der Resonanzfall der einzelnen Kerne immer von ihrer chemischen Umgebung abhängig ist, lassen sich durch diese Methode Erkenntnisse über die Umgebung der einzelnen Kerne erhalten. Dieses macht die Kernresonanzspektroskopie zu einem Verfahren, welches im Bereich moderner chemischer und biologischer Analytik unverzichtbar geworden ist.

NMR Spektren wurden in der Abteilung für Anorganische und Strukturchemie an der Heinrich-Heine Universität von Herrn Behm und Herrn Dr. Amadeo vermessen bzw. am Helmholtz Institut für Infektionserkrankung in Braunschweig durch Frau C. Karkoschke und Herrn Dr. V. Wray.

### **2.2.8.3 Optische Aktivität**

Optische Aktivität zeigen Verbindungen, welche über mindestens ein chirales Zentrum verfügen. Diese Verbindungen vermögen linear polarisiertes Licht in seiner Ebene zu drehen. Der mit Hilfe eines Polarimeters (Jasco P-2000) gemessene Wert bezeichnet man auch als Drehwert. Dieser wird bei einer Wellenlänge von 546 nm und 589 nm unter Verwendung einer Natriumdampflampe bestimmt. Weitere Einflussfaktoren, welche den Drehwert verändern können sind Temperatur, Schichtdicke der Küvette, pH-Wert und Lösungsmittel. Entsprechend der Abweichung der Drehrichtung gegenüber der Leerprobe wird der gemessene Wert mit „+“ oder „-“ gekennzeichnet. Die spezifische optische Rotation berechnet sich wie folgt:

$$[\alpha]_D^T = \frac{[\alpha]_{583} * 3.199}{4.199 - \frac{[\alpha]_{583}}{[\alpha]_{546}}}$$

T = Temperatur

D = Schichtdicke

Die optische Rotation bei der entsprechenden Wellenlänge berechnet sich wie folgt:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{100 a}{l \cdot c}$$

Wobei  $a$  = gemessener Winkel der Rotation

$l$  = Schichtdicke der Küvette

$c$  = Konzentration der Lösung in  $\text{g/L}^{-1}$

### **2.2.9 Testung der biologischen Aktivität**

#### **2.2.9.1 Antibakterielle Testungen**

Die antibakteriellen Testungen wurden durch zwei Kooperationspartner durchgeführt. Zum einen durch das Unternehmen SeaLife Pharma aus Tulln (Österreich), zum anderen durch den AK Brötz Oesterhelt vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Das Unternehmen SeaLife Pharma führte direkt eine Verdünnungsreihe der Substanzen durch und testete gegen gängige grampositive und gramnegative Problemkeime. Die 1:2 Verdünnungsreihen starteten mit  $125 \mu\text{g/mL}$ . Die kleinste Konzentration bei der kein Wachstum mehr mit bloßem Auge detektierbar war, wurde als MHK (minimale Hemmkonzentration) bestimmt. Zusätzlich wurde die  $\text{OD}_{600}$  mittels Tecan Reader gemessen, um das Wachstum zu kontrollieren.

Der AK Brötz Oesterhelt führte zunächst einen Agardiffusionstest durch, in dem eine mit  $128 \mu\text{g}$  besetzte Filterscheibe auf den zuvor mit Bakteriensuspension überschichteten Agar aufgelegt wurde. Besitzt eine Substanz ein antibiotisches Potential, so kann durch diese Methode ein Hemmhof detektiert werden in dem kein Bakterienwachstum stattfindet. Die Probe wurde zuvor in ca.  $20 \mu\text{L}$  Methanol gelöst und auf den Filter aufgetragen und zwei Tage getrocknet. Fiel der Agardiffusionstest positiv aus, wurde analog dem Verfahren von SeaLife Pharma eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt und so die MHK bestimmt. Die Verdünnungsreihen starteten bei einer Konzentration von  $64 \mu\text{g/mL}$ .

Die MHK wurde nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI M7-A8, 2008) durch die „broth microdilution method“ bestimmt. Für die Herstellung des Inokulums eines Bakterienstammes wurde die „direct colony suspension method“ verwendet. Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um Vertreter antibiotikaempfindlicher CLSI Qualitätskontrollstämme, Standard-Labor-Stämme, High-Level-Chinolon-resistenter Laborstämme und (multi-) resistenter, klinisch relevanter Keime von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*.

Die Stämme wurden für 18 - 24 h bei 37 °C auf Mueller-Hinton-Agar und Streptokokken-Arten (5 % CO<sub>2</sub>) auf Columbia-Blutagar kultiviert. 3 - 5 morphologisch ähnliche Kolonien wurden in 0,9 % NaCl-Lösung und Streptokokkenarten in Mueller-Hinton-Medium (supplementiert mit 5% lysiertem Pferdeblut) resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,1 eingestellt. Die Zellzahl wurde anschließend durch Verdünnung in Mueller-Hinton-Medium (bei Streptokokkenarten mit 5% lysiertem Pferdeblut supplementiert) auf 2 x 10<sup>5</sup> KbE / ml eingestellt. 50 µL jeder in Mueller-Hinton-Bouillon hergestellten Probenlösung (64 – 0,04 µg/mL) wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe in einer 96-well-Mikrotiterplatte (Sarstedt) vorbereitet und mit 50 µL der Bakteriensuspension beimpft. Die finale Konzentration der Bakterien von ca. 1 x 10<sup>5</sup> KbE / mL in einem Volumen von 100 µL Mueller-Hinton-Bouillon wurde durch Plattieren einer 1:10 Verdünnungsreihe auf Mueller-Hinton Platten bestätigt. Es wurden folgende Kontrollproben angefertigt: Wachstumskontrolle (nur Bakteriensuspension), Sterilkontrolle (nur Mueller-Hinton-Bouillon) und Probenkontrolle (nur Testsubstanz und Mueller-Hinton-Bouillon um falsch positive Ergebnisse bei Konzentrationsproblemen der Substanz im Medium (Präzipitation) zu vermeiden).

Für die Assayauswertung wurde die MHK für Antibiotika mit bekannten, bakteriellen Targets (Ciprofloxacin (Fluka), Rifampicin (AppliChem), Tetracyclin (Sigma-Aldrich) und Vancomycin (AppliChem)) parallel bestimmt. Die Mikrotiterplatten wurden für 16 - 20 h bei 37 °C an der Luft und im Falle von Streptokokken-Arten in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### **2.2.9.2 Antifungale Tests**

Antifungale Assays wurden ebenfalls durch die SeaLife Pharma analog zu den antibakteriellen Assays durchgeführt.

### **2.2.9.3 Zytotoxische Testungen**

Die zytotoxischen Aktivitäten wurden gegen unterschiedliche humane und nicht humane Zelllinien bestimmt.

Im Fall der nicht humanen Zelllinien wurden die Messungen mit murinen Lymphomzellen (L5178Y) im Arbeitskreis von Prof. W.E.G. Müller am Institut für Physiologische Chemie an der Universität Mainz durchgeführt.

Die L5178Y-Zellen wurden in „Eagle’s Minimal Essential Medium“ unter Zusatz von 10 % Pferdeserum unter Standardbedingungen kultiviert und die Aktivität mittels des MTT-Assay ermittelt. Hierbei wurde photometrisch die reduktive Umsetzung des wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch vitale Zellen mittels der mitochondrialen Dehydrogenase in das violette wasserunlösliche Formazan detektiert.

Dazu wurden je 50 µL der Zellsuspension, die etwa 3750 lebende Zellen enthielt, in eine Vertiefung einer 96-well Microtiterplatte gegeben und mit weiteren 50 µL Medium in der verschiedenen Verdünnungen der vorliegenden Testsubstanz enthalten waren, aufgefüllt. Die Ansätze wurden 72 h lang bei 37 °C unter Zusatz von 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Zugabe von

20 µL der 0,5 % MTT-Lösung wurden die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen mit DMSO lysiert und photometrisch bei 520 nm mittels Mikrotiterplattenmessgerät vermessen.

ED<sub>50</sub> Werte wurden durch Logit-Regression ermittelt.

Die zytotoxische Testung gegen die Zelllinien HCT116, A2780 und K562 wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. M. Kassack an der HHU wie folgt durchgeführt:

Am ersten Tag wurden die Zellen in eine 96-well Platte mit einer Zellzahl von 9.000 (A2780-Zellen), 35.000 (K562-Zellen) und 6.000 (HCT116-Zellen) Zellen pro well in einem Volumen von 100 µL ausgesät. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die adhärenen Zellen mit 90 µL/well neuem Nährmedium versorgt. Im Falle der A2780 und K562-Zellen wurde RPMI Medium mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum sowie den Antibiotika Streptomycin (120 µg/mL) und Penicillin (120 U/mL) verwendet. Die HCT116 wurden mit Ausnahme der Verwendung von DMEM Medium identisch behandelt. Nach dem Medienwechsel wurden die zu untersuchenden Substanzen in DMSO gelöst. Eine Mischung aus Medium und in DMSO gelöster Substanz wurde in einem Volumen von 10 µL den Zellen zugesetzt. Eine Gesamtkonzentration von 1 % DMSO wurde hierbei nicht überschritten und der Effekt auf die Viabilität der Zellen durch eine dreifache Kontrolle überprüft. Die Zellen wurden anschließend unter den zuvor beschriebenen Bedingungen für 72 h inkubiert. Die fertig inkubierten Zellen wurden mit 25 µL MTT Lösung (50 mg/mL in PBS) versetzt und für weitere 10 bis 20 min inkubiert. Das Medium der A2780 und K562-Zellen wurde daraufhin abgesaugt und die Zellen in 75 µL DMSO lysiert. Anschließend erfolgte eine photometrische Vermessung in einem Mikrotiterplattenleser bei 544 nm und 690 nm. Erfasst wurden bei 544 nm sowohl das Formazan, als auch die Zelltrümer, wohingegen bei 690 nm nur Zelltrümer erfasst wurden. Durch die Subtraktion der Absorption bei 690 nm von jener bei 544 nm ergab sich die Absorption des Formazans. Im Falle der K562-Zellen wurde das Medium auf den Zellen belassen und die Zellen durch die Zugabe von 150 µL einer Mischung aus Isopropanol und Salzsäure lysiert. Die Ermittlung der Absorption des Formazans wurde hierbei durch die Subtraktion der Absorptionen bei 690 nm und 595 nm ermittelt.

### **2.2.9.4 Hsp90 Testungen**

Der *in vitro* Progesteron-Rezeptor-Rekonstitutions-Assay ist ein Model, welches zur Identifizierung von Substanzen genutzt wird, welche die Hsp90 Aktivität inhibieren können. Als Quelle für die Chaperone wurde RRL (rabbit reticulocyte lysate) verwendet, welches bereits für das Verständnis des Wirkungsmechanismus von Geldanamycin und verwandten Verbindungen verwendet wurde (Morishima, *et al.*, 2003).

Mit diesem Assay wurde das Vermögen der Chaperone gemessen, den durch Hitze denaturierten Progesteron-Rezeptor in seine hormonbindende Form zurück zu überführen. Die

Hormonbindungsaktivität des Progesteron-Rezeptors reflektiert somit direkt die molekulare Integrität der Chaperone. Daher wurde die wiedergewonnene Hormonbindungsaktivität der Progesteron-Rezeptoren nach Hitzedenaturierung und Inkubation mit den entsprechenden Substanzen getestet.

Für den Progesteron-Rezeptor-Rekonstitutions-Assay wurde der aufgereinigte Progesteron Rezeptor auf PR22-Anikörper A-Sepharose Harz absorbiert und in einen wie kürzlich beschriebenen Komplex eingebracht (Kosano, *et al.*, 1998). 0,05  $\mu\text{M}$  des Progesteron-Rezeptors wurde mit RRL kurz inkubiert und zweifach mit dem Reaktionspuffer verdünnt (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM DTT, 0,02% NP-40, 100 mM KCl and 10 mM ATP). Nach 30 min bei 30 °C wurde 0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-Progesteron (American Radiolabeled Chemicals, Inc #ART 0063) hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend für 3 h bei 4 °C weiter inkubiert. Die fertig inkubierten Proben wurden dreimal mit 1 mL des Reaktionspuffers gewaschen und die Progesteron Bindung unter Verwendung der Flüssigkeitsszintillation (PerkinElmer Microbeta) bewertet.

#### **2.2.9.5 Hemmung der TNF $\alpha$ induzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B**

Die Hemmung der TNF $\alpha$  induzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B wurde durch die Gruppe von Dr. M. Diederich an der Seoul National University durchgeführt. Verwendet wurden K562-Zellen welche vor jedem Experiment mit je 5 mg Luciferase Reportergen (Stratagen, Genomics Agilent, Diegem, Belgien), welches fünf identische Wiederholungen des NF $\kappa$ B Gens enthält, und 5 mg des *Renilla* Luciferase Plasmides (ph-RG-tk, Promega, Leiden, Niederlande) durch Elektroporation transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in RPMI Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/mL verdünnt. Die so behandelten Zellen wurden anschließend zunächst 2 Stunden mit den zu prüfenden Substanzen inkubiert, und anschließend mit 20 ng/mL TNF $\alpha$ . Um die *Renilla* Aktivität zu messen, wurde 75  $\mu\text{L}$  Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Reaktionsgemisch (Promega) für 10 min bei 22 °C mit den Zellen inkubiert. Die Reaktion wurde mit 75  $\mu\text{L}$  Dual-Glo<sup>TM</sup> Stop&Glo<sup>®</sup> (Promega) bei gleichen Versuchsparametern gestoppt. Die Luciferase und *Renilla* Aktivitäten wurden mit einem Orion Mikrotiterplatten-Luminiszenzmessgerät vermessen. Die Aktivitäten werden als Verhältnis der Leuchtkäfer Luciferasenaktivität zur *Renilla* Aktivität angegeben. Die reine Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  wird als 100%ige Aktivierung der NF $\kappa$ B Transkription betrachtet.

Zusätzlich wurde in einem zweiten Experiment die Zellviabilität gemessen. K562-Zellen wurden hierfür in RPMI Medium, welches mit 10 % fetalem Kälberserum supplementiert war, in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz für weitere 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe von Typanblau. Da der anionische Diazofarbstoff ausschließlich von toten, perforierten Zellen aufgenommen wird, welche sich

dadurch dunkelblau anfärben, ist die Färbung der Zellen ein direktes Maß für Viabilität der Zellen. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 600nm.

### **2.2.11 Generelle Laborgeräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Modell</b>
-80° C Gefrierschrank	Forma Scientific	Model 923
Autoclav	H+P	Varioclav
DC-Betrachter	CAMAG	CAMAG
Fraktionssammler	ISCO	RETRIEVER II
Feinwaage	Satorius	R210P (d=0,01mg)
Gefriertrocknung mit Pumpe	Steris/Vacubrand	LYOVAC GT2/RC6
Gelkammer	BIORAD	Sub-Cell GT
Geschirrspüler	Miele Professional	G7883
Grobwaage	Satorium	BL1500 (d=100mg)
Heizplatte	Heidolph	MR Hei-Standard
Kühlschrank	Privileg	De luxe
Mikrowelle	Privileg	8019
NMR-Röhrchen	Norrell	
PCR-Cycler	BIORAD	iCycler
Pipetten	Eppendorf	Research
Reinluftwerkbank	Heraeus	HS15
Rotationsverdampfer	Büchi	R-200
	IKA	RV05
Schüttelplatte	Braun	Certomat
Spannungsgeber	VWR	PowerSource 300V
Stickstoffgenerator	Domnick Hunter	
Telefon	Siemens	Euroset 805

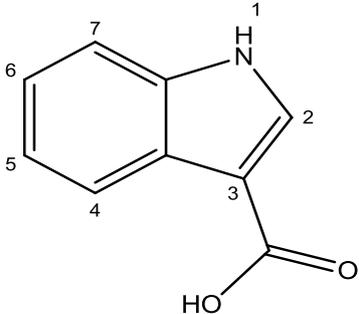
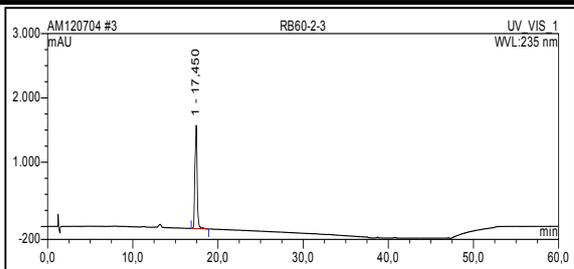
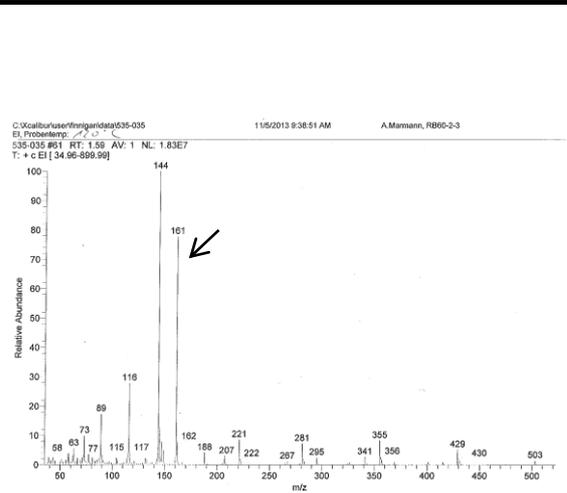
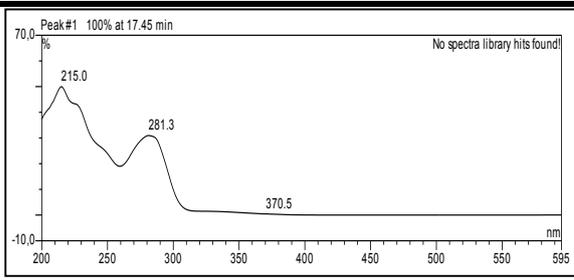
Trockenschrank	Heraeus	Kalvitron t
Vakuumentrifuge mit Pumpe	Savant/Edwards	Speed-Vac/RV3
Vortexer	IKA	VF2
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Isolierte Verbindungen aus endophytischen Pilzen**

##### **3.1.1 Isolierte Verbindungen aus *Rhizoctonia* sp.**

3.1.1.1 Isolierte Verbindungen aus dem Bohnenextrakt von *Rhizoctona* sp.

Indol-3-carbonsäure	
<b>Synonyme</b>	Indol-3-carboxylsäure; 3-Carboxyindol; 3-Indolameisensäure; 3-Indolylcarboxylsäure; Indol- $\beta$ -carboxylsäure; $\beta$ -Indolylcarboxylsäure
<b>Probencode</b>	RB60-2-3
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	14,1 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbe Nadeln
<b>Summenformel</b>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	161 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	17,1 min
	
	
	

Indol-3-carbonsäure wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (14,1 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$

## Ergebnisse

(MeOH) 215 nm und 281 nm auf. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch ein EI Experiment bei 120 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  161  $[\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2]^+$  beobachten, wodurch das Molekulargewicht auf 161 g/mol festgelegt werden konnte.

Die strukturelle Aufklärung erfolgte durch massenspektrometrische Analysen,  $^1\text{H}$  NMR Experimente und Literaturvergleich der gewonnenen Daten (Hiort, 2003). Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.1), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von insgesamt sechs Protonen, von welchen eines bei  $\delta_{\text{H}}$  11,83 ppm auftrat und dem sekundären Amin in Position H-1 zugeordnet wurde. Neben diesem ließ sich ein ABCD-System beobachten, welches mit den Protonen H-4 bei  $\delta_{\text{H}}$  8,00 ppm, H-5 und H-6 als Multiplett überlappend bei  $\delta_{\text{H}}$  7,16 ppm und mit H-7 bei  $\delta_{\text{H}}$  7,46 ppm resonierte. H-7 und H-4 zeigten jeweils eine Kopplungskonstante von 6,8 Hz, was die *ortho*-Ständigkeit der Protonen H-5 und H-6 indizierte. Zusätzlich mit H-7 überlappend zeigte sich ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  8,02 ppm, welches aufgrund der starken Entschirmung durch den benachbarten Stickstoff, H-2 zugeschrieben wurde.

Bisher wurde Indol-3-carbonsäure aus den Pilzen *Annulohyphoxylon ilanense* (Wu, *et al.*, 2013), *Aspergillus versicolor* (Liu, *et al.*, 2012), *Botryosphaeria rhodina* (Abdou, *et al.*, 2010) und *Chaetomium* sp. (Aly, *et al.*, 2009) isoliert.

**Tab. 3.1:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von Indol-3-carbonsäure.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 600 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
1	11,83 (1H, s)	11,43 (1H, s)
2	8,02 (1H, s)	7,70 (1H, s)
4	8,00 (1H, d, $J=6,8\text{Hz}$ )	8,14 (1H, d, $J=7,6\text{Hz}$ )
5	7,16 (1H, m)	7,02 (1H, dt, $J=6,9, 1,3\text{Hz}$ )
6	7,16 (1H, m)	7,05 (1H, dt, $J=6,9, 1,3\text{Hz}$ )
7	7,46 (1H, d, $J=6,8\text{Hz}$ )	7,35 (1H, d, $J=7,6\text{Hz}$ )

a) (Hiort, 2003)



## Ergebnisse

EI Experiment bei 75 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  145  $[\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}]^+$  beobachten, wodurch das Molekulargewicht auf 145 g/mol festgelegt werden konnte.

Die Struktur des 3-Indolaldehyds wurde anhand der massenspektrometrischen Daten, der  $^1\text{H}$  NMR Experimente, sowie anhand des Vergleichs mit Literaturwerten (Ebrahim, 2012) aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.2), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte ein Signalset mit insgesamt sieben Protonen. Im Vergleich zur 3-Indolcarbonsäure zeigte sich auch ein ABCD-System, welches bei  $\delta_{\text{H}}$  7,22 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,26 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,51 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  8,08 ppm resonierte und den Protonen H-6, H-5, H-7 und H-4 zugeordnet wurde. Die Protonen H-4 und H-7 waren hierbei als Dublett aufgespalten, mit einer Kopplungskonstante von 7,2 Hz, die Protonen H-5 und H-6 als Dublett vom Triplett mit denen für *ortho*- und *meta*-ständigen protonen typischen Kopplungskonstanten von 7,2 und 1,6 Hz, was einen zusätzlichen Beweis für das ABCD-System darstellte. Ebenfalls waren die Signale für das Proton des Stickstoffes als breites Singulett im Tieffeldbereich bei  $\delta_{\text{H}}$  12,16 ppm, wie auch H-2 als scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  8,29 ppm zu erkennen. Als zusätzliches Signal ließ sich im Gegensatz zur 3-Indolcarbonsäure ein weiteres scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  9,93 ppm beobachten, welches als das aldehydische Proton H-1' identifiziert wurde.

Bisher wurde Indol-3-aldehyd als Stoffwechselmetabolit von *Aspergillus versicolor* (Liu, *et al.*, 2012), *Leptosphaeria maculans* (Pedras and Ahiahou, 2012), *Plasmodiophora brassicae* (Pedras, *et al.*, 2008), *Lactarius* sp. (Ayer and Trifonov, 1994, Wang, *et al.*, 2004b) und *Taphrina* sp. (Barthe, 1968, Kern, 1975) isoliert.

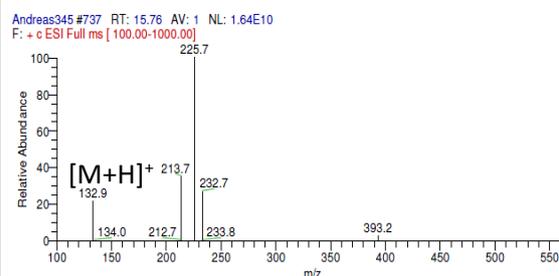
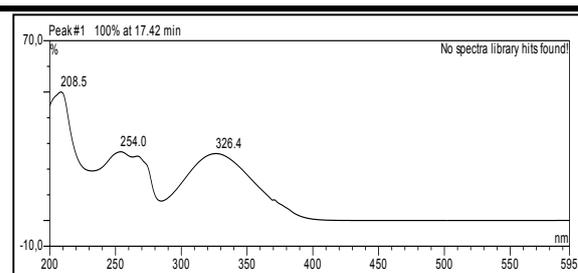
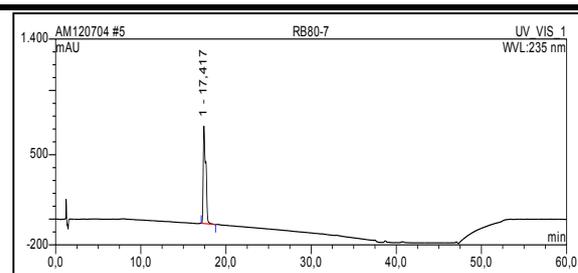
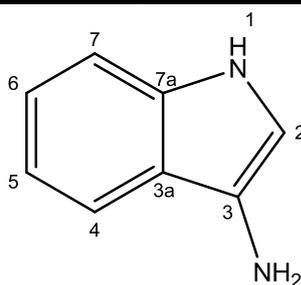
**Tab. 3.2:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von Indol-3-aldehyd.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 600 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
1	12,16 (1H, s)	
2	8,29 (1H, s)	8,22 (1H, s)
4	8,08 (1H, d, $J=7,1\text{Hz}$ )	8,05 (1H, d, $J=7,9\text{Hz}$ )
5	7,26 (1H, dt, $J=7,5, 1,6\text{Hz}$ )	7,21 (1H, dt, $J=7,2, 1,3\text{Hz}$ )
6	7,22 (1H, dt, $J=7,5, 1,6\text{Hz}$ )	7,16 (1H, dt, $J=7,2, 1,3\text{Hz}$ )
7	7,51 (1H, d, $J=7,1\text{Hz}$ )	7,48 (1H, d, $J=7,6\text{Hz}$ )
1'	9,93 (1H, s)	9,88 (1H, s)

a) (Ebrahim, 2012)

## Indol-3-amin

<b>Synonyme</b>	3-Aminoindol
<b>Probencode</b>	RB80-7
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	8,5 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	132 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	17,4 min



Indol-3-amin wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (8,5 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 209, 254 und 326 nm auf. Im positiven ESI Massenspektrum ließ sich ein pseudomolekulares Ion bei  $m/z$  132,9  $[M+H]^+$  detektieren, wodurch das Molekulargewicht auf 132 g/mol festgelegt werden konnte.

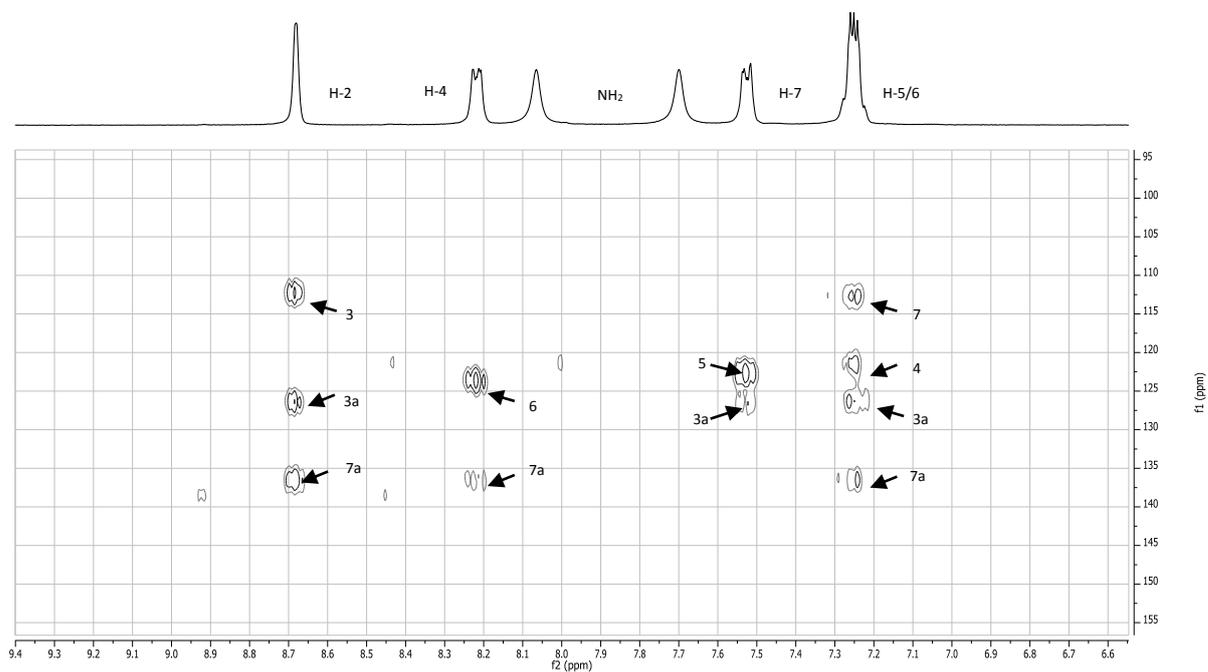
## ***Ergebnisse***

---

Die Struktur des Indol-3-amins konnte anhand von massenspektrometrischen Daten, Datenbankabgleich (ACD LABs) und ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten (s. Tab. 3.3) bestätigt werden.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von acht Protonen, welche ähnlich dem Muster der Indol-3-carbonsäure, bzw. des Indol-3-aldehyds verschoben vorlagen. So ließ sie ein ABCD-System mit den Protonen H-4 bis H-7 feststellen, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  8,22 ppm (H-4),  $\delta_{\text{H}}$  7,25 ppm (H-5 und H-6) und  $\delta_{\text{H}}$  7,53 ppm (H-7) resonierten. Bei  $\delta_{\text{H}}$  8,69 ppm war ein scharfes Singulett zu erkennen, das als H-2 interpretiert wurde, sowie ein breites Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  12,20 ppm, das dem Proton H-1 des Stickstoffes zugeschrieben wurde. Neben diesen Signalen ließen sich im Vergleich zur Indol-3-carbonsäure zwei weitere, breitere Singuletts erkennen, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  7,71 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  8,07 ppm auftraten. Die Signale wurden in Kombination mit dem Fehlen von 13 amu, bzw. 29 amu zum Molekulargewicht des Indol-3-aldehyds, bzw. der Indol-3-carbonsäure den Protonen der Aminofunktion zugeordnet. Dieses konnte auch durch das Fehlen der HMQC und HMBC Korrelationen dieser Signale zu Kohlenstoffatomen bestätigt werden. Die Konstitution konnte durch die HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.1) bestätigt werden. Hierbei konnten die  $^3J$  Korrelationen von H-2 zu C-3a und C7a, H-4 zu C-6 und C-7a, H-5 zu C3a und C-7, H-6 zu C-4 und C-7a, sowie jene von H-7 zu C-3a und C-5 beobachtet werden. Die  $^2J$  Korrelation von H-2 zu C-3 vervollständigte das Bild. Die Verknüpfung der Aminogruppe an C-3 konnte durch das im COSY Spektrum beobachtete Spinsystem zwischen H-1 und H-2, sowie durch das Spinsystem zwischen H-4 bis H-7 begründet werden.

Indol-3-amin wurde bisher z.B. aus *Sambucus adnata* (Sasaki, *et al.*, 2011) isoliert.



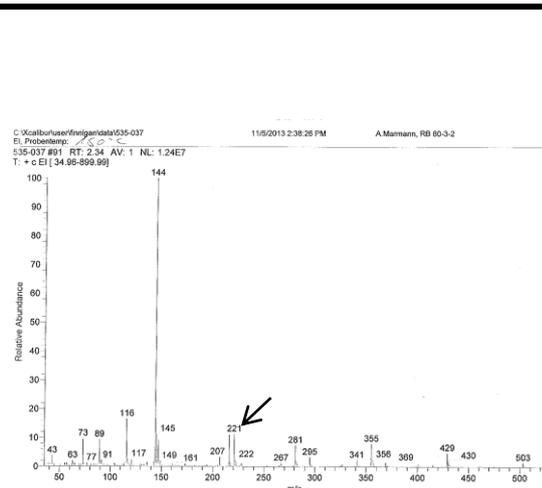
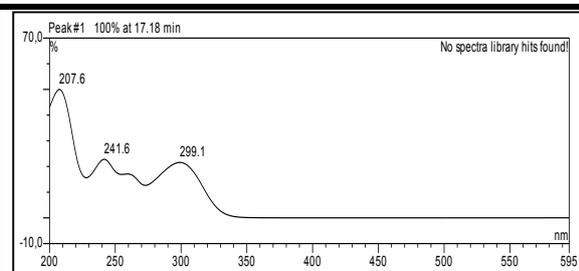
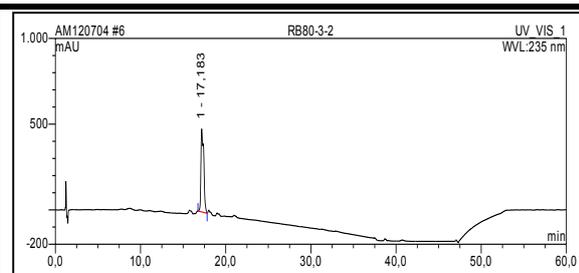
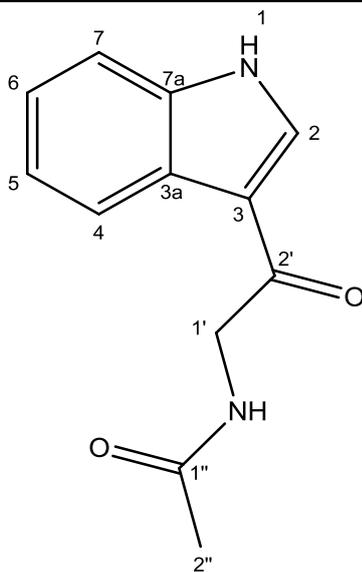
**Abb. 3.1:** HMBC Spektrum von Indol-3-amin, aufgenommen in DMSO- $d_6$  bei 500 MHz.

**Tab. 3.3:** NMR Daten von Indol-3-amin.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz (DMSO- $d_6$ )			
	$\delta_H$	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	12,20 (1H, s)		2	
2	8,69 (1H, s)	137,9	1	3, 3a, 7a
3		112,3		
3a		126,7		
4	8,22 (1H, d, $J=5,1$ Hz)	121,4	5	6, 7a
5	7,25 (1H, m)	122,7	4, 6	7, 3a
6	7,25 (1H, m)	123,8	5, 7	4, 7a
7	7,53 (1H, d, $J=5,1$ Hz)	112,8	6	5, 3a
7a		136,3		
NH <sub>2</sub>	7,71 (1H, br s)			
	8,07 (1H, br s)			

**N-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid**

<b>Synonyme</b>	N-[2''-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)-2'-oxoethyl]acetamid
<b>Probencode</b>	RB80-3-2
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	2,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	216 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	17,2 min



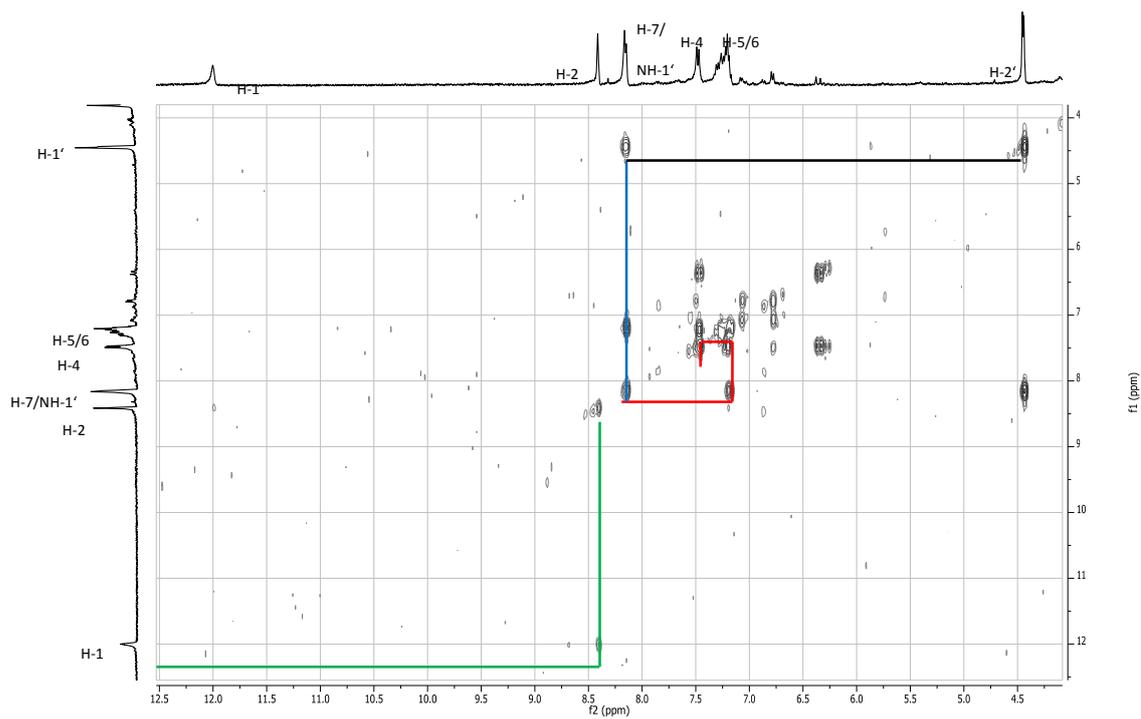
N-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (2,2 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 207, 242 und 299 nm auf. Die Bestimmung des

Molekulargewichtes erfolgte durch ein EI Experiment bei 150 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  216  $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2]^+$  beobachten, wodurch das Molekulargewicht auf 216 g/mol bestimmt wurde.

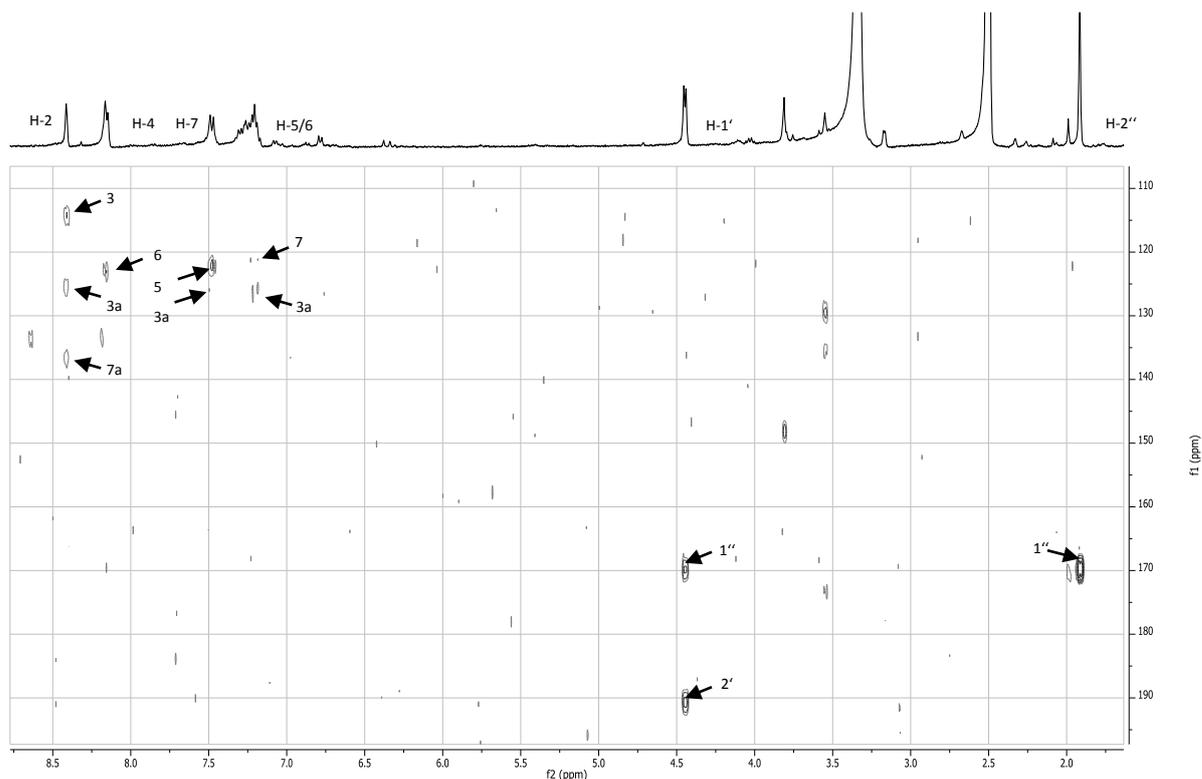
Die Struktur von *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid wurde durch massenspektrometrische ein- und zweidimensionale NMR Experimente (s. Tab. 3.4), sowie Datenbankvergleich der gewonnenen Daten (ACD LABs) gelöst.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte wie auch bei den anderen Indolderivaten typische Resonanzen bei  $\delta_{\text{H}}$  7,48 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,28 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,21 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  8,16 ppm mit einer Integration von insgesamt vier Protonen, welche dem ABCD-System als H-7 bis H-4 zugeordnet wurden. H-4 koppelte mit H-5 und H-6 und H-5 mit H-6 und H-7 in jeweils *ortho*- und *meta*-Position, wodurch sich die typischen Kopplungskonstanten eines ABCD-Systems von 7,0 und 1,6 Hz ergaben. Überlappend mit H-4 konnte NH-1' durch die COSY Korrelationen (s. Abb. 3.2) von  $\delta_{\text{H}}$  8,17 ppm zu  $\text{CH}_2$ -1' bei  $\delta_{\text{H}}$  4,45 ppm detektiert werden. Neben diesen Protonen waren erneut ein scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  8,42 ppm, sowie ein breites Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  12,02 ppm zu identifizieren, welche H-2 und H-1 zugeordnet wurden. Im Vergleich zur Indol-3-carbonsäure konnten zwei weitere Signale identifiziert werden, welche als Dublett mit einer Integration von zwei Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4,45 ppm und als Singulett mit einer Integration von drei Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  1,92 ppm zu erkennen waren. Diese wurden der  $\text{CH}_2$ -Gruppe  $\text{CH}_2$ -1', sowie der Methylgruppe H-2" der endständigen Acetylgruppe zugeschrieben. Die so erkannten Substrukturen konnten zum einen durch die im COSY Spektrum identifizierten kontinuierlichen Spinsysteme von H-4 bis H-7, von NH-1' bis H-1' und von H-1 bis H-2, sowie den HBMC Korrelationen (s. Abb. 3.3) von H-2 zu C-3, C-3a und C-7a, H-4 zu C-6, H-5 zu C-3a, H-6 zu C-7 und H-7 zu C-5 bestätigt werden. Die Konstitution der Seitenkette konnte durch die HMBC Korrelationen von H-1' zu C-2' und C-2" und von H-2" zu C-1" bestätigt werden. Die Verknüpfung der aliphatischen Seitenkette an C-3 des Indolgrundkörpers konnte anhand der im COSY identifizierten Spinsysteme zwischen H-1 und H-2 und H-4 bis H-7 und dem detektierten Molekulargewicht festgelegt werden.

Bisher wurde *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid aus *Inonotus vaninii* (Yang, *et al.*, 2013a), *Bacillus* sp. (Li, *et al.*, 2007) und *Streptomyces ramulosus* (Chen, *et al.*, 1983) isoliert.



**Abb. 3.2:** COSY Spektrum von *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid, gemessen in DMSO-*d*<sub>6</sub> bei 500 MHz.



**Abb. 3.3:** HMBC Spektrum von *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid, gemessen in DMSO- $d_6$  bei 500 MHz.

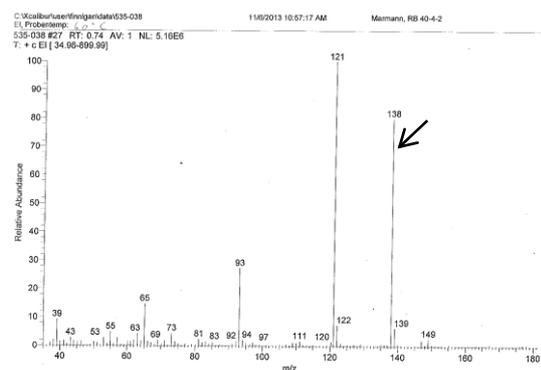
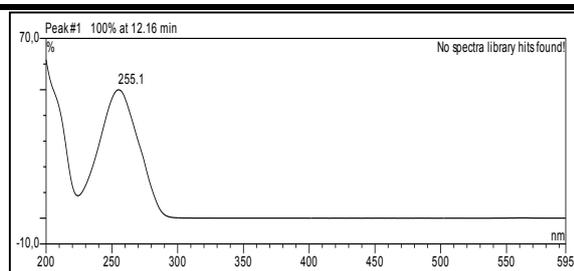
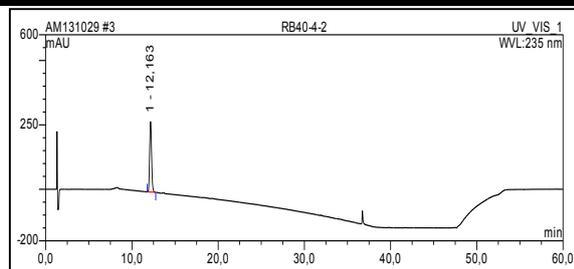
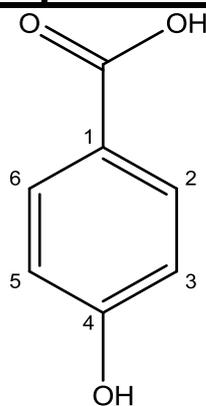
**Tab. 3.4:** NMR Daten von *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz (DMSO- $d_6$ )				Lit. 80 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_H$	$\delta_C$	COSY	HMBC	$\delta_H$ (MeOD- $d_4$ )
1	12,02 (1H, s)		2		
2	8,42 (1H, s)	133,9	1	3, 3a, 7a	8,15 (1H, s)
3		114,2			
3a		125,7			
4	8,17 (1H, d, $J=7,0$ Hz)	112,4	5	6	8,15 (1H, m)
5	7,21 (1H, dt, $J=7,0, 1,6$ Hz)	122,7	4, 6	3a	7,15 (1H, m)
6	7,28 (1H, dt, $J=7,0, 1,6$ Hz)	122,7	5, 7	7	7,15 (1H, m)
7	7,48 (1H, d, $J=7,0$ Hz)	121,9	6	5, 3a	7,35 (1H, m)
7a		136,7			
1'	4,45 (2H, d, $J=5,7$ Hz)	45,7	NH-1'	2', 1''	4,54 (2H, s)
2'		190,7			
NH-1'	7,15 (1H)		1'		
1''		169,9			
2''	1,92 (3H, s)	22,3		1''	2,04 (3H, s)

a) (Chen, *et al.*, 1983)

***p*-Hydroxybenzoesäure**

<b>Synonyme</b>	4-Hydroxybenzoesäure; <i>p</i> -Salicylsäure; <i>p</i> -Oxybenzoesäure
<b>Probencode</b>	RB40-4-2
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	2,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	138 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	12,1 min



*p*-Hydroxybenzoesäure wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (2,6 mg). Die Substanz wies ein charakteristisches UV Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 255 nm auf. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch ein EI

Experiment bei 60 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  138  $[\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3]^+$  beobachten, wodurch das Molekulargewicht auf 138 g/mol festgelegt werden konnte.

Die strukturelle Aufklärung von *p*-Hydroxybenzoesäure erfolgte durch massenspektrometrische-,  $^1\text{H}$  NMR Experimente und Datenbankabgleich der chemischen Verschiebungen (SBDS No. 1376HSP-02-898).

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.5), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte deutlich die typischen Signale eines AA'BB' Systems bei  $\delta_{\text{H}}$  6,81 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,79 ppm, welche mit einer typischen Kopplungskonstante von 8,6 Hz koppelten und je über eine Integration von zwei Protonen verfügten. Die Signale wurden daher H-2 und H-6, bzw. H-3 und H-5 zugeordnet. Neben den Signalen des Aromaten ließen sich zwei weitere breite Singulets im Tieffeld beobachten, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  10,27 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  12,37 ppm resonierten. Die Resonanz bei  $\delta_{\text{H}}$  10,27 ppm wurde der phenolischen Hydroxylgruppe in Position 4 zugeordnet;  $\delta_{\text{H}}$  12,37 ppm aufgrund des entschirmenden Effekts der benachbarten Carbonylfunktion der Hydroxylgruppe der Säurefunktion.

*p*-Hydroxybenzoesäure wurde bisher unter anderem aus den Pilzen *Nocardiopsis gilva* (Tian, *et al.*, 2013), *Penicillium* sp. (Ying, *et al.*, 2013, Zhuang, *et al.*, 2012), *Microsphaeropsis arundinis* (Sommart, *et al.*, 2012), *Nigrospora* sp. (Rukachaisirikul, *et al.*, 2010), *Lecythophora* sp. (Sugijanto, *et al.*, 2009), *Calodon suaveolens* (Wang and Liu, 2004), *Gloeophyllum trabeum* (Varela, *et al.*, 2003), *Guanomyces polythrix* (Macías, *et al.*, 2001), *Alternaria tagetica* (Gamboa Angulo, *et al.*, 2001) und *Discula* sp. (Venkatasubbaiah and Chilton, 1991) isoliert.

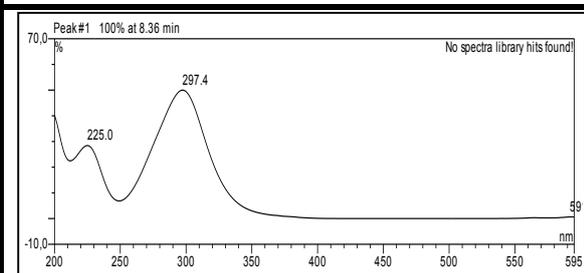
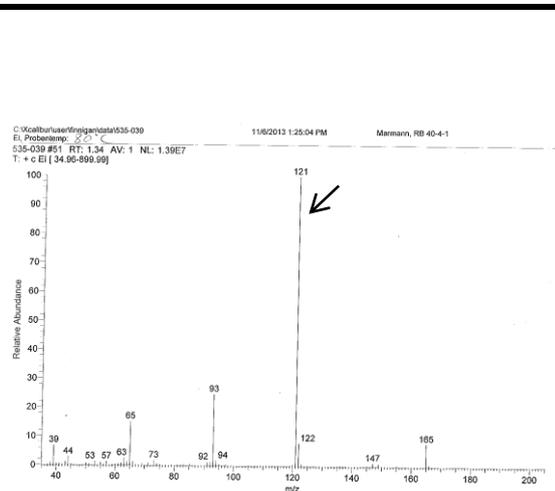
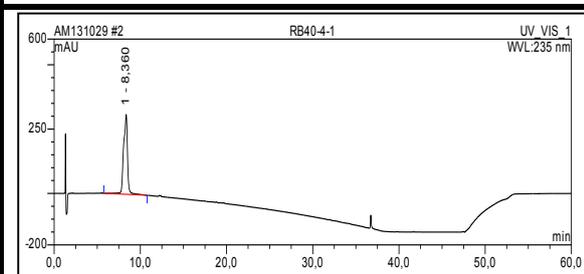
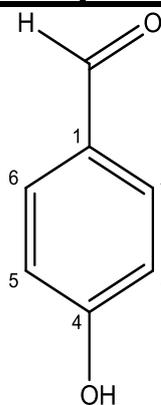
**Tab. 3.5:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von *p*-Hydroxybenzoesäure.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 400 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
2	7,79 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$ )	7,80 (1H, d)
3	6,82 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$ )	6,84 (1H, d)
5	6,82 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$ )	6,84 (1H, d)
6	7,79 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$ )	7,80 (1H, d)
4-OH	10,27 (1H, br s)	10,2*
1-COOH	12,37 (1H, br s)	12,4*

a) SBDS No.1376HSP-02-898 \*keine Angaben der Multiplizität (Kopplungskonstanten nicht angegeben)

***p*-Hydroxybenzaldehyd**

<b>Synonyme</b>	4-Formylphenol; 4-Hydroxybenzaldehyd; Parahydroxybenzaldehyd; <i>p</i> -Formylphenol; <i>p</i> -Oxybenzaldehyd
<b>Probencode</b>	RB60-2-1, RB40-4-1
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	11,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	122 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	8,4 min.



*p*-Hydroxybenzaldehyd wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (11,2 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 225 nm und 297 nm auf. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch

ein EI Experiment bei 80 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  121  $[C_7H_6O_2]^+$  beobachten, wodurch sich das Molekulargewicht von 121 g/mol ergab.

Die strukturelle Aufklärung des *p*-Hydroxybenzaldehyds erfolgte mittels  $^1H$  NMR Experimenten, massenspektrometrischen Analysen, sowie Datenbankvergleich der gewonnenen Daten (SBDS No.3444HSP-44-684).

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.6) zeigte, wie auch im Fall der *p*-Hydroxybenzoesäure das typische Muster eines AA'BB' Systems, welches bei  $\delta_H$  6,90 ppm und  $\delta_H$  7,86 ppm mit 8,5 Hz miteinander koppelnd, resonierte. Die Signale bei  $\delta_H$  6,90 ppm konnten H-3 und H-5 und  $\delta_H$  7,86 ppm H-2 und H-6 zugeordnet werden. Neben diesen Signalen waren ein scharfes Singulett bei  $\delta_H$  8,19 ppm, sowie ein breites Singulett bei  $\delta_H$  10,86 ppm zu beobachten, welche als das aldehydische Proton und die Hydroxylgruppe 4-OH identifiziert wurden.

Bisher wurde *p*-Hydroxybenzaldehyd aus *Pleurotus ostreatus* (Papaspayridi, *et al.*, 2011), *Trametes versicolor* (Ramirez Bribiesca, *et al.*, 2011), *Embellisia eureka* (Ebrahim, 2012), *Pestalotiopsis* sp. (Xu, *et al.*, 2011), *Cochliobolus* sp. (Wang, *et al.*, 2010), *Phoma exigua* var. *exigua* (Cimmino, *et al.*, 2008), *Epichloe typhina* (Seto, *et al.*, 2005), *Penicillium janczewskii* (Schmeda Hirschmann, *et al.*, 2005), *Phellinus igniarius* (Mo, *et al.*, 2004), *Gloeophyllum odoratum* (Rösecke and König, 2000), *Ophiostoma crassivaginata* (Ayer, *et al.*, 1995), *Heterobasidion annosum* (Sonnenbichler, *et al.*, 1993) und *Botrytis cinerea* (Suga, 1984) isoliert.

**Tab. 3.6:**  $^1H$  NMR Daten von *p*-Hydroxybenzaldehyd.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 400 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_H$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_H$ (DMSO- $d_6$ )
2	7,86 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	7,79 (1H, d)
3	6,90 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	6,97 (1H, d)
5	6,90 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	6,97 (1H, d)
6	7,86 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	7,79 (1H, d)
4-OH	10,68 (1H, br s)	10,6 (1H, s)
1-CHO	8,19 (1H, s)	9,82 (1H, s)

b) SBDS No.3444HSP-44-684 (Kopplungskonstanten nicht angegeben)

Phenyllessigsäure

Synonyme

Benzenessigsäure; 2-Phenyllessigsäure;  
Phenylethansäure;  $\alpha$ -Toluolsäure;  
 $\omega$ -Phenyllessigsäure

Probencode

RB80-3-3

Quelle

*Rhizoctonia* sp.

Menge

103 mg

Physikalische Beschreibung

Weißes Pulver

Summenformel

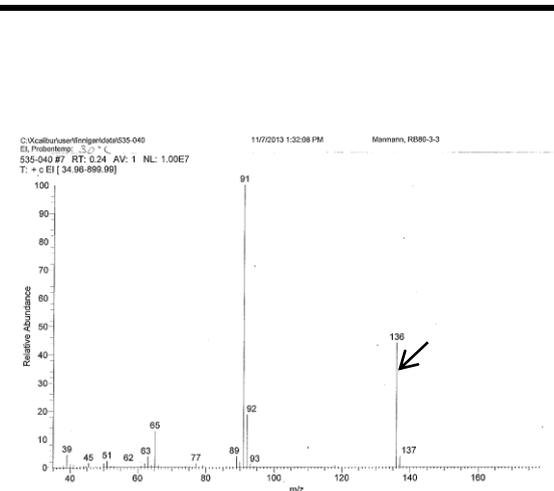
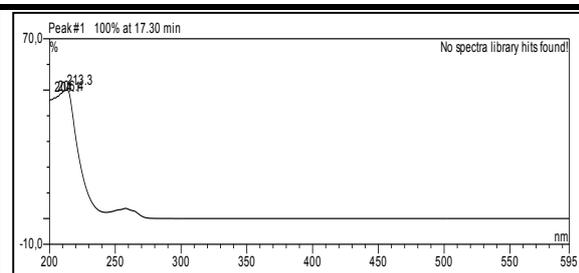
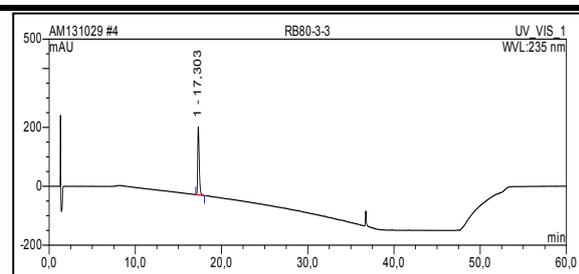
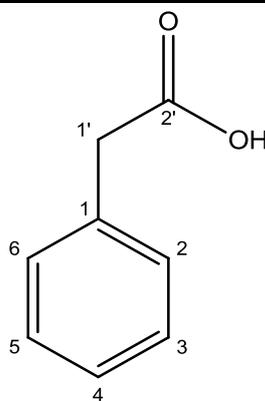
$C_8H_8O_2$

Molekulargewicht

136 g/mol

HPLC-Retentionszeit

17,3 min



Phenyllessigsäure wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (103,0 mg). Die Substanz wies ein charakteristisches UV Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{max}$  (MeOH) 213 nm auf. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch ein EI

Experiment bei 30 °C. Im Massenchromatogramm ließ sich  $m/z$  136  $[\text{C}_7\text{H}_8\text{O}]^+$  beobachten, wodurch das Molekulargewicht auf 136 g/mol festgelegt werden konnte.

Die Struktur der Phenylelessigsäure wurde anhand von  $^1\text{H}$  NMR Experimenten, massenspektrometrischer Daten, sowie Datenbankabgleich bestätigt (ACD LABs).

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte (s. Tab. 3.7) die Anwesenheit eines mono-substituierten aromatischen Systems, welches bei  $\delta_{\text{H}}$  7,20 ppm als breites Multiplett resonierte und eine Integration von fünf Protonen zeigte. Neben dem Signal des aromatischen Systems ließ sich ein scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  3,60 ppm identifizieren, welches über eine Integration von zwei Protonen verfügte und daher als die  $\text{CH}_2$ -Gruppe  $\text{CH}_2$ -1' interpretiert wurde, sowie ein breites Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  12,35 ppm, das der Hydroxylgruppe der Carbonsäure zugeordnet wurde.

Bisher wurde Phenylelessigsäure aus den Pilzen *Rhizoctonia solani* (Bartz, et al., 2012), *Burkholderia* sp. (Mao, et al., 2006), *Fistulina hepatica* (Wu, et al., 2005), *Biscogniauxia mediterranea* (Evidente, et al., 2005), *Glomerella cigulata* (Hirota, et al., 1993) und *Cladosporium* sp. (Ling, et al., 2008) isoliert.

**Tab. 3.7:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von Phenylelessigsäure.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
2	7,20 (1H, m)
3	7,20 (1H, m)
4	7,20 (1H, m)
5	7,20 (1H, m)
6	7,20 (1H, m)
1'	3,60 (2H, s)
2'-OH	12,35 (1H, br s)

5-Methyl-4-hexensäure	
<b>Synonyme</b>	$\gamma$ -Isoheptenolsäure; $\gamma$ -iso-Heptenolsäure
<b>Probencode</b>	RB60-5-1
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	1,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Ölig
<b>Summenformel</b>	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	128 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	32,4 min

5-Methyl-4-Hexensäure wurde aus der Ethylacetatfraktion des Bohnenextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (1,6 mg). Die Substanz wies ein charakteristisches UV Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 233 nm auf. Im ESI Massenspektrum lassen sich sowohl im positiven, beziehungsweise im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  129,8  $[M+H]^+$  oder 126,9  $m/z$   $[M-H]^-$  erkennen, durch welche auf ein Molekulargewicht von 128 g/mol geschlossen werden konnte.

Die strukturelle Aufklärung von 5-Methyl-4-hexensäure erfolgte mittels massenspektrometrischer und <sup>1</sup>H NMR Experimente, sowie durch Datenbankabgleich der gewonnenen Daten (ACD LABS).

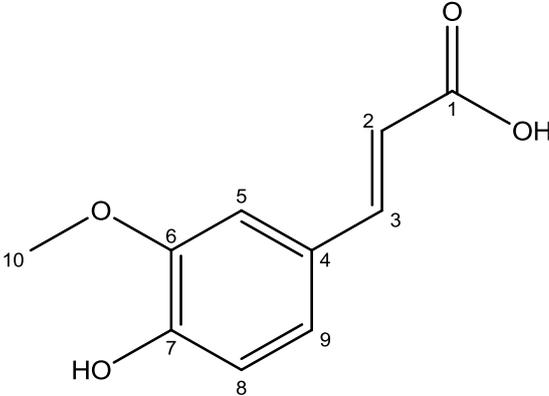
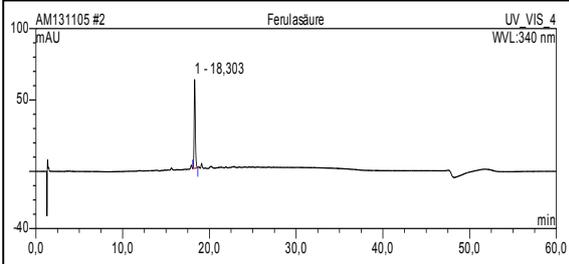
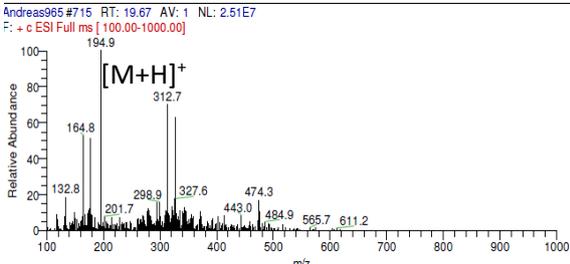
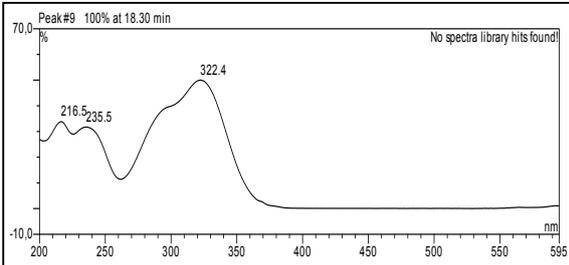
Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, (s. Tab. 3.8) aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von zwei Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  1,99 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  2,10 ppm, welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebung den Protonen  $\text{CH}_3$ -6, bzw.  $\text{CH}_3$ -7 zugeordnet wurden. Außerdem ließen sich zwei  $\text{CH}_2$ -Gruppen und eine  $\text{CH}$ -Gruppe identifizieren. H-2 wurde der Verschiebung  $\delta_{\text{H}}$  4,15 ppm zugeordnet,  $\delta_{\text{H}}$  2,41 ppm H-3 und  $\delta_{\text{H}}$  5,63 ppm H-4. Neben diesen Signalen war ein weiteres breites Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  11,98 ppm zu erkennen, welches der Hydroxylgruppe der Säurefunktion zugeschrieben wurde.

Bisher wurde 5-Methyl-4-hexensäure unter anderem aus *Eugenia uniflora* (El Alfy, *et al.*, 2003) isoliert.

**Tab. 3.8:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von 5-Methyl-4-hexensäure.

<b>Position</b>	<b>Isolierte Substanz 500 MHz <math>\delta_{\text{H}}</math> (DMSO-<math>d_6</math>)</b>
1-OH	11,98 (1H, br s)
2	4,15 (2H, m)
3	2,41 (2H, m)
4	5,63 (1H, t)
6	2,10 (3H, s)
7	1,99 (3H, s)

3.1.1.2 Isolierte Verbindungen aus dem Reisextrakt von *Rhizoctonia* sp.

<b><i>t</i>-Ferulasäure</b>	
<b>Synonyme</b>	4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure; Koniferensäure
<b>Probencode</b>	RR-4
<b>Quelle</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<b>Menge</b>	3,0 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	194 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	18,3 min
	
	
	Keine Ionisierung

*t*-Ferulasäure wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Rhizoctonia* sp. gewonnen (3,0 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Maxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 216, 236 und 322 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnte im positiven Ionisierungsmodus der Basispeak bei

$m/z$  194,9  $[M+H]^+$  beobachtet werden, welcher eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 194 g/mol ermöglichte.

Die strukturelle Aufklärung der *t*-Ferulasäure erfolgte durch massenspektrometrische, sowie ein- und zweidimensionalen NMR Analysen (s. Tab. 3.9).

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem Methanol, zeigte die Anwesenheit von insgesamt acht Protonen, repräsentiert durch sechs Signale. Drei der Signale zeigten die typische Aufspaltung eines ABx-Systems mit den Kopplungskonstanten von 8,2 und 1,9 Hz. Die Protonen resonierten bei  $\delta_{\text{H}}$  7,22 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6,85 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,10 ppm und wurden den Protonen H-5, H-8 und H-9 zugeordnet. Des Weiteren konnte ein scharfes Singulett mit einer Integration von drei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ppm beobachtet werden, welches der aromatischen Methoxygruppe H-10 zugeordnet wurde. Zudem konnten zwei weitere Signale bei  $\delta_{\text{H}}$  7,64 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,35 ppm, mit jeweils einer Kopplungskonstante von 15,9 Hz, beobachtet werden, welche der *trans*-Doppelbindung H-2/H-3 zugeschrieben wurden. Die Hydroxylgruppen konnten aufgrund des gewählten Lösungsmittels nicht detektiert werden. Die drei beobachteten Substrukturen wurden mittels ihrer HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.4) zusammengefügt. Der aromatische Ring konnte durch die  $^3J$  Korrelationen von H-5 zu C-7 und C-9, von H-8 zu C-4 und C-6, sowie von H-9 zu C-5 und C-7 bestätigt werden. Die Korrelation von H-10 zu C-6 bestätigt die Annahme der Verknüpfung der Methoxygruppe mit dem aromatischen System. Die  $^3J$  Korrelationen von H-5, bzw. H-9 zu C-7, welches bei einer Verschiebung von  $\delta_{\text{C}}$  150,5 ppm vorlag, indizierte die Substitution von C-7 mit einer Hydroxylgruppe. Die Konstitution der Seitenkette konnte durch die Korrelationen von H-2 zu C-1 und C-3, sowie von H-3 zu C-2 bestätigt werden. Durch die chemische Verschiebung von C-1 bei  $\delta_{\text{C}}$  171,0 ppm konnte die Annahme einer endständigen Säurefunktion bekräftigt werden. Die Verknüpfung der Seitenketten mit dem aromatischen System erfolgte durch die  $^3J$  Korrelationen von H-3 zu C-5 und C-9 und H-2 zu C-4, sowie durch die  $\omega$  Korrelationen von H-2 zu C-5 und C-9, H-5 zu C-2 sowie H-9 zu C-2.

*t*-Ferulasäure wurde bisher aus den Pilzen *Aspergillus unilateralis* (Capon, *et al.*, 2005), *Pycnoporus cinnabarinus* (Krings, *et al.*, 2001), *Sporotrichum pulverulentum* (Grupta, 1981) und *Cleviceps purpurea* (Teuscher and Teuscher, 1965) isoliert.

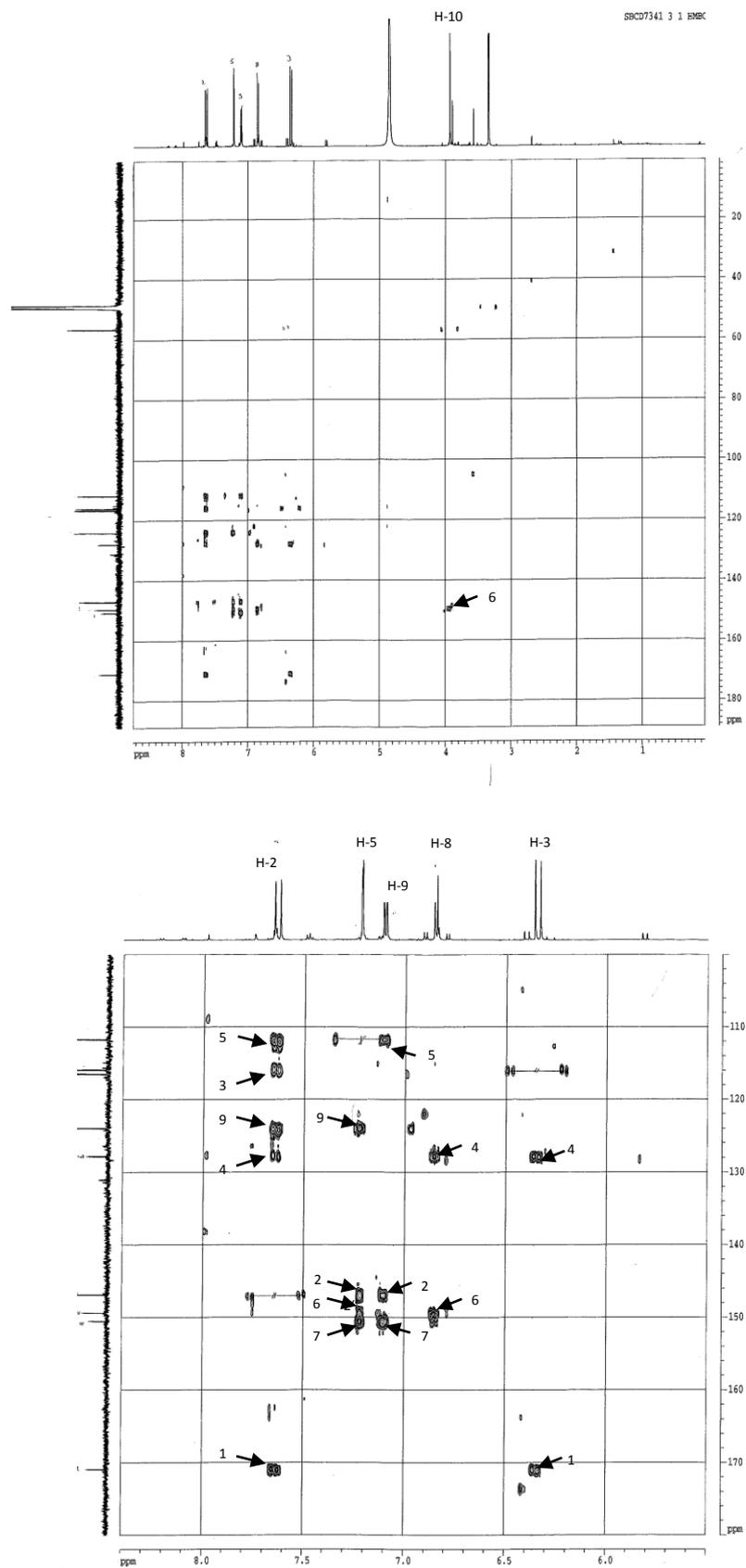


Abb. 3.4: HMBC Spektren von *t*-Ferulasäure gemessen in MeOD-*d*<sub>4</sub> bei 500 MHz.

Tab. 3.9: NMR Daten von *t*-Ferulasäure.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )			
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC
1		171,0		
2	7,64 (1H, d, $J=15,9\text{Hz}$ )	146,9	3	1,3,4,5,9
3	6,35 (1H, d, $J=15,9\text{Hz}$ )	116,5	2	2,5,9
4		127,8		
5	7,22 (1H, d, $J=1,9\text{Hz}$ )	111,8	9	2,6,7,9
6		149,4		
7		150,5		
8	6,85 (1H, d, $J=8,2\text{Hz}$ )	115,9	9	4,6
9	7,10 (1H, dd, $J=8,2, 1,9\text{Hz}$ )	124,0	5,8	2,5,7
10	3,94 (3H, s)	56,5		6



Die Aufklärung der Struktur von Protocatechualdehyd erfolgte durch  $^1\text{H}$  NMR- und MS Analysen, sowie den Vergleich der gewonnenen Messwerte mit Datenbanken (SBDS No.5661HSP-45-702).

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.10), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit eines ABx-Systems. Die Protonen des ABx-Systems, H-5 und H-6 resonierten bei  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,27 ppm und H-2 bei  $\delta_{\text{H}}$  7,23 ppm. Sie zeigten dabei die für *ortho*- und *meta*-Ständigkeit typischen Kopplungskonstanten von 8,1 und 2,0 Hz. Neben den aromatischen Protonen war ein stärker tieffeldverschobenes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  9,70 ppm zu erkennen, welches dem stark entschirmten aldehydischen Proton zugeschrieben wurde. Ähnlich weit tieffeldverschoben ließen sich zudem zwei breite Singuletts erkennen, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  9,54 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  10,10 ppm auftraten und in Kombination mit dem Fehlen von 32 amu zum detektierten Molekulargewicht als die beiden phenolischen Hydroxylgruppen 3-OH und 4-OH interpretiert wurden.

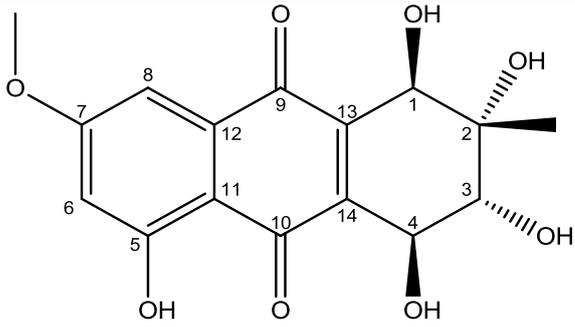
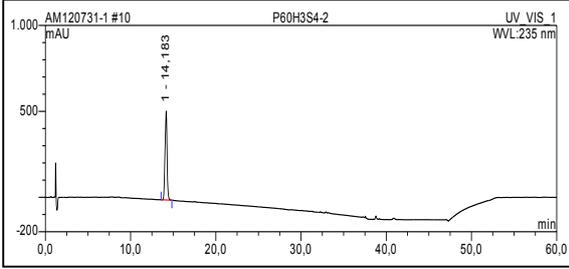
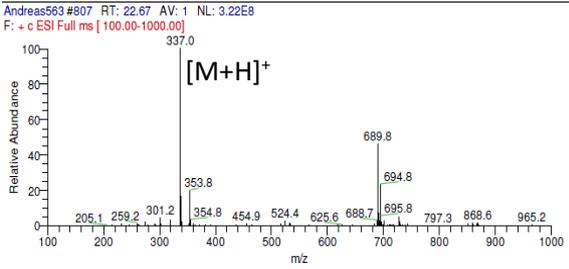
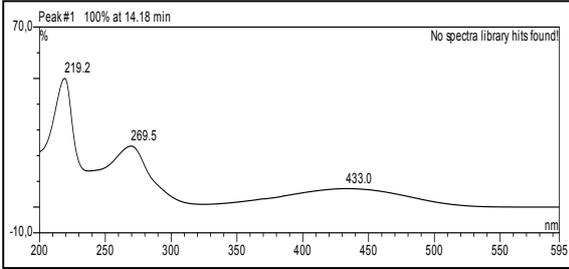
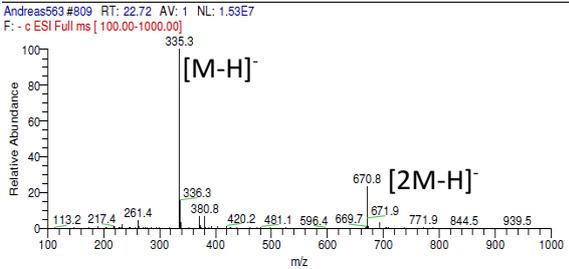
Bisher wurde Protocatechualdehyd aus den Pilzen *Inonotus obliquus* (Nakajima, *et al.*, 2007), *Phellinus igniarius* (Mo, *et al.*, 2004) und *Aspergillus fumigatus* (Jones, *et al.*, 1993) isoliert.

**Tab. 3.10:**  $^1\text{H}$  NMR Daten von Protocatechualdehyd.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 400 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
2	7,23 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )	7,28 (1H, d)
5	6,90 (1H, d, $J=8,1\text{Hz}$ )	6,94 (1H, dd)
6	7,27 (1H, dd, $J=8,1, 2,0\text{Hz}$ )	7,30 (1H, d)
7	9,70 (1H, s)	9,73 (1H, s)
3-OH	9,54 (1H, br s)	9,60 (1H, br s)
4-OH	10,10 (1H, br s)	10,10 (1H, br s)

c) SBDS No.5661HSP-45-702 (Kopplungskonstanten nicht angegeben)

3.1.2 Isolierte Verbindungen aus *Pleospora* sp.3.1.2.1 Naturstoffe aus *Pleospora* sp.

Altersolanol A	
Synonyme	1,2,3,4-Tetrahydro-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-[1 <i>R</i> -(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ )]-10-anthracendion; 1,2,3,4-Tetrahydro-1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-anthrachinon; Stemphylin
Probencode	P60H2S3-4
Quelle	<i>Pleospora</i> sp.
Menge	121,9 mg
Physikalische Beschreibung	Rotes Pulver
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>
Molekulargewicht	336 g/mol
HPLC-Retentionszeit	14,2 min
Drehwert	-192° (c = 0,5; MeOH)
	
	
	

Altersolanol A wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (121,9 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH)

219, 270 und 433 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  337,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  335,3  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 336 g/mol schließen ließen. Ebenfalls ließ sich ein pseudomolekularer Peak bei  $m/z$  670,8  $[2M-H]^-$  erkennen, der die Aussage festigte.

Die strukturelle Aufklärung von Altersolanol A erfolgte durch massenspektrometrische, sowie NMR Experimente und Literaturabgleich der gemessenen Werte.

Die Untersuchung des in deuteriertem Methanol gemessenen  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.11) zeigte die Anwesenheit von insgesamt elf Protonen. Es konnten zwei scharfe Singulets mit einer Integration von je drei Protonen identifiziert werden:  $\delta_H$  1,43 ppm wurde als Methylgruppe in Position 2 interpretiert, sowie  $\delta_H$  3,91 ppm, interpretiert als Methoxyfunktion in Position 7. Des Weiteren konnte ein *meta*-protonierter Aromat, bestehend aus den Protonen H-6 ( $\delta_H$  6,72 ppm) und H-8 ( $\delta_H$  7,13 ppm), identifiziert werden, welcher mit einer für *meta*-Positionierung typischen Kopplungskonstante von 2,4 Hz koppelte. Die bei  $\delta_H$  4,52 ppm,  $\delta_H$  3,85 ppm und  $\delta_H$  4,74 ppm resonierenden Protonen konnten den Positionen H-1, H-3 und H-4 des aliphatischen Rings zugeordnet werden. H-1 trat als Singulett auf, H-3 und H-4 als Dublett mit einer Kopplungskonstante von je 7,4 Hz. Dies indizierte die axiale Positionierung der Protonen zueinander. Aufgrund des verwendeten deuterierten Methanols ließen sich die Hydroxylgruppen nicht beobachten. Der Vergleich der gemessenen Werte mit den Literaturwerten (s. Tab. 3.11) (Yagi, *et al.*, 1993) führte zur der Identifizierung als Altersolanol A.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-192^\circ$  ( $c = 0,5$ ; MeOH), der Literaturwert  $-200^\circ$  ( $c = 0,01$ ; EtOH) (Yagi, *et al.*, 1993).

Altersolanol A wurde bereits aus den Pilzen *Phomopsis foeniculi* (Evidente, *et al.*, 2011), *Stemphylium globuliferum* (Debbab, *et al.*, 2009), *Stemphylium botryosum* (Assante and Nasini, 1987), *Ulocladium* sp. (Andersen and Hollensted, 2008), *Cladosporium* sp. (Höller, *et al.*, 2002) und *Alternaria porri*, *Alternaria solani* und *Alternaria tomatophila* (Andersen, *et al.*, 2008) isoliert.

Tab. 3.11: NMR Daten von Altersolanol A.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz	Lit. 100 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	4,52 (1H, d, <i>J</i> =6,6Hz)	4,38 (1H, s)	68,3
2			72,7
3	3,85 (1H,d, <i>J</i> =7,4Hz)	3,64 (1H, m)	73,6
4	4,74 (1H, d, <i>J</i> =7,4Hz)	4,54 (1H, m)	68,3
5			162,9
6	6,72 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	6,72 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	105,6
7			165,1
8	7,13 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	6,93 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	106,7
9			183,3
10			188,1
11			109,2
12			132,9
13			141,8
14			144,2
2-Me	1,43 (3H, s)	1,24 (3H, s)	22,2
7-OMe	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1
1-OH		5,30 (1H, s)	
2-OH		4,48 (1H, br s)	
3-OH		5,00 (1H, d, <i>J</i> =7,0Hz)	
5-OH		12,15 (1H, s)	

a)(Yagi, *et al.*, 1993)

## Altersolanol B

## Synonyme

1,2,3,4-Tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-7-methoxy-2-methyl-, (2S-cis)-9,10-anthracendion; 1,2,3,4-Tetrahydro-2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5-trihydroxy-7-methoxy-2-methyl-anthrachinon; Dactylarin

## Probencode

P0H2-4

## Quelle

*Pleospora* sp.

## Menge

1,9 mg

## Physikalische Beschreibung

Oranges Pulver

## Summenformel

C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

## Molekulargewicht

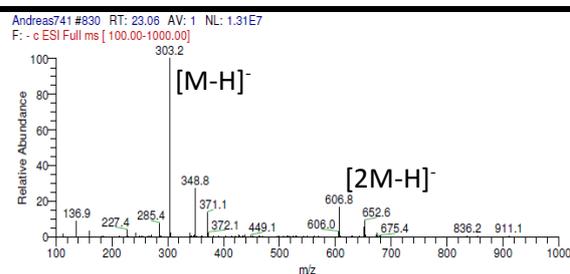
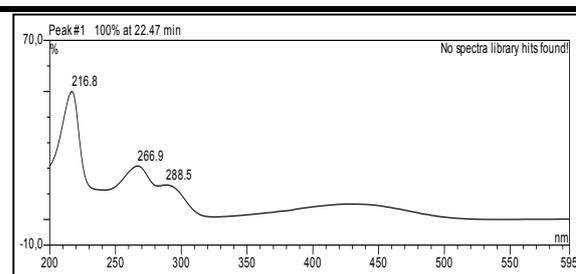
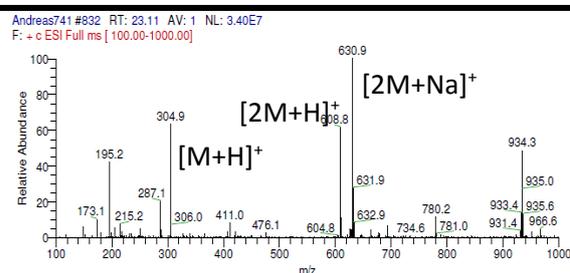
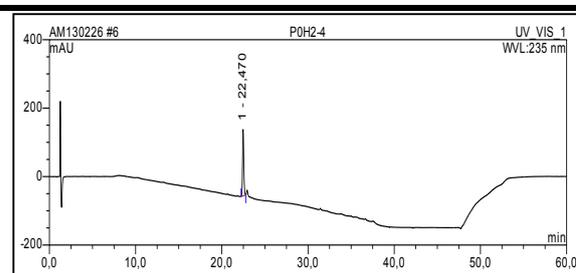
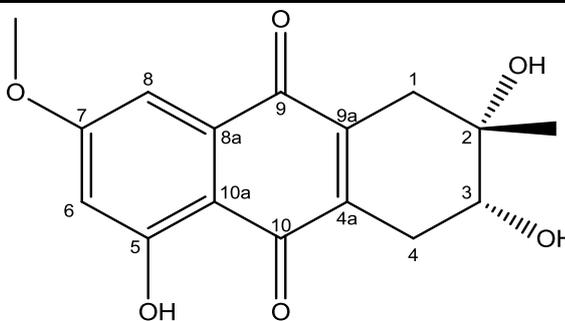
304 g/mol

## HPLC-Retentionszeit

22,5 min

## Drehwert

-160° (c = 0,2; EtOH)



Altersolanol B wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,9 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 217, 267 und 289 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  630,9  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  303,2  $[M-H]^-$

erkennen, die auf ein Molekulargewicht von 304 g/mol schließen ließen. Diese Annahme konnte durch die Beobachtung der pseudomolekularen Ionen  $m/z$  304,9  $[M+H]^+$  und  $m/z$  608,8  $[2M+H]^+$  untermauert werden.

Die Struktur wurde anhand von  $^1H$ ,  $^{13}C$  und HMBC NMR Daten und deren Vergleich mit Literaturwerten (s. Tab. 3.12) aufgeklärt. Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von sechszehn Protonen. Hierbei ließen sich zwei  $CH_2$ -Gruppen erkennen, die bei  $\delta_H$  2,54 ppm ( $CH_2$ -4) und  $\delta_H$  2,70 ppm ( $CH_2$ -1) resonierten, sowie die aliphatische CH-Gruppe (H-3) bei  $\delta_H$  3,55 ppm. Weiter tieffeldverschoben konnten die aromatischen Protonen bei  $\delta_H$  7,00 ppm und  $\delta_H$  6,80 ppm identifiziert werden, welche aufgrund ihrer Kopplungskonstante von 2,5 Hz als *meta*-ständig zueinander eingeordnet wurden. Im Hochfeld konnten zwei scharfe Singulets bei  $\delta_H$  1,16 ppm und  $\delta_H$  3,56 ppm beobachtet werden, welche jeweils eine Integration von drei Protonen aufwiesen und somit den Positionen 2-Me, bzw. 7-OMe zugeordnet werden konnten. Die Konstitution des aromatischen Rings konnte durch die HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.5) von H-6 ( $\delta_H$  6,80 ppm) zu C-5, C-7, C-8 und C-10a, von H-8 ( $\delta_H$  7,00 ppm) zu C-6, C-7, und C-10a, sowie von 7-OMe zu C-7 bestätigt werden. Zudem ließ sich die  $^3J$  Korrelation des aromatischen H-8 zum Carbonylkohlenstoff C-9 der Chinonpartialstruktur beobachten. Die Verknüpfung des ungesättigten Rings über die Chinonstruktur konnte ebenfalls durch  $^3J$  Korrelation von H-1 ( $\delta_H$  2,70 ppm) zu C-9 bestätigt werden. Des Weiteren wurden von H-1 die Korrelationen zu C-2, C-9a und 2-Me festgestellt.  $CH_2$ -4 ( $\delta_H$  2,54 ppm) zeigte  $^2J$  Korrelationen zu C-3 und C-4a. Die Positionierung von 2-Me ( $\delta_H$  1,16 ppm) konnte durch die Korrelationen zu C-1, C-2, C-3 und C-9a eindeutig festgelegt werden. Ebenso konnte 5-OH, welche aufgrund ihrer Wasserstoffbrücke zu C-10 als scharfes Singulett erschien, durch die Korrelationen zu C-5, C-6, C-7 und C-10a eindeutig positioniert werden. Die Positionierung von 2-OH und 3-OH erfolgte anhand der typischen chemischen Verschiebung C-2 und C-3 von  $\delta_C$  69,0 ppm und  $\delta_C$  70,2 ppm. Eine HMBC Korrelation zu C-10 konnte nicht beobachtet werden, jedoch konnte im  $^{13}C$  NMR Spektrum neben dem Carbonyl-Kohlenstoff C-9 ein weiteres, weiter tieffeldverschobenes Kohlenstoffatom bei  $\delta_C$  187,7 ppm identifiziert werden, welches C-10 zugeordnet wurde.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-160^\circ$  ( $c = 0,2$ ; EtOH), der Literaturwert beträgt  $-160^\circ$  ( $c = 0,025$ ; EtOH) (Yagi, *et al.*, 1993).

Altersolanol B wurde bereits aus den Pilzen *Pleospora* sp. (Ge, *et al.*, 2005), *Alternaria solani* (Yagi, *et al.*, 1993), *Alternaria porri* (Suemitsu, *et al.*, 1990) und *Dichotomophthora lutea* (Hosoe, *et al.*, 1990) isoliert.

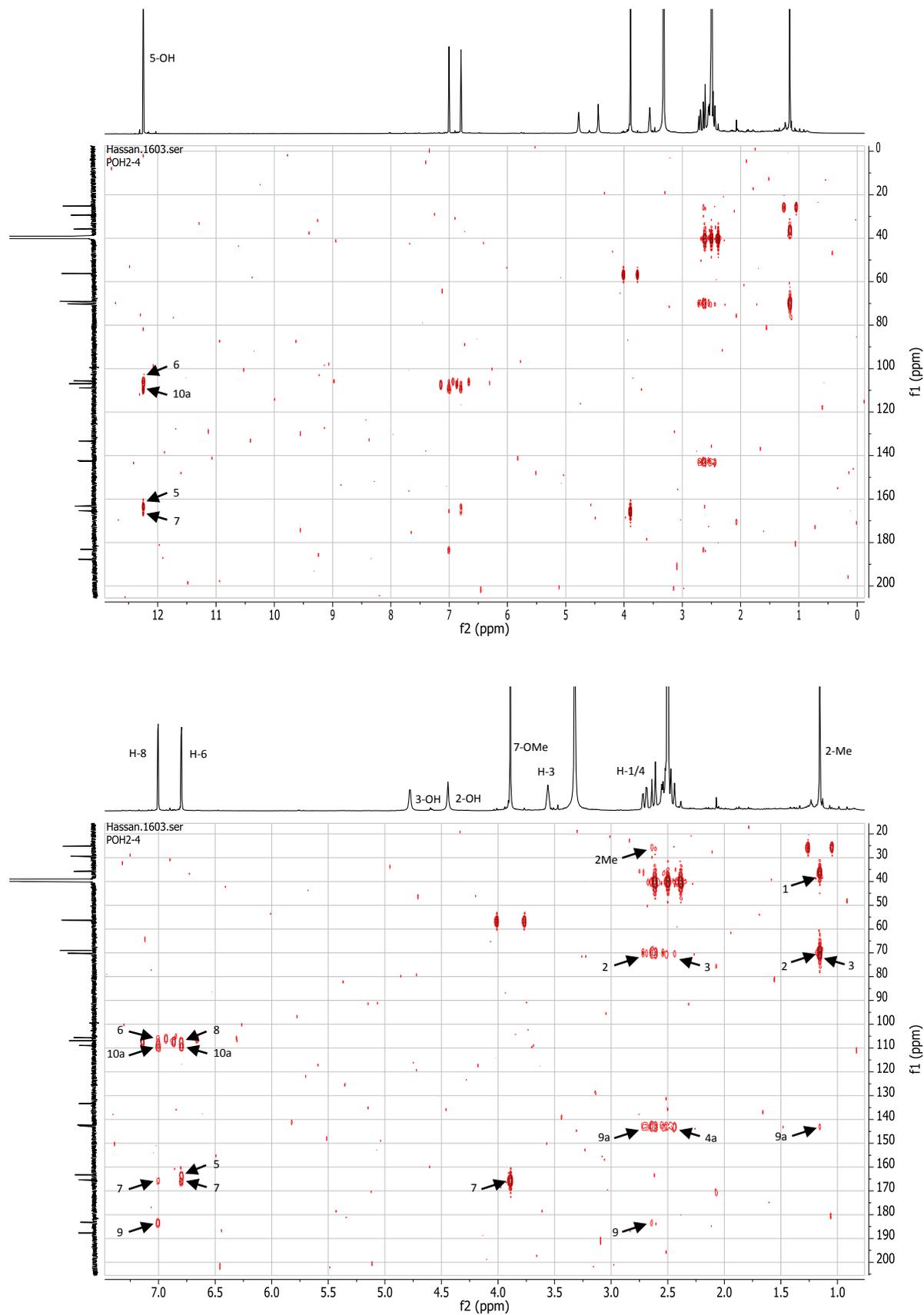


Abb. 3.5: HMBC Spektrum von Altersolanol B aufgenommen in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

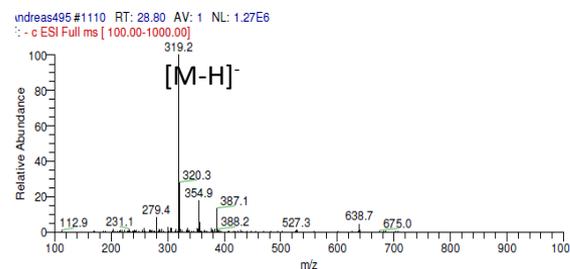
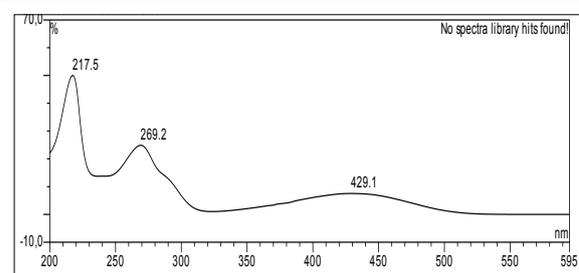
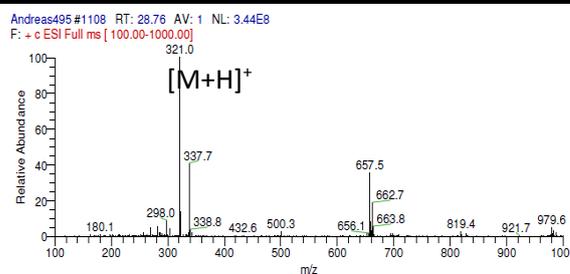
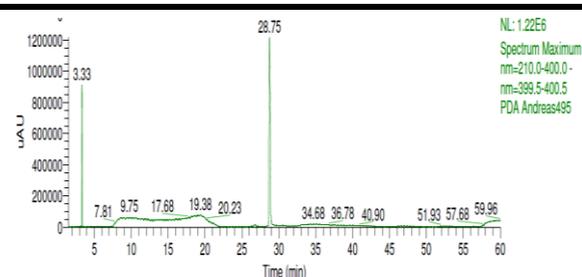
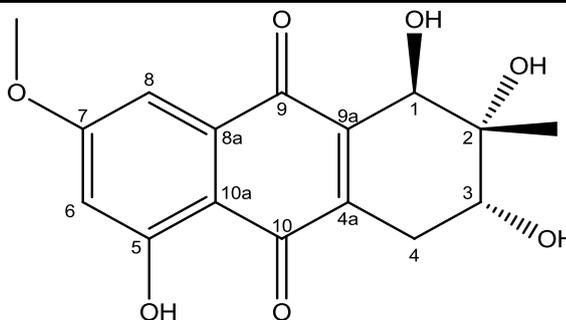
**Tab. 3.12:** NMR Daten von Altersolanol B. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 100 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	2,70 (2H, m)	35,8	2, 9, 9a, 2-Me	2,5-2,7 (2H, m)	35,8
2		69,0			68,8
3	3,55 (1H, m)	70,2		3,55 (1H, m)	69,9
4	2,54 (2H, m)	29,4	3, 4a	2,5-2,7 (2H, m)	28,9
5		163,3			163,4
6	6,80 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	105,6	5, 7, 8, 10a	6,77 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	105,4
7		165,3			165,5
8	7,00 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	106,9	6, 7, 9, 10a	6,97 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	106,8
9		183,1			182,9
10		187,7			187,1
10a		108,9			108,2
8a		133,3			132,7
9a		142,3			141,9
4a		142,7			142,9
2-Me	1,16 (3H, s)	25,2	1, 2, 3, 9a	1,19 (3H, s)	25,1
7-OMe	3,56 (3H, s)	56,2	7	3,88 (3H, s)	
2-OH	4,44 (1H, br s)			4,49 (1H, br s)	
3-OH	4,78 (1H, br s)			4,76 (1H, t, <i>J</i> =5Hz)	
5-OH	12,25 (1H, s)		5, 6, 7, 10a	12,31 (1H, s)	

a) (Yagi, *et al.*, 1993)

## Altersolanol C

<b>Synonyme</b>	1,2,3,4-Tetrahydro-1,2,3,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-[1R-(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ )]-9,10-anthracendion; 1,2,3,4-Tetrahydro-1,2,3,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-(1R,2R,4R)-9,10-anthracendion; Dactylariol
<b>Probencode</b>	P20H-70M-7
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	72,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelb-rote Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	320 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	28,8 min
<b>Drehwert</b>	-22° (c = 0,5; MeOH)



Altersolanol C wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (72,4 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH)

218, 269 und 429 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  321,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  319,2  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 320 g/mol schließen ließen.

Die Struktur von Altersolanol C wurde mit Hilfe von  $^1H$ ,  $^{13}C$  und HMBC NMR Experimenten und deren Vergleich mit Literaturwerten (s. Tab. 3.13) aufgeklärt. Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte eine ähnliche Signalverteilung wie bereits zuvor für das Altersolanol B beschrieben. Die Ausnahme war, dass das Signal von  $CH_2$ -1 fehlte, jedoch ein zusätzliches Dublett bei  $\delta_H$  4,33 ppm (H-1) auftrat. Die Tieffeldverschiebung des neuen Signals deutete auf die Substitution von C-1 mit einer Hydroxylgruppe hin. Analog zum Altersolanol B ließen sich zwei aromatische Protonen beobachten, H-6 ( $\delta_H$  6,82 ppm) und H-8 ( $\delta_H$  7,03 ppm), welche ebenfalls mit 2,5 Hz koppelten und somit als zueinander *meta*-ständig identifiziert wurden. Die Protonen des gesättigten Ringsystems traten bei  $\delta_H$  3,75 ppm (H-3, dd,  $J=16,1, 6,3$  Hz),  $\delta_H$  4,33 ppm (H-1, d,  $J=6,6$  Hz),  $\delta_H$  2,35 ppm (H-4 äq, dt,  $J=19,4, 5,9$  Hz) und  $\delta_H$  2,79 ppm (H-4 ax, dd,  $J=19,4, 5,9$  Hz) auf. Zusätzlich ließen sich zwei Singulets bei  $\delta_H$  1,27 ppm und  $\delta_H$  3,91 ppm beobachten, welche über eine Signalintensität von je drei Protonen verfügten und der Methylgruppe in Position 2, bzw. der Methoxygruppe in Position 7 zugeordnet wurden. Daneben konnten durch die Messung in deuteriertem DMSO die Hydroxylgruppen in Position 1 ( $\delta_H$  5,50 ppm), 2 ( $\delta_H$  4,38 ppm), 3 ( $\delta_H$  4,67 ppm, d,  $J=6,8$  Hz) und 5 ( $\delta_H$  12,19 ppm) beobachtet werden. Letztere konnte, begründet durch die starke Tieffeldverschiebung in Kombination mit der Ausbildung eines scharfen Singulets, in *beta*-Position zu C-10 positioniert werden. Die Verknüpfung der Ringsysteme wurde durch die HMBC Korrelationen bestätigt (s. Abb. 3.6a & b). Die Konstitution des aromatischen Rings konnte, wie auch beim Altersolanol B, durch die Korrelationen von H-6 ( $\delta_H$  6,82 ppm) zu C-5, C-7, C-8 und C-10a, von H-8 ( $\delta_H$  7,03 ppm) zu C-6, C-7 und C-10a, sowie von den Protonen der Methoxygruppe zu C-7 bestätigt werden. Zudem ließ sich die Korrelation des aromatischen H-8 zum Carbonylkohlenstoff in Position C-9 der Chinonpartialstruktur beobachten. Die Verknüpfung des ungesättigten Rings konnte durch die Korrelation von H-1 ( $\delta_H$  4,33 ppm, d,  $J=6,6$  Hz) zu C-9 als auch von H-4 (äq  $\delta_H$  2,35 ppm, dt,  $J=19,4, 9,8$  Hz; ax  $\delta_H$  2,79 ppm, dd,  $J=19,4, 5,9$  Hz) zu C-9 und C-10 bestätigt werden. Des Weiteren konnten von H-1 die Korrelationen zu C-2, C-3, C-9a und C-2Me festgestellt werden. Die Protonen  $CH_2$ -4 zeigten Korrelationen zu C-2, C-3, C-4a und C-9a. Die Positionierung von 2-Me ( $\delta_H$  1,27 ppm) konnte durch die Korrelationen zu C-1, C-2 und C-3 eindeutig vorgenommen werden. Ebenso konnte 5-OH ( $\delta_H$  12,19 ppm) durch die Korrelationen zu C-5, C-6, C-7 und C-10a eindeutig positioniert werden. Auch 1-OH ( $\delta_H$  5,50 ppm) konnte durch die Korrelationen zu C-1, C-2 und C-9a, 2-OH ( $\delta_H$  4,38 ppm) durch die Korrelationen zu C-1, C-2, C-3 und C-2Me und 3-OH ( $\delta_H$  4,38 ppm, d,  $J=6,8$  Hz) durch die Korrelationen zu C-2, C-3 und C-4 eindeutig positioniert werden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-22^\circ$  ( $c = 0,5$ ; MeOH), der Literaturwert  $-14,3^\circ$  ( $c = 0,12$ ; EtOH) (Yagi, *et al.*, 1993).

Altersolanol C wurde bereits aus den Pilzen *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012), *Alternaria solani* (Yagi, *et al.*, 1993) und *Dichotomophthora lutea* (Hosoe, *et al.*, 1990) isoliert.

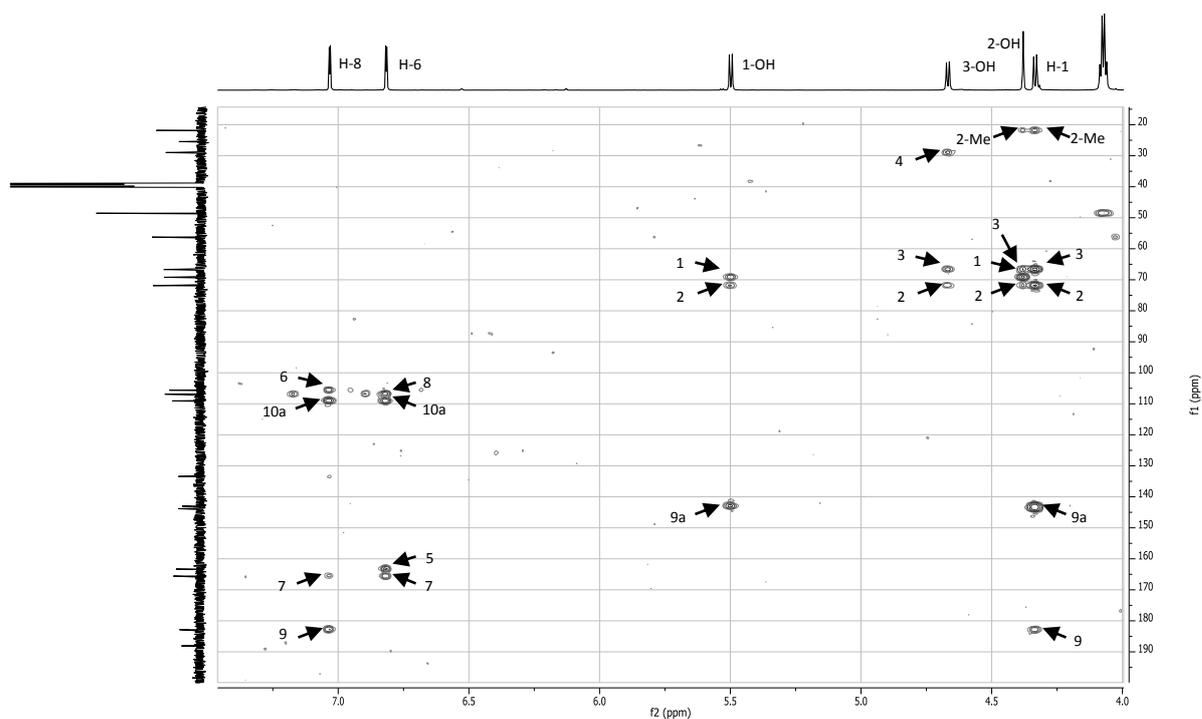


Abb. 3.6a: HMBC Spektrum von Altersolanol C aufgenommen in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz

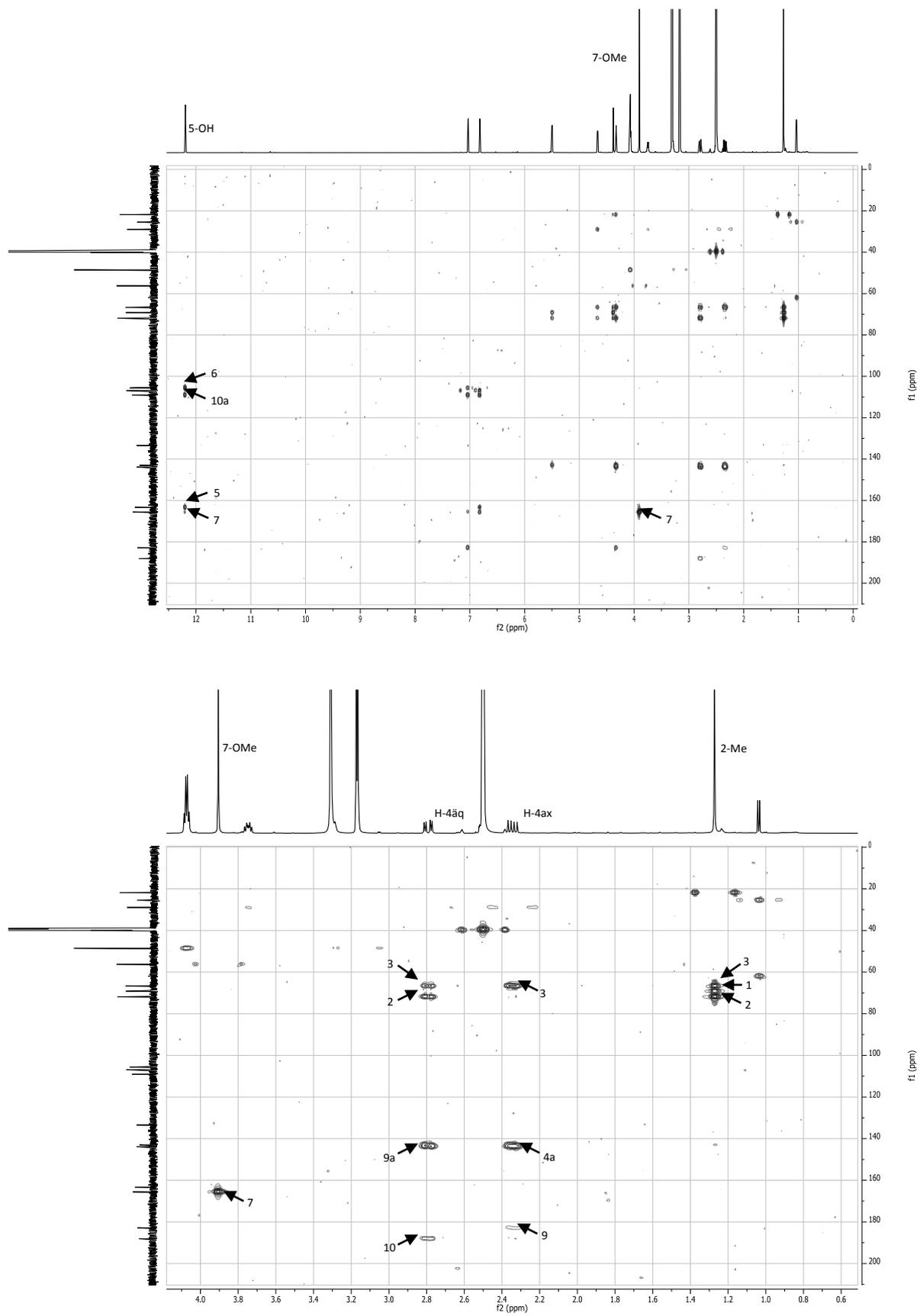
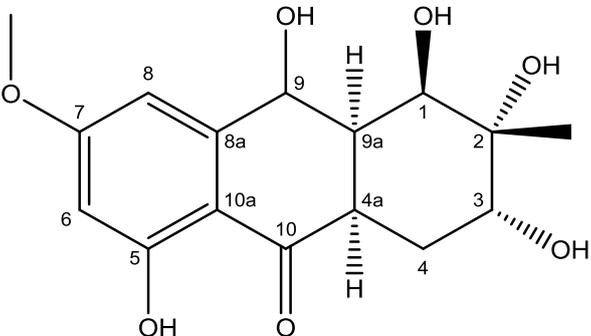
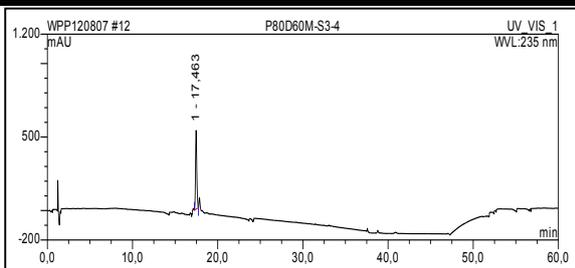
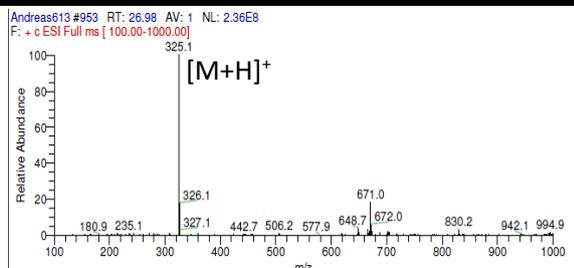
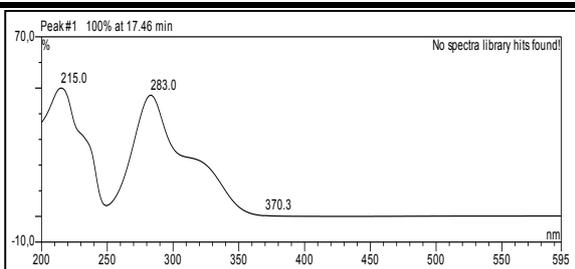
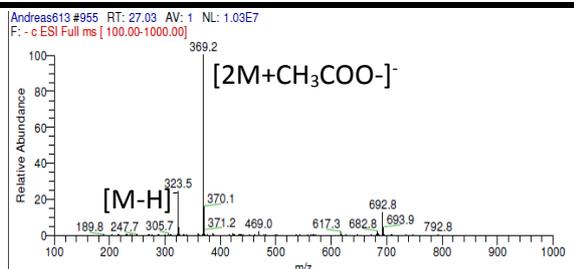


Abb. 3.6b: HMBC Spektren von Altersolanol C aufgenommen in DMSO-*d*<sub>6</sub> bei 600 MHz

Tab. 3.13: NMR Daten von Altersolanol C. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz/150 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 100 MHz/25 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	4,33 (1H, d, <i>J</i> =6,6Hz)	69,2	2, 3, 9, 9a, 2-Me	4,38 (1H, br s)	68,9
2		71,9			71,7
3	3,75 (1H, dd, <i>J</i> =16,1, 6,3Hz)	66,7	4	3,80 (1H, m)	66,5
4	2,35 (1H, dt, <i>J</i> =19,4, 9,8Hz)	29,0	2, 3, 9, 10, 4a, 9a	2,30 (1H, dd, <i>J</i> =20, 9Hz)	28,6
	2,79 (1H, dd, <i>J</i> =19,4, 5,9Hz)			2,80 (1H, dd, <i>J</i> =20, 9Hz)	
5		163,3			162,7
6	6,82 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	105,6	5, 7, 8, 10a	6,80 (1H, d, <i>J</i> =2Hz)	105,2
7		165,6			165,1
8	7,03 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	106,9	6, 7, 9, 10a	7,02 (1H, d, <i>J</i> =2Hz)	106,8
9		182,9			182,5
10		188,1			187,5
10a		109,1			108,7
4a		143,8			143,8
8a		133,4			133,0
9a		143,0			142,1
2-Me	1,27 (3H, s)	21,8	1, 2, 3	1,27 (3H, s)	21,6
7-OMe	3,91 (3H, s)	56,3	7	3,90 (3H, s)	56,0
1-OH	5,50 (1H, s)		1, 2, 9a	5,51 (1H, s)	
2-OH	4,38 (1H, s)		1, 2, 3, 2-Me	4,32 (1H, br s)	
3-OH	4,67 (1H, d, <i>J</i> =6,8Hz)		2, 3, 4	4,56 (1H, dd, <i>J</i> =9, 6Hz)	
5-OH	12,19 (1H, s)		5, 6, 7, 10a	12,20 (1H, s)	

a) (Yagi, *et al.*, 1993)

Altersolanol L	
<b>Synonyme</b>	1,3,4,4a,9,9a-Hexahydro-1,2,3,5,9-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,9 <i>aR</i> ,10 <i>R</i> )-9(2 <i>H</i> )-anthracenon
<b>Probencode</b>	P80D60MS3-4
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	5,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Rote Nadeln
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	324 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	17,5 min
<b>Drehwert</b>	-65° (c = 0,56; MeOH)
	
	
	

Altersolanol L wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (5,6 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215 nm und 283 nm auf. Das UV Spektrum erinnerte in seiner Ausprägung an die ebenfalls

beschriebenen Verbindungen Isoscleron und Cis-3,4-Dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-naphtalen-1(2H)-on. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  325,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  369,2  $[M+CH_3COO]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 324 g/mol schließen ließen. Neben den Basispeaks war im negativen ESI-Modus ein weiterer Peak bei  $m/z$  323,5  $[M-H]^-$  zu erkennen, welcher die Aussage festigte.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit eines *meta*-koppelnden aromatischen Systems, welches bei  $\delta_H$  6,34 ppm und  $\delta_H$  6,74 ppm mit der typischen Kopplungskonstante von 2,4 Hz auftrat. Ein Proton, resonierend bei  $\delta_H$  3,81 ppm, teilweise überlagert von einer Methoxygruppe bei  $\delta_H$  3,82 ppm, wurde, wie auch das bei  $\delta_H$  4,88 ppm auftretenden Dublett der Hydroxylgruppe in Position 1 zugeordnet. Zudem konnten bei  $\delta_H$  1,43 ppm und  $\delta_H$  2,10 ppm weitere, komplex als Dublett vom Dublett aufgespaltene Signale, identifiziert werden, welche  $CH_2$ -4 zugeordnet wurden. Ein weiteres bei  $\delta_H$  3,54 ppm als Dublett vom Dublett auftretendes Signal wurde H-3 zugeordnet, wobei die typischen äquatorialen-axialen und axialen-axialen Kopplungskonstanten von 4,7 und 11,7 Hz zu  $CH_2$ -4 beobachtet werden konnten. Im Vergleich zu Altersolanol C unterschied sich das Altersolanol L durch eine Massendifferenz von 4 amu und durch das Auftreten weiterer Protonensignale im Tieffeld. Diese konnten drei weiteren  $CH$ -Gruppen bei  $\delta_H$  2,66 ppm (H-4a),  $\delta_H$  2,20 ppm (H-9a) und  $\delta_H$  4,63 ppm (H-9) zugeordnet werden. H-9 war hierbei zum Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 10,9 und 7,2 Hz aufgespalten, H-9a als komplexes Multiplett und H-4a zum Triplet vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 12,4 und 3,4 Hz. Dies indizierte die axiale-äquatoriale Stellung der Protonen H-9 zu H-9a, sowie die äquatoriale-äquatoriale Stellung der Protonen H-9a zu H-4a. Das beobachtete Signalmuster entsprach damit einer reduzierten Form des Altersolanol C in den Positionen 4a, 9 und 9a.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-65^\circ$  ( $c = 0,5$ ; MeOH), der Literaturwert  $-73^\circ$  ( $c = 0,3$ ; MeOH) (Debbab, *et al.*, 2009). Der Vergleich der Kopplungskonstanten von H-4a und H-9a mit denen des später beschriebenen Dihydroaltersolanol B, zeigte eine große Übereinstimmung. Im Fall des Altersolanol L zeigt H-4a Kopplungskonstanten von 12,4 und 3,4 Hz und H-9a von 10,9 und 2,9 Hz. Dihydroaltersolanol B zeigte an den gleichen Positionen Kopplungskonstanten von 12,2 und 3,5 Hz. Die Stereochemie konnte bei letzterem zusätzlich durch ROESY Experimente bestätigt werden. Daher konnte die in der Literatur beschriebene *trans*-Ständigkeit revidiert werden und anstatt dessen die Konfiguration zwischen H-4a und H-9a als *cis*-ständig bestimmt werden.

Altersolanol L wurde bisher nur aus *Stemphyllium globiferum* (Debbab, *et al.*, 2009) und *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012) isoliert.

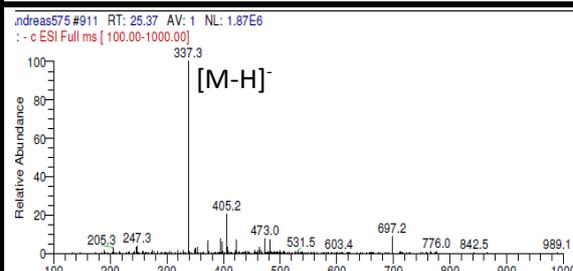
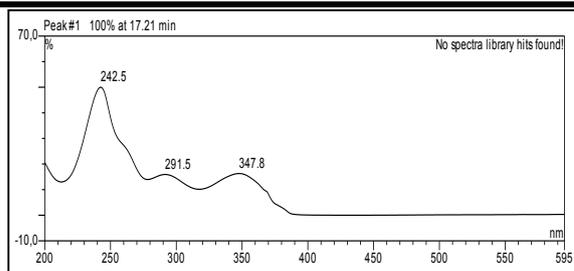
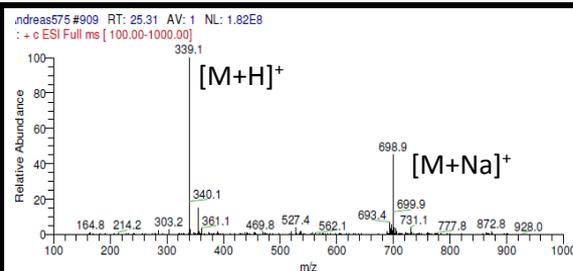
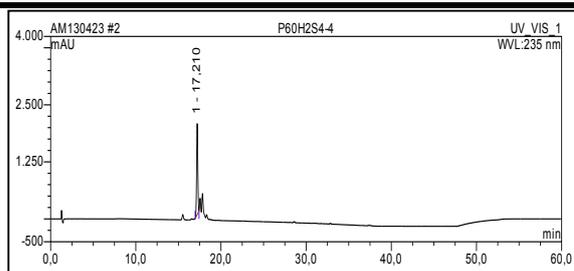
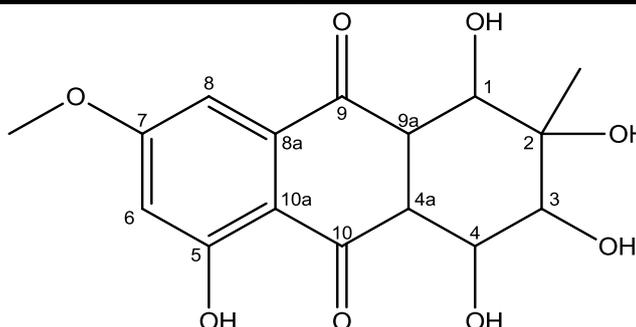
Tab. 3.14: NMR Daten von Altersolanol L. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	3,81 (1H, br s)	3,81	72,1
2			72,2
3	3,54 (1H, dd, <i>J</i> =11,9, 4,7Hz)	3,54 (1H, m)	69,5
4	ax. 1,43 (1H, dd, <i>J</i> =24,3, 11,9Hz), äq. 2,10 (1H, m)	ax. 1,42 (1H, q, <i>J</i> =12,1Hz) äq. 2,10 (1H, dt)	29,5
4a	2,66 (1H, td, <i>J</i> =12,4, 3,4Hz)	2,65 (1H, m)	41,5
5			164,3
6	6,34 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	6,33 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	98,8
7			165,7
8	6,74 (1H, dd, <i>J</i> =2,4, 1,1Hz)	6,74 (1H, dd, <i>J</i> =2,4, 1,0Hz)	104,2
8a			151,9
9	4,63 (1H, m)	4,63 (1H, m)	66,1
9a	2,20 (1H, m)	2,19 (1H, td, <i>J</i> =10,9, 2,9Hz)	45,7
10			204,4
10a			108,8
2-Me	1,23 (3H, s)	1,22 (3H, s)	23,6
7-OMe	3,82 (3H, s)	3,81 (3H, s)	55,6
1-OH	4,88 (1H, d, <i>J</i> =4,8Hz)	4,94 (1H, d, <i>J</i> =5,3Hz)	
2-OH		3,96 (1H, s)	
3-OH		4,22 (1H, br s)	
5-OH	12,98 (1H, s)	12,96 (1H, s)	
9-OH	5,30 (1H, d, <i>J</i> =3,7Hz)		
10-OH	5,37 (1H, d, <i>J</i> =7,8Hz)	5,42 (1H, d, <i>J</i> =7,8Hz)	

a) (Debbab, *et al.*, 2009)

## Dihydroaltersolanol A

Probencode	P60H2S4-4
Quelle	<i>Pleospora</i> sp.
Menge	3,9 mg
Physikalische Beschreibung	Oranges Pulver
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
Molekulargewicht	338 g/mol
HPLC-Retentionszeit	17,3 min
Drehwert	+762° (c = 0,1; DMSO)



Dihydroaltersolanol A wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (3,9 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 243, 292 und 348 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  339,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  337,3  $[M-H]^-$  erkennen, die eine Bestimmung des Molekulargewichts auf 338 g/mol zuließen. Diese Annahme ließ sich durch die Beobachtung des  $m/z$ -Wertes von 698,9  $[2M+Na]^+$  verifizieren.

## ***Ergebnisse***

---

Die Struktur von Dihydroaltersolanol A wurde mit Hilfe von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und HMBC NMR Experimenten (s. Tab. 3.15) aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte eine für die Altersolanolderivate typische Signalverteilung.

Analog zum Altersolanol A ließen sich zwei aromatische Protonen, H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,80 ppm) und H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,95 ppm) beobachten, welche mit 2,5 Hz koppelten und somit als *meta*-ständig zueinander identifiziert wurden. Die Protonen des gesättigten Ringsystems traten bei  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ppm (H-4a, m),  $\delta_{\text{H}}$  3,45 ppm (H-9a, m),  $\delta_{\text{H}}$  3,65 ppm (H-3, m),  $\delta_{\text{H}}$  3,99 ppm (H-4, m) und  $\delta_{\text{H}}$  4,47 ppm (H-1, m) auf. Die Tieffeldverschiebung der letzteren deutet auf die Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom hin. Außerdem ließen sich zwei Singulets bei  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,56 ppm beobachten, welche über eine Signalintensität von je drei Protonen verfügten und der Methylgruppe in Position 2, bzw. der Methoxygruppe in Position 7 zugeordnet wurden. Daneben konnte durch die Messung in deuteriertem DMSO die Hydroxylgruppe in Position 5 ( $\delta_{\text{H}}$  12,25 ppm) beobachtet werden. Diese konnte durch die starke Tieffeldverschiebung in Kombination mit der Ausbildung eines scharfen Singulets eindeutig in *beta*-Position zu C-10 positioniert werden. Im Vergleich zum Altersolanol A konnten zusätzlich zwei weitere Multipletts bei  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,45 ppm beobachtet werden, welche jeweils über eine Integration von einem Proton verfügten. Dies, in Kombination mit dem im Vergleich zum Altersolanol A um 2 amu erhöhten Molekulargewichts, deutete auf die Hydrierung einer Doppelbindung hin. Die Verknüpfung der Ringsysteme wurde durch die HMBC Korrelationen bestätigt (s. Abb. 3.7a & b). Die Konstitution des aromatischen Rings konnte durch die Korrelationen von H-6 zu C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  163,5 ppm), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  165,2 ppm), C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  106,8 ppm) und C-10a ( $\delta_{\text{C}}$  108,9 ppm), von H-8 zu C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  105,6 ppm) und C-10a, sowie von den Protonen der Methoxygruppe zu C-7 bestätigt werden. Die Struktur des gesättigten Rings konnte durch die Korrelation von H-1 zu C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  71,0 ppm) und C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  74,1 ppm), von H-3 zu C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  70,0 ppm) und von H-4 zu C-3 und C-4a ( $\delta_{\text{C}}$  48,8 ppm) bestätigt werden. Die Positionierung von 2-Me konnte durch die Korrelationen zu C-2 und C-3 eindeutig vorgenommen werden. Ebenso konnte 5-OH ( $\delta_{\text{H}}$  12,25 ppm) durch die Korrelationen zu C-5, C-6, C-7 und C-10a eindeutig positioniert werden. Die Korrelationen von  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ppm (H-4a) zu C-3, C-4, C-9a ( $\delta_{\text{C}}$  49,0 ppm) und C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  202,9 ppm) sowie von  $\delta_{\text{H}}$  3,45 ppm (H-9a) zu C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  74,0 ppm), C-2Me ( $\delta_{\text{C}}$  25,2 ppm), C-4a und C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  198,8 ppm) erlaubten im Vergleich zum Altersolanol A die Identifizierung einer Hydrierung der Chinonpartialstruktur zwischen C-4a und C-9a. Zudem konnte durch diese Korrelationen die gesättigte Partialstruktur mit der hydrierten Chinonstruktur verknüpft werden. Die Korrelation von H-8 zu C-9 vervollständigte das Bild und ermöglichte die Verknüpfung mit der aromatischen Teilkomponente. Aufgrund mangelnder Reinheit konnte die Stereochemie der chiralen Kohlenstoffe nicht bestimmt werden.

Dihydroaltersolanol A ist ein neuer Naturstoff.

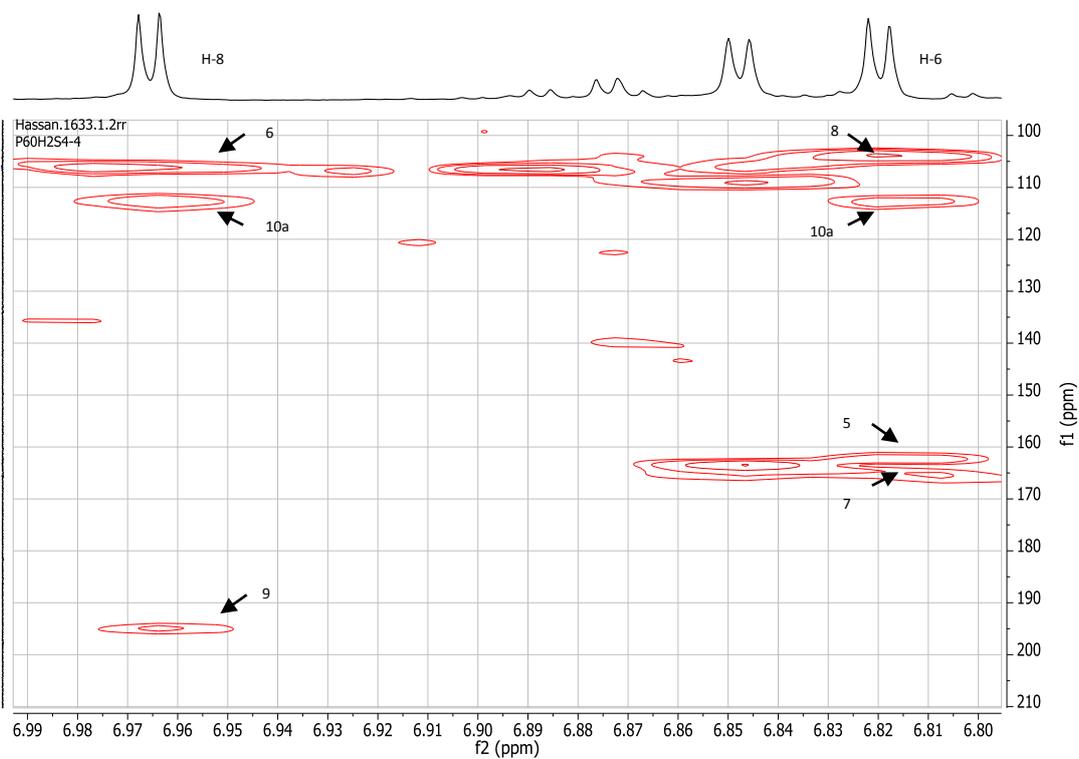
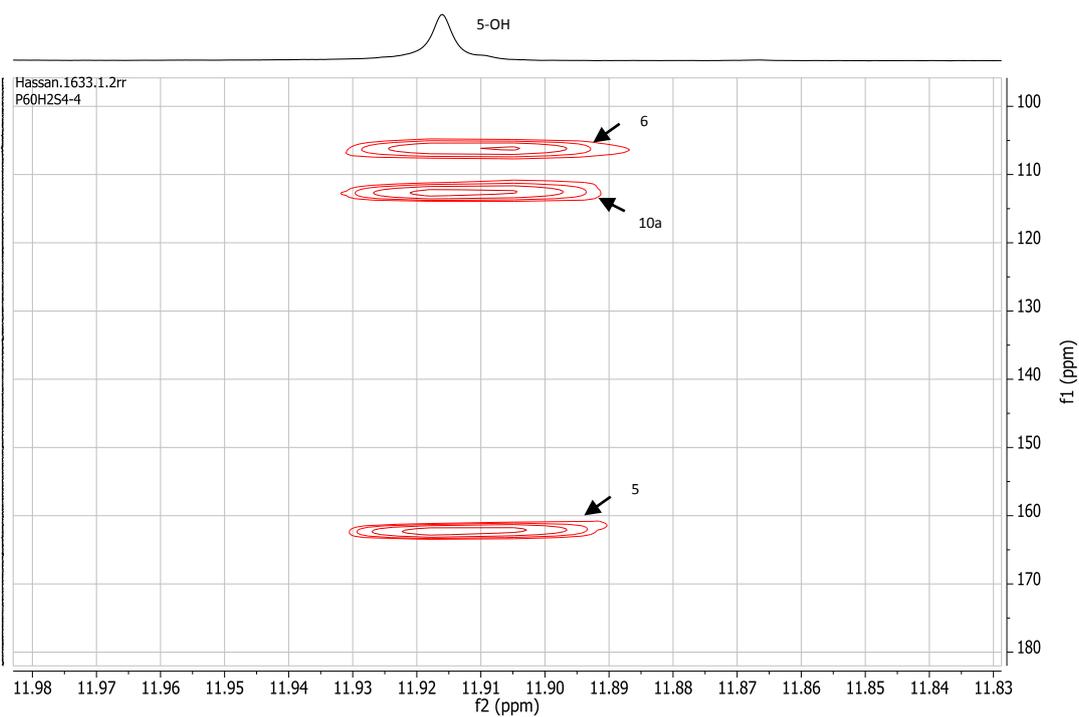


Abb. 3.7a: HMBC Spektrum von Dihydroaltersolanol A in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

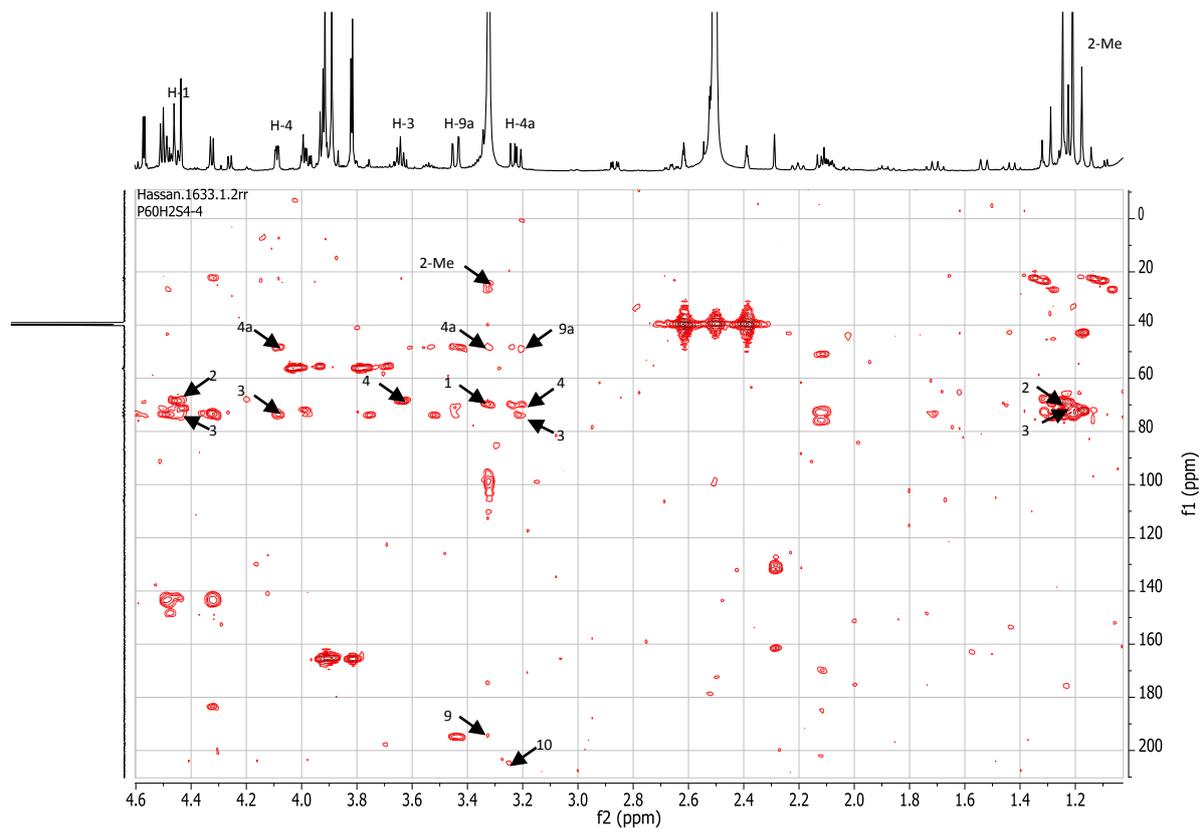


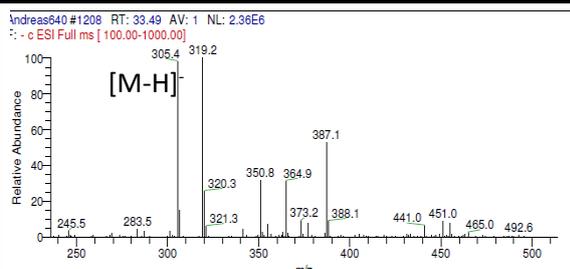
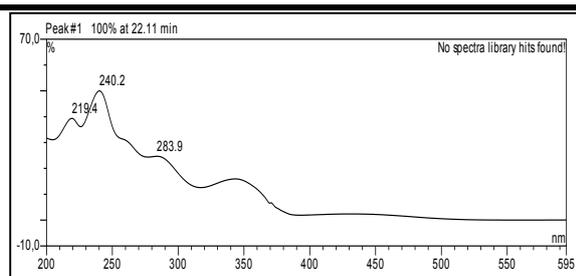
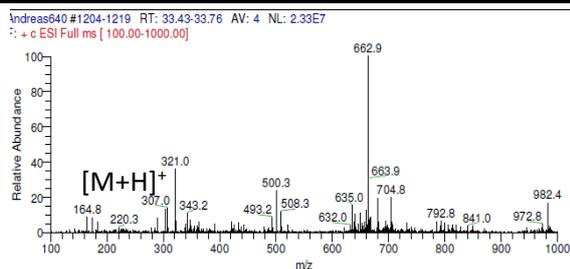
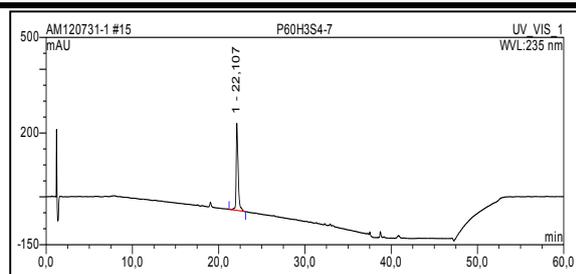
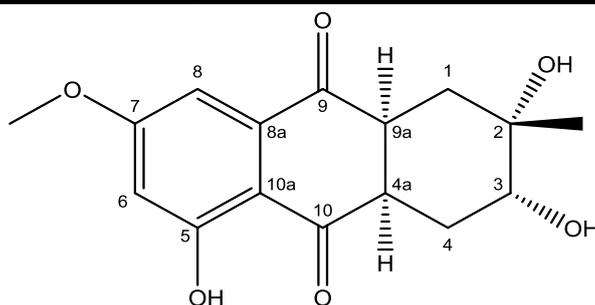
Abb. 3.7b: HMBC Spektrum von Dihydroaltersolanol A in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

**Tab. 3.15:** NMR Daten von Dihydroaltersolanol A. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1	4,47 (1H, m)	74,0	2, 3
2		71,0	
3	3,65 (1H, m)	74,1	4
4	3,99 (1H, m)	70,0	3, 4a
4a	3,23 (1H, m)	48,8	3, 4, 9a, 10
5		163,2	
6	6,80 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	105,6	5, 7, 8, 10a
7		165,2	
8	6,95 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	106,8	6, 9, 10a
8a		n.d.	
9		198,8	
9a	3,30 (1H, m)	49,0	1, 2-Me, 4a, 9
10		202,9	
10a		108,9	
2-Me	1,16 (3H, s)	25,2	2, 3
7-OMe	3,56 (3H, s)	56,2	7
5-OH	12,25 (1H, s)		5, 6, 10a

## Dihydroaltersolanol B

Probencode	P60H3S4-7
Quelle	<i>Pleospora</i> sp.
Menge	1,0 mg
Physikalische Beschreibung	gelbes Pulver
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht	306 g/mol
HPLC-Retentionszeit	22,1 min
Drehwert	-57° (c = 0,1; MeOH)



Dihydroaltersolanol B wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,0 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 219, 240 und 284 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  307,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  305,4  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 306 g/mol schließen ließen.

Die strukturelle Aufklärung von Dihydroaltersolanol B erfolgte durch massenspektrometrische, sowie NMR Experimente und deren Vergleich mit noch nicht publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe (Yang, 2013).

Die Untersuchung des in deuteriertem Methanol gemessenen  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.16) zeigte die Anwesenheit von insgesamt achtzehn Protonen. Es konnten zwei scharfe Singulett mit einer Integration von je drei Protonen identifiziert werden:  $\delta_{\text{H}}$  1,33 ppm wurde als Methylgruppe in Position 2 und  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ppm als Methoxyfunktion in Position 7 interpretiert. Des Weiteren konnte ein Aromat mit den Protonen H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,72 ppm) und H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  7,00 ppm) identifiziert werden, welche mit einer *meta*-Positionierung typischen Kopplungskonstante von 2,5 Hz koppelten. Wie auch beim Altersolanol B ließen sich zwei  $\text{CH}_2$ -Gruppen identifizieren, welche jeweils in die axialen und äquatorialen Protonen aufgespalten vorlagen.  $\text{CH}_2$ -1 resonierte bei  $\delta_{\text{H}}$  1,61 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  2,26 ppm, aufgespalten zum Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 14,4 und 11,7 Hz.  $\text{CH}_2$ -4 resonierte bei  $\delta_{\text{H}}$  1,85 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  2,37 ppm, ersteres zum Dublett vom Dublett und letzteres zum Multipllett aufgespalten. Das Dublett vom Dublett koppelte mit 24,5 und 11,7 Hz zu den benachbarten Protonen. Dieses Aufspaltungsmuster zeigte an, dass die benachbarte Position ebenfalls hydriert vorliegen musste. Zwei weitere Signale bei  $\delta_{\text{H}}$  2,96 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,13 ppm lagen als Triplet vom Dublett aufgespalten vor und koppelten mit 12,2 und 3,5 Hz, bzw. mit 12,2 und 3,5 Hz zu den benachbarten Protonen. Dies ermöglichte die Positionierung dieser beiden Protonen neben  $\text{CH}_2$ -1 und  $\text{CH}_2$ -4, sowie die Positionierung direkt nebeneinander. In Kombination mit dem Vergleich zum Altersolanol B um 2 amu erhöhten Molekulargewicht konnte die Hydrierung der Doppelbindung weiter untermauert werden. Dementsprechend wurden  $\delta_{\text{H}}$  2,96 ppm H-4a und  $\delta_{\text{H}}$  3,13 ppm H-9a zugeordnet. Durch die Kopplungskonstante von 3,5 Hz konnten die beiden Protonen axial-axial zueinander angeordnet werden. Die ROESY NMR Experimente von Yang *et al.* bestätigten die gleichseitige Ausrichtung.

Dihydroaltersolanol B ist ein neuer Naturstoff.

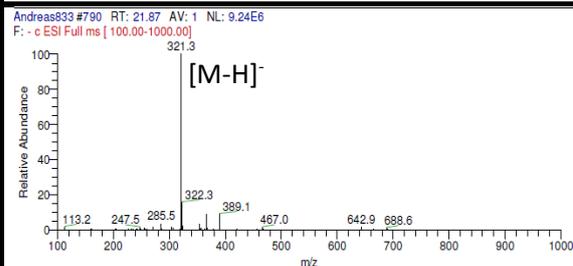
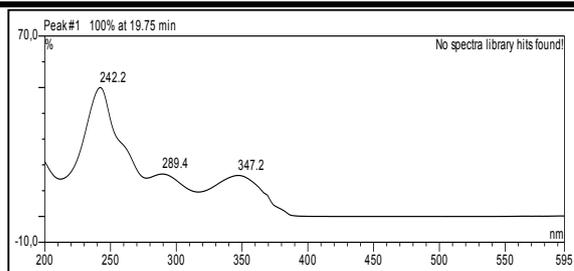
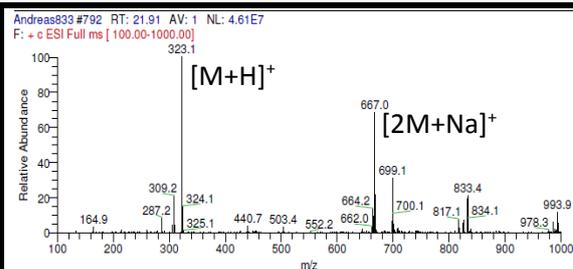
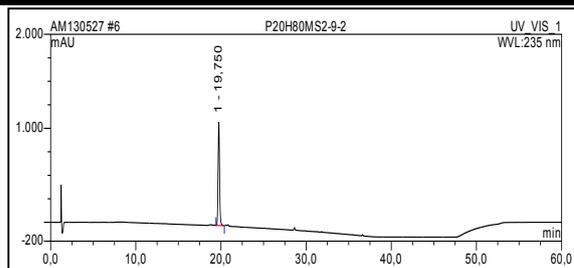
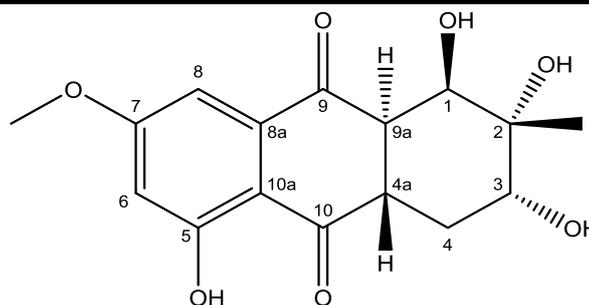
Tab. 3.16: NMR Daten von Dihydroaltersolanol B. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz	Dihydroaltersolanol B Yang <i>et al.</i> <sup>a)</sup>	
	500MHz (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )	600 MHz/150 MHz (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	ax. 1,61 (1H, dd, $J=14,4, 11,7\text{Hz}$ ) äq. 2,26 (1H, dd, $J=14,4, 3,5\text{Hz}$ )	ax. 1,60 (1H, dd, $J=14,2, 11,6\text{Hz}$ ) äq. 2,27 (1H, dd, $J=14,2, 3,5\text{Hz}$ )	38,4
2			70,7
3	3,45 (1H, m)	3,48 (1H, dd, $J=11,5, 4,6\text{Hz}$ )	74,2
4	ax. 1,85 (1H, dd, $J=24,5, 11,7\text{Hz}$ ) äq. 2,37 (1H, m)	ax. 1,84 (1H, dd, $J=24,5, 11,8\text{Hz}$ ) äq. 2,39 (1H, m)	30,8
4a	2,96 (1H, td, $J=12,2, 3,5\text{Hz}$ )	3,03 (1H, td, $J=12,5, 3,5\text{Hz}$ )	48,6
5			165,0
6	6,72 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	6,71 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	106,4
7			167,1
8	7,00 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	6,95 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	105,3
8a			113,2
9			197,7
9a	3,13 (1H, td, $J=12,2, 3,5\text{Hz}$ )	3,20 (1H, td, $J=12,2, 3,6\text{Hz}$ )	46,8
10			203,1
10a			105,6
2-Me	1,33 (3H, s)	1,31 (3H, s)	27,2
7-OMe	3,94 (3H, s)	3,94 (3H, s)	56,7

<sup>a)</sup> (Yang, 2013)

## Dihydroaltersolanol C

<b>Probencode</b>	P20H80MS2-9-2
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	7,1 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Oranges Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	322 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	19,8 min
<b>Drehwert</b>	-140° (c = 0,1; DMSO)



Dihydroaltersolanol C wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (7,1 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 242, 289 und 347 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  323,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  321,3  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 322 g/mol schließen ließen. Dieses ließ sich zudem durch die Beobachtung des  $m/z$  -Wertes von 667,0  $[2M+Na]^+$  untermauern.

## Ergebnisse

---

Die Struktur von Dihydroaltersolanol C wurde mit Hilfe von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC und ROESY NMR Experimenten (s. Tab. 3.17) aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte eine für die Altersolanolderivate typische Signalverteilung.

Analog zum Altersolanol C ließen sich zwei aromatische Protonen beobachten, H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,80 ppm) und H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,95 ppm), welche eine Kopplungskonstante von 2,5 Hz aufwiesen und somit als *meta*-ständig zueinander identifiziert wurden. Die Protonen des gesättigten Ringsystems traten bei  $\delta_{\text{H}}$  4,12 ppm (H-1, br s),  $\delta_{\text{H}}$  3,51 ppm (H-3, m),  $\delta_{\text{H}}$  1,64 ppm (H-4 äq, dt,  $J=12,2, 10,8, 4,3$  Hz) und  $\delta_{\text{H}}$  2,15 ppm (H-4 ax, m) auf. Außerdem ließen sich zwei Singulets bei  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,88 ppm beobachten, welche über eine Signalintensität von je drei Protonen verfügten und der Methylgruppe in Position 2 bzw. der Methoxygruppe in Position 7 zugeordnet wurden. Daneben konnte durch die Messung in deuteriertem DMSO die Hydroxylgruppe in Position 5 ( $\delta_{\text{H}}$  12,20 ppm) beobachtet werden. Diese konnte durch die starke Tieffeldverschiebung in Kombination mit der Ausbildung eines scharfen Singulets eindeutig positioniert werden. Im Vergleich zum Altersolanol C konnte zusätzlich ein weiteres Multiplett bei  $\delta_{\text{H}}$  3,30 ppm und ein weiteres Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  3,35 ppm beobachtet werden, welche jeweils für ein Proton integrierten. Dies, in Kombination mit dem im Vergleich zum Altersolanol C um 2 amu erhöhten Molekulargewicht, deutete auf die Hydrierung einer Doppelbindung hin. Die Verknüpfung der Ringsysteme wurde durch die HMBC Korrelationen bestätigt (s. Abb. 3.8a & b). Die Konstitution des aromatischen Rings konnte wie auch beim Altersolanol C durch die Korrelationen von H-6 zu C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  165,1 ppm), C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  104,0 ppm) und C-10a ( $\delta_{\text{C}}$  112,1 ppm), von H-8 zu C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  105,6 ppm), C-7 und C-10a, sowie von den Protonen der Methoxygruppe zu C-7 bestätigt werden. Zudem ließ sich die Korrelation des aromatischen H-8 zum Carbonylkohlenstoff in der Position C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  195,4 ppm) der Chinonpartialstruktur beobachten. Die Verknüpfung des ungesättigten Rings konnte durch die Korrelation von H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4,12 ppm) zu C-9 und C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  203,6 ppm) bestätigt werden. Des Weiteren konnten von H-1 die Korrelationen zu C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  71,9 ppm), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  70,4 ppm), C-4a ( $\delta_{\text{C}}$  42,2 ppm) und C-9a ( $\delta_{\text{C}}$  42,3 ppm) festgestellt werden. Die Protonen  $\text{CH}_2$ -4 zeigten Korrelationen zu C-2, C-3, C-4a und C-9a. Die Positionierung von 2-Me konnte durch die Korrelationen zu C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  69,4 ppm), C-2 und C-3 eindeutig vorgenommen werden. Ebenso konnte 5-OH durch die Korrelationen zu C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  162,8 ppm), C-6, C-7 und C-10a eindeutig positioniert werden. Die Korrelationen von  $\delta_{\text{H}}$  3,30 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,35 ppm zu C-4, C-4a, C-9, und C-10 erlaubte die Identifizierung einer Hydrierung in der Chinonpartialstruktur im Vergleich zum Altersolanol C. Die Korrelationen zu C-4, C-9, C-9a und C-10 verknüpften damit die gesättigte Partialstruktur mit der hydrierten Chinonstruktur. Im ROESY Spektrum (s. Abb. 3.9) konnten die Korrelationen zwischen H-1, 2-Me und H-9a, sowie zwischen H-3, H-2-Me und H-4 äq. und H-4 äq./ax. zu H-4a und H-9a beobachtet werden, jedoch keine zwischen H-1 und H-4a, wie es im Fall des Dihydroaltersolanol B zu erkennen war. Dies deutet darauf hin, dass die Protonen H-4a und H-9a

*trans*-ständig zueinander angeordnet sind. Da H-4a und H-9a jedoch teilweise mit Methanol überlagert sind, konnten die Kopplungskonstanten nicht berechnet werden und die Frage der relativen Konfiguration ist nicht eindeutig zu klären.

Dihydroaltersolanol C ist ein neuer Naturstoff.

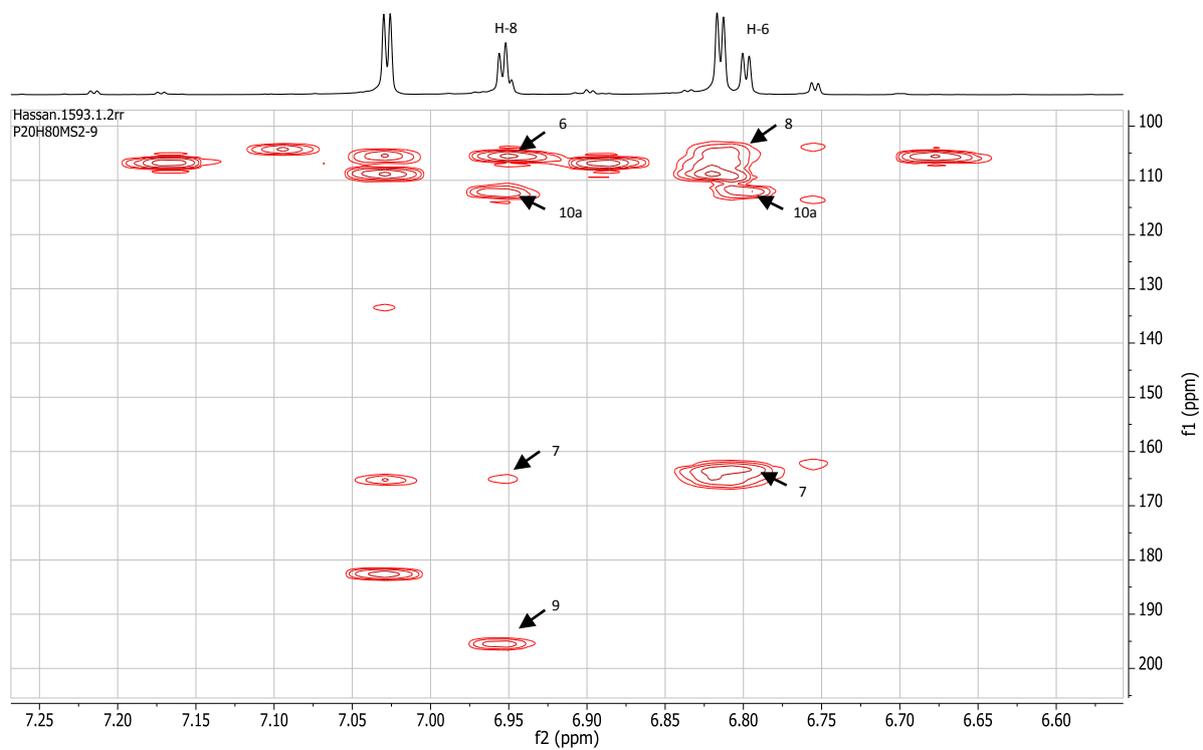
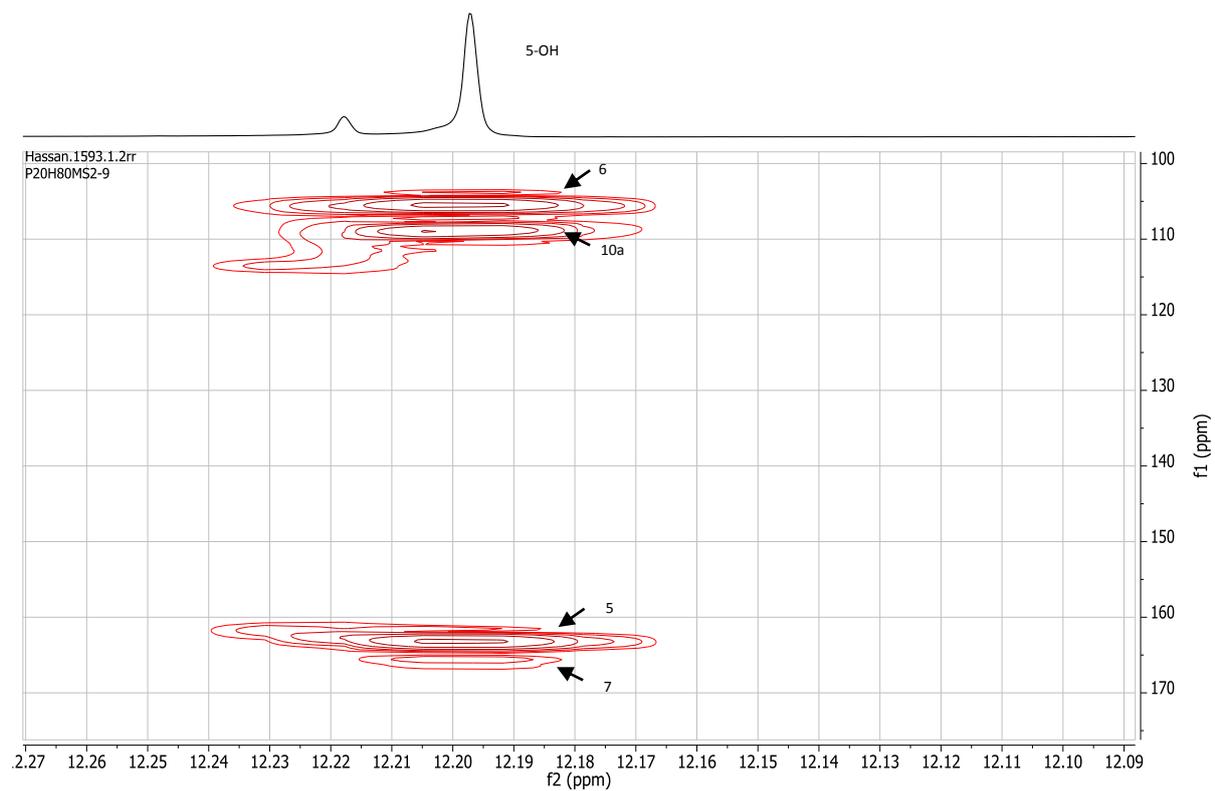
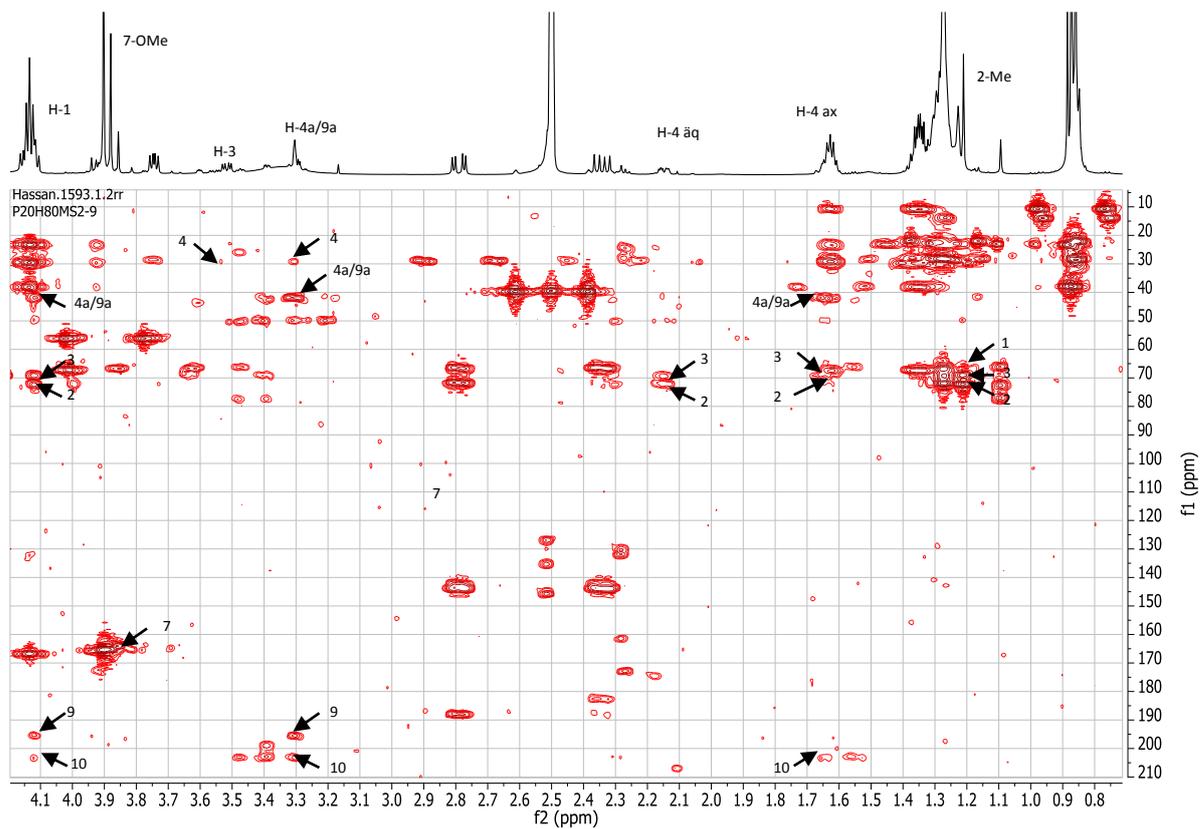
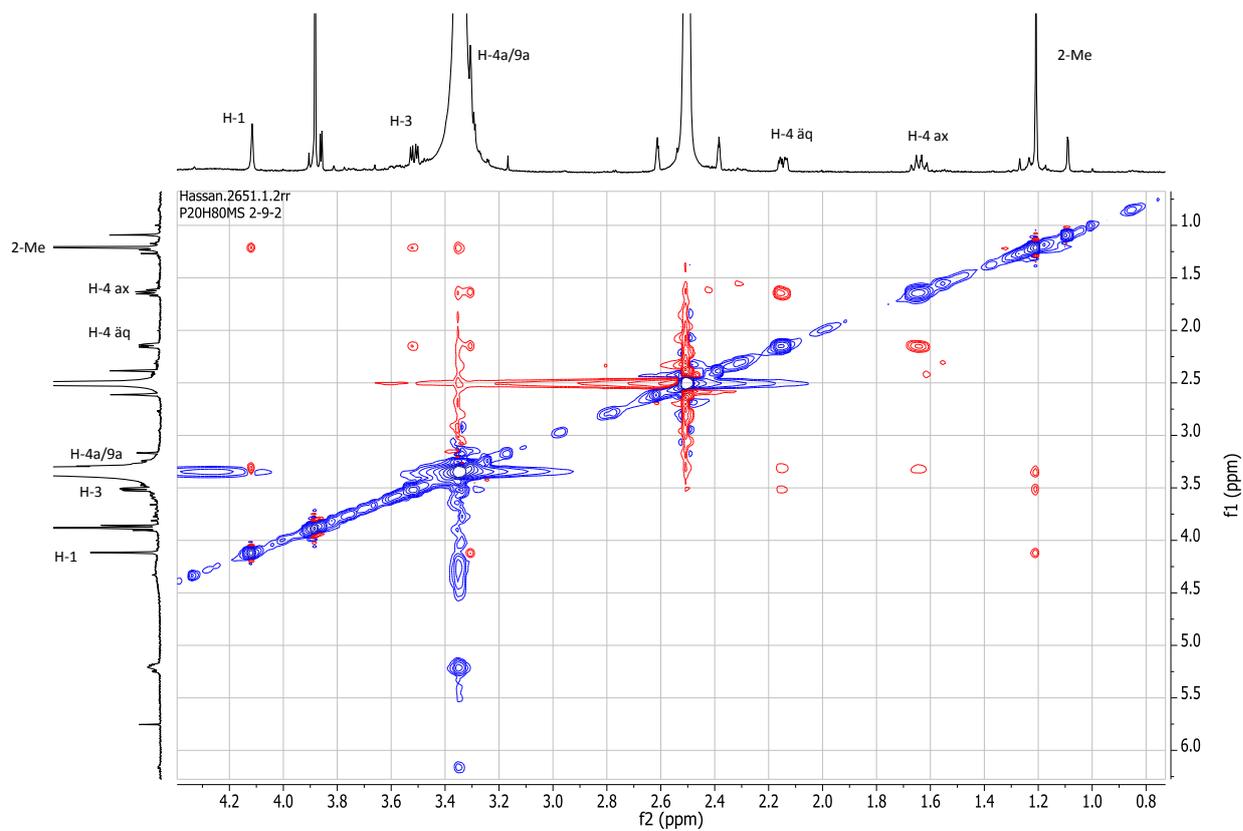


Abb. 3.8a: HMBC Spektrum von Dihydroaltersolanol C in DMSO- $d_6$  bei 600MHz.



**Abb. 3.8b:** HMBC Spektrum von Dihydroaltersolanol C in DMSO- $d_6$  bei 600MHz.



**Abb. 3.9:** ROESY Spektrum von Dihydroaltersolanol C in DMSO- $d_6$  bei 600MHz.

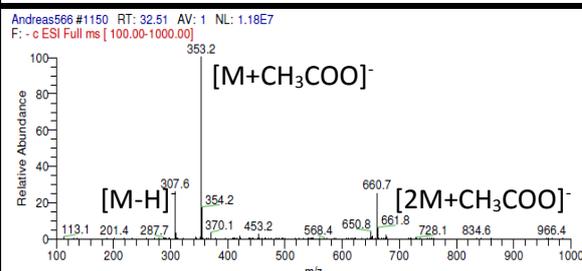
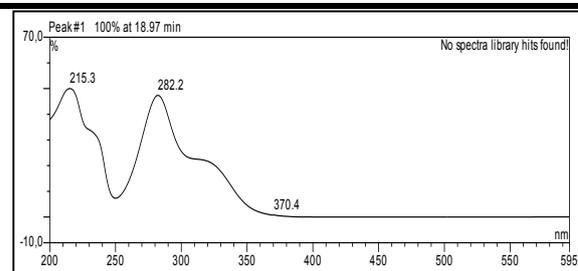
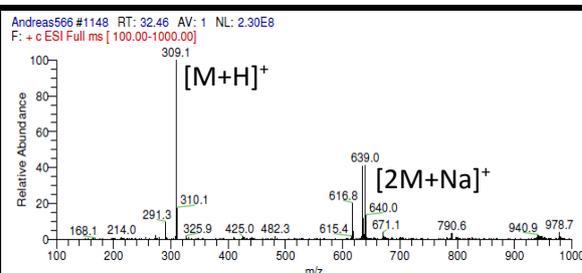
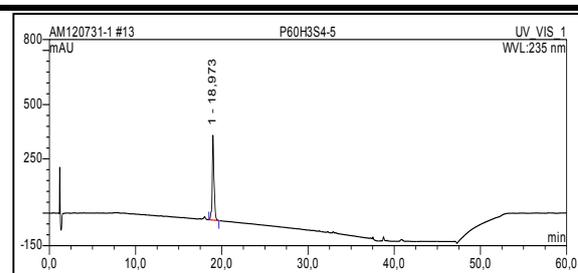
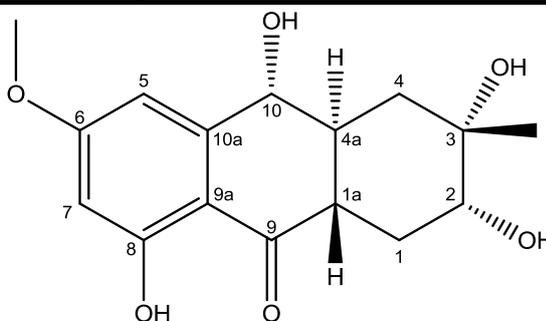
**Tab. 3.17:** NMR Daten von Dihydroaltersolanol C. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	ROESY
1	4,12 (1H, br s)	69,4	2, 3, 4a, 9, 9a, 10	H-2-Me
2		71,9		
3	3,51 (1H, m)	70,4	4	H-4 äq, H-2-Me
4	ax. 1,64 (1H, tdd, 12,2, 10,8, 4,7Hz) äq. 2,15 (1H, m)	29,3	2, 3, 4a, 9a, 10	H-4a/9a H3
4a	3,35 (1H, m)*	42,2	4, 4a, 9, 10	H-4ax/äq
5		162,8		
6	6,80 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	105,6	7, 8, 10a	H-8, H-7-OMe, 5-OH
7		165,1		
8	6,95 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	104,0	6, 7, 9, 10a	H-6, H-7-OMe
8a		136,4		
9		195,4		
9a	3,30 (1H, m)*	42,3	4, 4a, 9, 9a, 10	H-1, H-2Me
10		203,6		
10a		112,1		
2-Me	1,21 (3H, s)	22,9	1, 2, 3	H-1, H-3, H-9a
7-OMe	3,88 (3H, s)	56,1	7	H-6, H-8
5-OH	12,20 (1H, s)		5, 6, 7, 10a	H-6

\* vom Lösungsmittel teilweise überlagert

## Tetrahydroaltersolanol B

<b>Synonyme</b>	1,3,4,4a,9a,10-Hexahydro-2,3,8,10-tetrahydroxy-6-methoxy-3-methyl-[2R-(2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ )]-9(2H)-anthracenon
<b>Probencode</b>	P60H3S4-5 P60H2S4-7.2
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	9,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	308 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	19,0 min
<b>Drehwert</b>	-20° (c = 0,25; MeOH)



Tetrahydroaltersolanol B wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (9,2 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 215 nm und 283 nm auf. Das UV Spektrum erinnerte in seiner Ausprägung, wie auch das Altersolanol L, an die ebenfalls beschriebenen Verbindungen Isoscleron und 4-

Hydroxycyclaton. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, wie auch negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  309,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  353,1  $[M+CH_3COO]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 308 g/mol schließen ließen. Neben den Basispeaks waren im negativen ESI Modus weitere pseudomolekulare Ionen  $m/z$  307,6  $[M-H]^-$  und  $m/z$  660,7  $[2M+CH_3COO]^-$  zu erkennen, sowie im positiven ESI Modus  $m/z$  639,0  $[2M+Na]^+$ . Diese Beobachtungen ermöglichten die eindeutige Bestimmung des Molekulargewichtes.

Die Struktur des Tetrahydroaltersolanol B wurde mit Hilfe eines Abgleichs der aufgenommenen  $^1H$  NMR Daten mit Literaturwerten aufgeklärt.

Die Untersuchung des in deuteriertem DMSO aufgenommenen  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.18) zeigte die Anwesenheit von achtzehn Protonen. H-5 ( $\delta_H$  6,71 ppm, dd,  $J = 2,3, 1,1$  Hz) und H-7 ( $\delta_H$  6,36 ppm, d,  $J = 2,3$  Hz) wurden entsprechend ihrer chemischen Verschiebung und der Kopplungskonstante dem *meta*-koppelnden aromatischen System zugeordnet. Ebenfalls dem aromatischen System konnte das scharfe Singulett bei  $\delta_H$  3,82 ppm zugeordnet werden, als 6-OMe. Zusätzlich zu den aromatischen Signalen konnten die Hydroxylgruppen in Position 2 ( $\delta_H$  4,46 ppm), 3 ( $\delta_H$  3,90 ppm) und 10 ( $\delta_H$  5,64 ppm) beobachtet werden. Im Gegensatz zu den nicht hydrierten oder nur zweifach hydrierten Altersolanol-Derivaten ließ sich im Fall des Tetrahydroaltersolanol B keine Wasserstoffbrücke zwischen der aromatischen Hydroxylgruppe und dem in  $\beta$ -Position befindlichen Kohlenstoffatom erkennen, was auf eine Hydrierung der Chinonpartialstruktur hindeutete. Ebenfalls ließen sich die Protonen des gesättigten Ringsystems beobachten, welche sich als vier CH-Gruppen und zwei  $CH_2$ -Gruppen darstellten, wobei die axialen und äquatorialen Protonen deutlich aufgespalten vorlagen. Die beiden  $CH_2$ -Gruppen  $CH_2$ -1 und  $CH_2$ -4 resonierten bei  $\delta_H$  1,47 ppm (ax, q,  $J = 12,0, 12,0, 12,0$  Hz) und  $\delta_H$  2,15 ppm (äq, m), bzw. bei  $\delta_H$  1,22 ppm (ax, m) und  $\delta_H$  2,15 ppm (äq, m). Die CH-Gruppen H-4a resonierte bei  $\delta_H$  1,95 ppm als Multipllett. Ebenfalls dem gesättigten Ringsystem konnte die Methylgruppe, welche bei  $\delta_H$  1,17 ppm resonierte, als 2-Me zugeordnet werden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-22^\circ$  ( $c = 0,25$ ; MeOH), der Literaturwert beträgt  $-41,2^\circ$  ( $c = 0,068$ ; EtOH) (Okamura, *et al.*, 1996).

Tetrahydroaltersolanol B wurde zuvor bereits aus den endophytischen Pilzen *Stemphylium globiferum* (Teiten, *et al.*, 2013), *Alternaria solani* (Okamura, *et al.*, 1996) und *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012) isoliert.

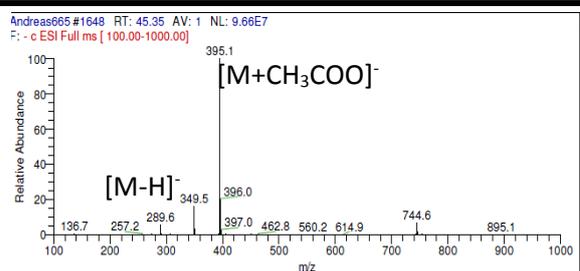
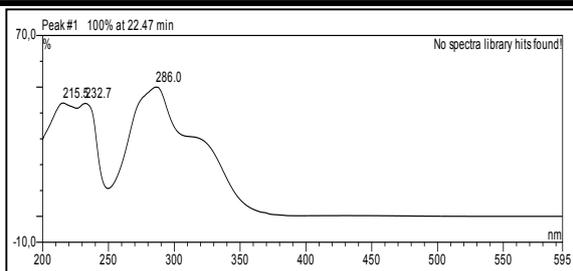
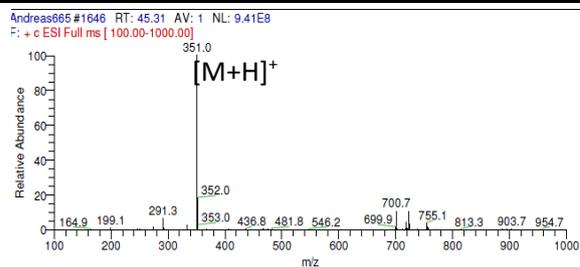
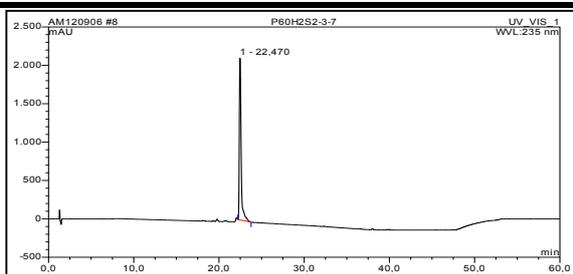
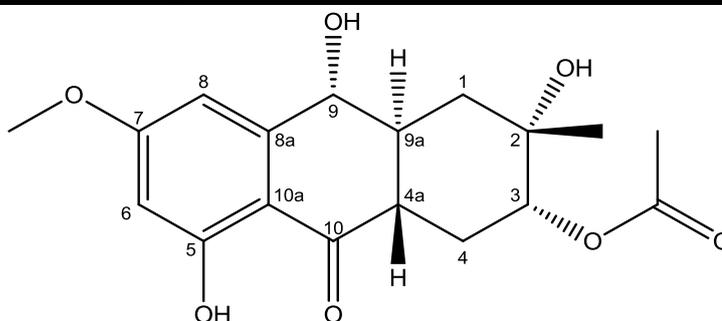
Tab. 3.18: NMR Daten von Tetrahydroalterolanol B. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	ax 1,47 (1H, q, $J=12,0, 12,0, 12,0\text{Hz}$ ) äq. 2,15 (1H, m)	ax. 1,47 (1H, m, $J=12,5, 12,1, 11,7\text{Hz}$ ) äq. 2,13 (1H, m, $J=12,5, 4,4, 4,0\text{Hz}$ )	29,2
1a	Überlagert von DMSO	2,46 (1H, m, $J=12,3, 12,1, 4,0\text{Hz}$ )	46,9
2		3,28 (1H, dd, $J=11,7, 4,4\text{Hz}$ )	73,4
3			69,5
4	ax. 1,22 (1H, m) äq. 2,15 (1H, m)	ax. 1,21 (1H, dd, $J=13,4, 12,1\text{Hz}$ ) äq. 2,17 (1H, dd, $J=13,4, 3,6\text{Hz}$ )	41,1
4a	1,95 (1H, m)	1,96 (1H, m, $J=12,3, 12,1, 10,9, 3,6\text{Hz}$ )	41,6
5	6,71 (1H, dd, $J=2,3, 1,1\text{Hz}$ )	6,71 (1H, dd, $J=2,4, 1,2\text{Hz}$ )	103,9
6			165,7
7	6,36 (1H, d, $J=2,3\text{Hz}$ )	6,35 (1H, d, $J=2,4\text{Hz}$ )	98,9
8			164,3
9			203,1
9a			109,1
10	4,28 (1H, m)	4,29 (1H, br d)	70,7
10a			151,6
3-Me	1,17 (3H, s)	1,17 (3H, s)	26,9
6-OMe	3,82 (3H, s)	3,82 (3H, s)	55,5
2-OH	4,46	4,43	
3-OH	3,90	3,78	
10-OH	5,64	5,62	

a) (Okamura, *et al.*, 1996)

## Tetrahydroaltersolanol F

<b>Synonyme</b>	2-(Acetyloxy)-1,3,4,4a,9a,10-hexahydro-3,8,10-trihydroxy-6-methoxy-3-methyl-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4a <i>S</i> ,9a <i>S</i> ,10 <i>R</i> )-9(2 <i>H</i> )-anthracenon
<b>Probencode</b>	P60H2S2-3-7
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,5 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weiß-gelbliches Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	350 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	22,5 min
<b>Drehwert</b>	-21° (c = 0,3; Aceton)



Tetrahydroaltersolanol F wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,5 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215, 233 und 286 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  351,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  395,1

$[M+CH_3COO]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 350 g/mol schließen ließen. Zudem konnte das pseudomolekulare Ion  $m/z$  349,5  $[M-H]^-$  beobachtet werden.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.19), aufgenommen in deuteriertem DMSO, ergab erneut das typische Signalmuster eines Anthrachinonderivates. Es zeigten sich die beiden mit 2,4 Hz koppelnden Protonen des *meta*-substituierten aromatischen Systems bei  $\delta_H$  6,37 ppm und  $\delta_H$  6,72 ppm. Die als scharfes Singulett ausgeprägte Wasserstoffbrücke zwischen 5-OH und der benachbarten Ketofunktion in Position 10 wurde bei  $\delta_H$  12,82 ppm identifiziert. Neben diesen Signalen konnten drei weitere Methylgruppen identifiziert werden, welche bei  $\delta_H$  1,11 ppm,  $\delta_H$  2,07 ppm und  $\delta_H$  3,82 ppm resonierten. Wie bei allen bisher beschriebenen Verbindungen, wurde die Methylgruppe bei  $\delta_H$  1,11 ppm Position 2 und die bei  $\delta_H$  3,82 ppm der Methoxygruppe der Position 7 zugeordnet. Im Unterschied zum Signalset des Tetrahydroaltersolanol B zeigte sich jedoch eine zusätzliche Methylgruppe, was in Kombination mit dem um 42 amu erhöhten Molekulargewicht auf eine Acetylgruppe schließen ließ. Die Positionierung der Acetylgruppe an Position 3 ließ sich durch die Tieffeldverschiebung des Protons in Position 3 von  $\delta_H$  3,28 ppm, im Fall des Tetrahydroaltersolanol B, zu  $\delta_H$  4,64 ppm begründen. Die beiden  $CH_2$ -Funktionen in den Positionen 1 und 4, wie auch die Methylgruppe 2-Me, zeigten gegenüber dem Tetrahydroalterolanol B kaum veränderte chemische Verschiebungen und traten bei  $\delta_H$  1,37 ppm und  $\delta_H$  2,17 ppm, beziehungsweise bei  $\delta_H$  1,64 ppm und  $\delta_H$  2,04 ppm auf.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-21^\circ$  ( $c = 0,3$ ; Aceton), der Literaturwert beträgt  $-33,1^\circ$  ( $c = 0,45$ ; Aceton) (Zheng, *et al.*, 2012).

Tetrahydroaltersolanol F wurde bisher nur aus einer mit einer Weichkoralle assoziierten *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012) isoliert.

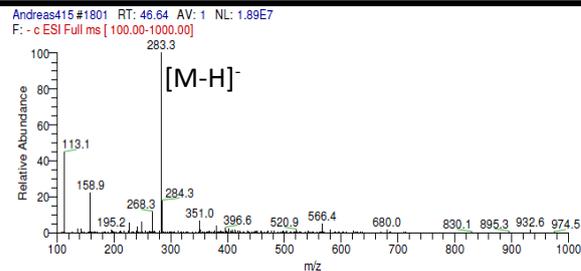
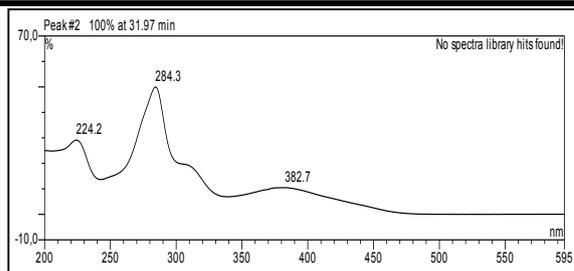
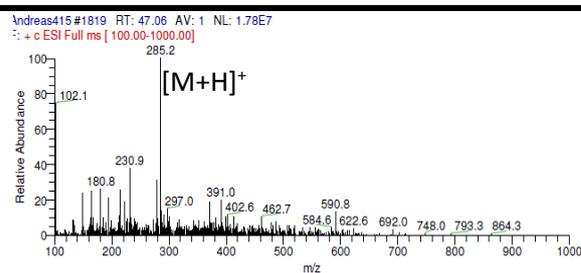
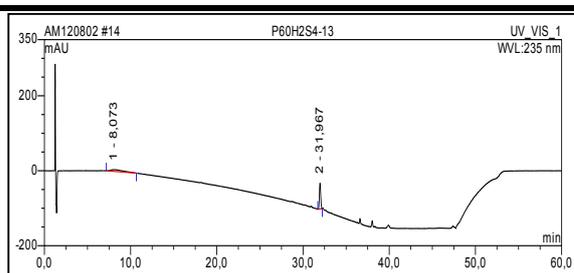
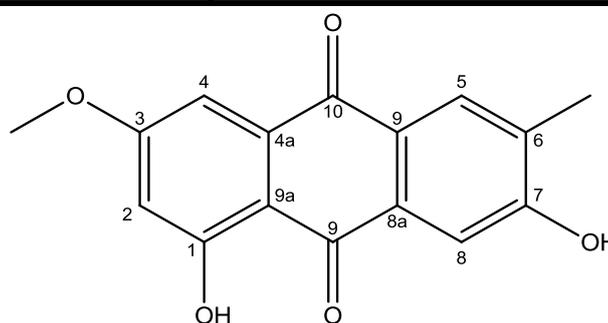
Tab. 3.19: NMR Daten von Tetrahydroaltersolanol F. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	ax. 1,37 (1H, m)	ax. 1,40 (1H, dd, <i>J</i> =13,8, 12,6Hz)	40,7
	äq. 2,16 (1H, m)	äq. 2,48 (1H, dt, <i>J</i> =13,6, 3,6Hz)	
2			70,2
3	4,64 (1H, dd, <i>J</i> =11,8, 4,4Hz)	4,79 (1H, dd, <i>J</i> =12,0, 4,8Hz)	76,9
4	ax. 1,64 (1H, m)	ax. 1,77 (1H, ddd, <i>J</i> =12,6, 12,0, 12,0Hz)	25,9
	äq. 2,04 (1H, m)	äq. 2,36 (1H, ddd, <i>J</i> =12,6, 4,8, 3,6Hz)	
4a	2,16 (1H, m)	2,45 (1H, ddd, <i>J</i> =12,0, 12,0, 3,6Hz)	46,9
5			165,5
6	6,37 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	6,31 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	99,9
7			166,5
8	6,72 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	6,73 (1H, br s)	104,3
9	4,34 (1H, d, <i>J</i> =10,7Hz)	4,39 (1H, d, <i>J</i> =10,8Hz)	72,6
9a	2,04 (1H, m)	2,21 (1H, dddd, <i>J</i> =12,6, 12,0, 10,8, 3,6Hz)	149,0
10			200,7
10a			109,4
2-Me	1,11 (3H, s)	1,26 (3H, s)	27,0
7-OMe	3,83 (3H, s)	3,82 (3H, s)	55,7
3-Acetyl	2,07 (3H, s)	2,14 (3H, s)	170,2
5-OH	12,82 (1H, s)	12,70 (1H, s)	21,1

a) (Zheng, *et al.*, 2012)

## Macrosporin

<b>Synonyme</b>	1,7-Dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthrachinon
<b>Probencode</b>	P60H-1 P60H2S4-13
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	3,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	284 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	32,0 min



Macrosporin wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (3,6 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 224, 284 und 383 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  285,2  $[M+H]^+$  und  $m/z$  283,3  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 284 g/mol schließen ließen.

## ***Ergebnisse***

---

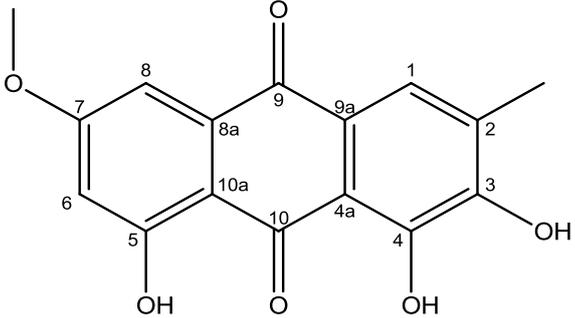
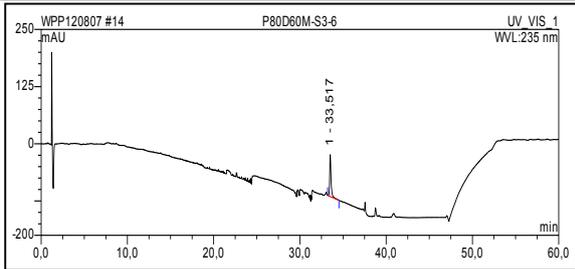
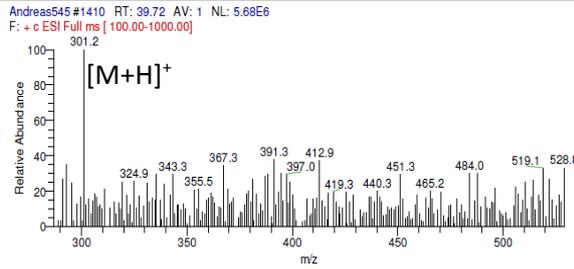
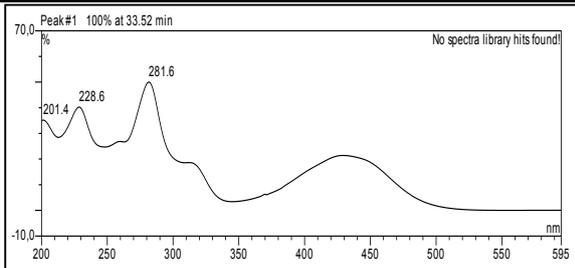
Die Struktur des Macrosporins wurde mit Hilfe eines Literaturvergleichs der aufgenommenen  $^1\text{H}$  NMR Daten, sowie den gewonnenen massenspektrometrischen Daten aufgeklärt. Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.20), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von zwei aromatischen Systemen, wobei es sich um ein *meta*-koppelndes System mit den Protonen H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  6,84 ppm) und H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  7,18 ppm) mit einer Kopplungskonstante von je 2,5 Hz, sowie um ein *para*-koppelndes System mit den Protonen H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  7,94 ppm, s) und H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  7,58 ppm, s) handelte. Neben den aromatischen Protonen konnten zwei Singulets mit der Integration von je drei Protonen beobachtet werden. Ein tieffeldverschobenes Signal lag bei  $\delta_{\text{H}}$  3,93 ppm vor und wurde der aromatischen Methoxygruppe in Position 3 zugeordnet, sowie ein hochfeldverschobenes Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  2,29 ppm, welches als die aromatische Methylgruppe in Position 6 identifiziert wurde.

Macrosporin wurde bereits aus *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012), *Ampelomyces* sp. (Aly, *et al.*, 2008), *Stemphylium* sp. (Debbab, *et al.*, 2009), *Phomopsis* sp. (Evidente, *et al.*, 2011, Wheeler, *et al.*, 1975) und *Ulocladium* sp. (Andersen and Hollensted, 2008) isoliert.

Tab. 3.20: NMR Daten von Macrosporin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 300 MHz/75 MHz (DMF- <i>d</i> <sub>7</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1			165,8
2	6,84 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	6,80 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	106,0
3			167,0
4	7,18 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	7,19 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	107,8
4a			136,0
5	7,94 (1H, s)	7,95 (1H, s)	130,8
6			133,0
7			162,5
8	7,58 (1H, s)	7,67 (1H, s)	111,8
8a			134,1
9			187,6
9a			111,1
10			181,2
10a			126,0
CH3	2,29 (1H, s)	2,37 (1H, s)	16,4
OCH3	3,93 (1H, s)	4,00 (1H, s)	56,7

a) (Suemitsu, *et al.*, 1989a)

Methylalaternin	
<b>Synonyme</b>	3,4,5-Trihydroxy-7-methoxy-2-methyl-anthrachinon
<b>Probencode</b>	P80D60MS3-6
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	300 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	33,5 min
	
	
	Keine Ionisierung

Methylalaternin wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,2 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 228, 282 und 438 nm auf. Das UV Spektrum erinnert in seiner Ausprägung an die bereits beschriebene Verbindung Macrosporin, wobei das Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich deutlich bathochrom verschoben vorlag. Im ESI Massenspektrum ließ sich nur im positiven

Ionisierungsmodus eine schwache Ionisierung beobachten. Durch das pseudomolekulare Ion mit  $m/z$  301,2  $[M+H]^+$  konnte auf ein Molekulargewicht von 300 g/mol geschlossen werden.

Die Struktur wurde anhand von NMR- und massenspektrometrischen Experimenten, sowie des Abgleichs der gewonnenen Daten mit Literaturwerten aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.21), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte drei Signale, die dem aromatischen Bereich zugeordnet wurden. Hierbei handelte es sich um ein *meta*-koppelndes aromatisches System mit Protonen, die bei  $\delta_{\text{H}}$  6,86 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,20 ppm resonierten und mit 2,5 Hz koppelten. Zusätzlich ließ sich ein weiteres aromatisches Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  7,59 ppm beobachten, welches auf einen weiteren, fünffach substituierten Aromaten schließen ließ. Zudem konnte ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  2,28 ppm mit einer Integration von drei Protonen beobachtet werden, welches als die aromatische Methylgruppe in Position 2 interpretiert wurde. Ebenfalls mit einer Integration von drei Protonen resonierend bei  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ppm, konnte ein Singulett detektiert werden, welches als die aromatische Methoxygruppe 7-OMe interpretiert wurde. Der Vergleich der gemessenen Daten mit den Literaturwerten (Hassan, 2007) ermöglichte die eindeutige Identifizierung der isolierten Substanz als Methylalaternin.

Methylalaternin wurde bereits aus den Pilzen *Stemphylium* sp. (Debbab, *et al.*, 2009) und *Ampelomyces* sp. (Aly, *et al.*, 2008), sowie der Pflanze *Cassia tora* (Lee, *et al.*, 1998) isoliert.

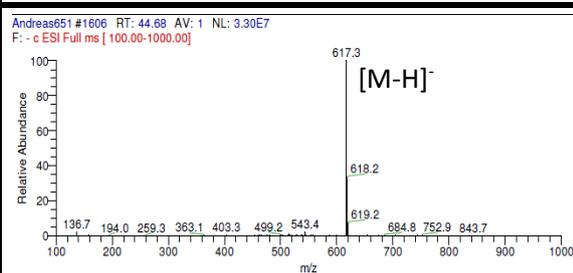
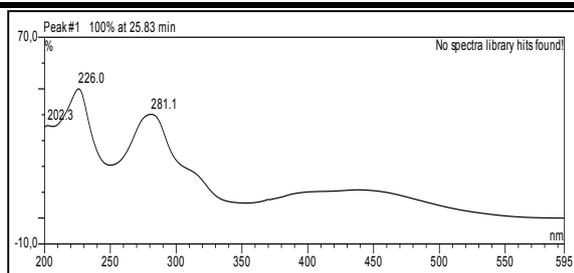
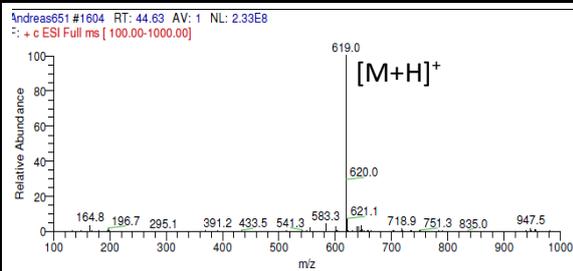
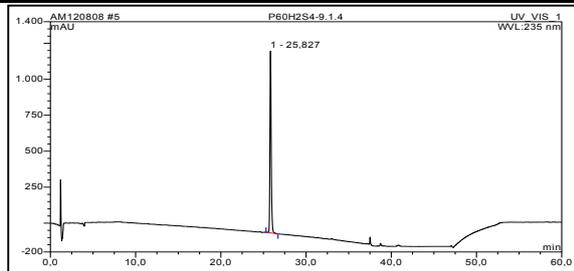
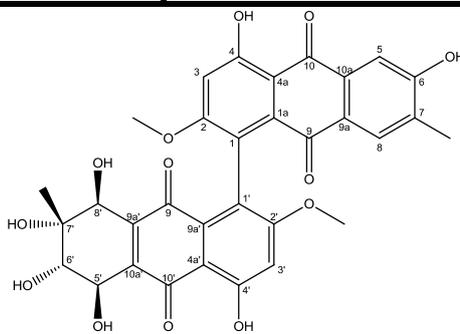
**Tab. 3.21:** NMR Daten von Methylalaternin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 500 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMF- $d_7$ )
2	6,86 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	6,84 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
4	7,20 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$ )	7,24 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
5	7,59 (1H, s)	7,62 (1H, s)
2-Me	2,28 (3H, s)	2,34 (3H, s)
7-OMe	3,94 (3H, s)	4,01 (3H, s)

a) (Hassan, 2007)

## Alterporriol A+B

<b>Synonyme</b>	5',6',7',8'-Tetrahydro-4,4',5',6,6',7',8'-heptahydroxy-2,2'- dimethoxy-7,7'-dimethyl-[1,1'-bianthracen]-9,9',10,10'-tetron
<b>Probencode</b>	P60H2S4-9.1.4
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	2,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Rote Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	618 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	25,8 min
<b>Drehwert</b>	-88° (c = 0,2; EtOH)



Alterporriol A und B wurden als ein Gemisch im Verhältnis 2:1 aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (2,4 mg). Die Substanzen wiesen drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 226, 281 und 441 nm auf, die typisch

für Anthrachinonderivate sind (vgl. Altersolanol A-C). Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  619,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  617,3  $[M-H]^-$  erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 618 g/mol schließen ließen.

Die strukturelle Aufklärung von Alterporriol A und B erfolgte mittels  $^1H$  NMR-, sowie massenspektrometrischen Experimenten und dem Literaturabgleich der gewonnenen Daten.

Bei der Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.22) zeigte sich ein doppeltes Set an Signalen, welche ihrer Integration nach in dem bereits beschriebenen Mengenverhältnis von ca. 2:1 zueinander standen. Insgesamt ließen sich je vier aromatische Protonen erkennen, welche im Fall des Alterporriol A bei  $\delta_H$  6,95 ppm,  $\delta_H$  7,56 ppm,  $\delta_H$  7,71 ppm und  $\delta_H$  6,93 ppm auftraten, beziehungsweise bei  $\delta_H$  6,95 ppm,  $\delta_H$  7,55 ppm,  $\delta_H$  7,70 ppm und  $\delta_H$  6,93 ppm im Fall des Alterporriol B. Diese Signale konnten den Positionen 4, 5, 8 und 3' zugeordnet werden. Neben den aromatischen Protonen konnten je zwei aromatische Methoxygruppen, die bei  $\delta_H$  3,70 ppm und  $\delta_H$  3,72 ppm, beziehungsweise  $\delta_H$  3,69 ppm und  $\delta_H$  3,71 ppm resonierten, den Positionen 2-OMe und 2'-OMe zugeordnet werden. Neben diesen Signalen waren je eine aromatische Methylgruppe bei  $\delta_H$  2,20 ppm zu erkennen, sowie eine aliphatische Methylgruppe bei  $\delta_H$  1,13 ppm, welche den Positionen 7-Me und 7'-Me entsprachen. Bemerkenswerterweise war hier kein Unterschied zwischen den beiden Verbindungen zu erkennen. Des Weiteren ließen sich drei aliphatische Signale bei  $\delta_H$  5,48 ppm,  $\delta_H$  4,04 ppm und  $\delta_H$  4,47 ppm, beziehungsweise bei  $\delta_H$  5,63 ppm,  $\delta_H$  4,04 ppm und  $\delta_H$  4,48 ppm, beobachten, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung in unmittelbarer Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen liegen mussten. Sie wurden daher als 5', 6' und 8' identifiziert. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen mit den Literaturwerten erlaubte die Identifizierung als Gemisch von Alterporriol A und B, Anthrachinon-Heterodimeren, welche aus den Untereinheiten Macrosporin und Altersolanol A aufgebaut sind. Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen ließen sich trotz identischer HPLC Retentionszeit durch eine axiale Chiralität der Biarylachse erklären.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-88^\circ$  ( $c = 0,2$ ; EtOH), der Literaturwert beträgt  $-235^\circ$  ( $c = 0,05$ ; EtOH) (Suemitsu, *et al.*, 1987).

Alterporriol A und B wurden bereits aus *Alternaria* sp. (Ohnishi, *et al.*, 1992, Yagi, *et al.*, 1993) und *Stemphylium* sp. (Debbab, *et al.*, 2009) isoliert.

**Tab. 3.22:** NMR Daten von Alterporriol A und B. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanzen 500 MHz		Lit. 400 MHz <sup>a)</sup>	
	Alterporriol A $\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	Alterporriol B $\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	Alterporriol A $\delta_{\text{H}}$ (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> )	Alterporriol B $\delta_{\text{H}}$ (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> )
4	6,95 (1H, s)	6,95 (1H, s)	6,80 (1H, s)	6,77 (1H, s)
5	7,56 (1H, s)	7,55 (1H, s)	7,50 (1H, s)	7,50 (1H, s)
8	7,71 (1H, s)	7,70 (1H, s)	7,70 (1H, s)	7,69 (1H, s)
3'	6,93 (1H, s)	6,93 (1H, s)	6,78 (1H, s)	6,77 (1H, s)
5'	5,48 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	5,63 (1H, d, <i>J</i> =6,7Hz)	4,63 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)	4,70 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)
6'	4,04 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	4,04 (1H, d, <i>J</i> =6,7Hz)	3,69 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)	3,76 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)
8'	4,47 (1H, s)	4,48 (1H, s)	4,26 (1H, s)	4,29 (1H, s)
7-Me	2,20 (3H, s)	2,20 (3H, s)	2,23 (3H, s)	2,54 (3H, s)
2-OMe	3,70 (3H, s)	3,69 (3H, s)	3,63 (3H, s)	3,68 (3H, s)
6-OH	13,06 (1H, s)	13,05 (1H, s)	13,10 (1H, s)	13,06 (1H, s)
4/4'-OH	13,67 (1H, s)	13,60 (1H, s)	13,74 (1H, s)	13,70 (1H, s)
7'-Me	1,13 (3H, s)	1,13 (3H, s)	1,27 (3H, s)	1,26 (3H, s)
2'-OMe	3,72 (3H, s)	3,71 (3H, s)	3,69 (3H, s)	3,67 (3H, s)

a) (Suemitsu, *et al.*, 1987)

## Alterporriol D

## Synonyme

6,6'-Dimethoxy-3,3'-dimethyl-1,2,3,4,8,1',2',3',4',8'-decahydroxy-1,1',2,2',4,4'-hexahydro-5,5'-bianthrachinon

## Probencode

P80D60MS2-1

## Quelle

*Pleospora* sp.

## Menge

1,8 mg

## Physikalische Beschreibung

Rote Nadeln

## Summenformel

 $C_{32}H_{30}O_{16}$ 

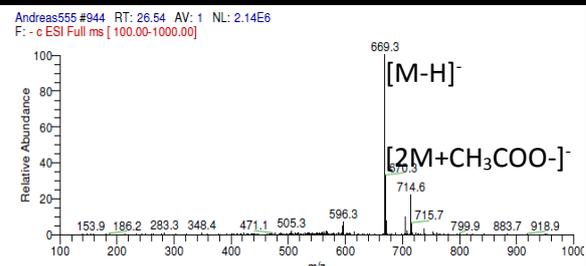
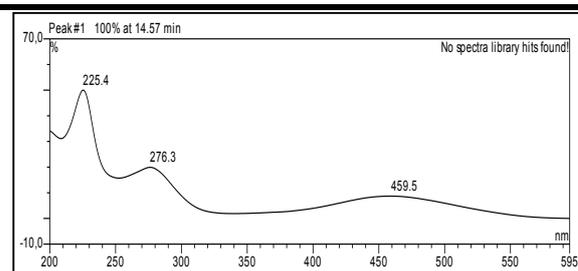
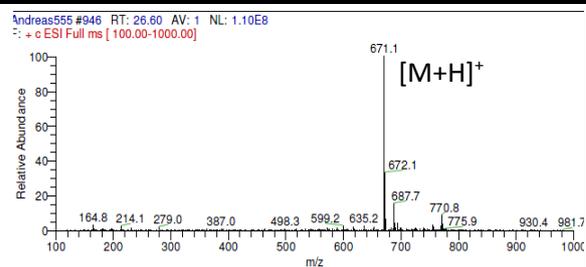
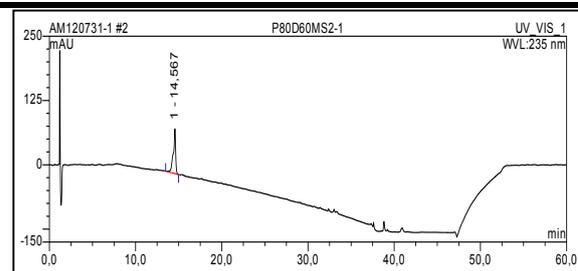
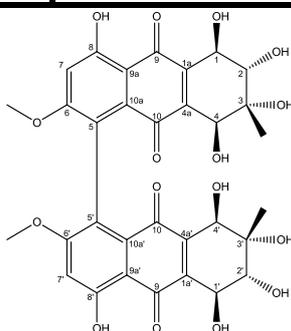
## Molekulargewicht

670 g/mol

## HPLC-Retentionszeit

14,6 min

## Drehwert

 $-100^\circ$  ( $c = 0,1$ ; EtOH)

Alterporriol D wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,8 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 225, 276 und 460 nm auf. Das UV Absorptionsspektrum erinnert in seiner Ausprägung an die strukturverwandten Verbindungen Altersolanol A und Altersolanol C. Im ESI Massenspektrum

ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  671,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  669,3  $[M-H]^-$  erkennen, durch welche auf ein Molekulargewicht von 670 g/mol geschlossen werden konnte. Neben den Basispeaks war auch das pseudomolekulare Ion  $m/z$  714,6  $[2M+CH_3COO]^-$  zu erkennen, was die Aussage bekräftigte.

Die Struktur wurde mit Hilfe eines  $^1H$  NMR Experimentes, sowie durch Vergleich des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Die Untersuchung des in deuteriertem Methanol aufgenommenen  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.23) zeigte die Anwesenheit von insgesamt nur zehn Protonen, was jedoch unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes von 670 g/mol als das Signalset eines Homodimers interpretiert wurde. Die Untersuchung des aromatischen Bereiches zeigte ein aromatisches Proton bei  $\delta_H$  6,85 ppm, welches aufgrund des Aufspaltungsmusters als Singulett der Position 7, bzw. 7' zugeordnet wurde. Ebenfalls dem Aromaten zugeordnet wurde ein Singulett bei  $\delta_H$  3,73 ppm und einer Integration von drei Protonen, als aromatische Methoxyfunktion in Position 6, bzw. 6'. Neben den aromatischen Signalen konnten vier Signale des aliphatischen Bereiches gefunden werden. Eines davon, resonierend bei  $\delta_H$  1,38 ppm und ebenfalls mit einer Integration von drei Protonen, konnte der Methylgruppe in Position 3, bzw. 3' zugeordnet werden. Des Weiteren ließ sich ein Singulett bei  $\delta_H$  4,32 ppm beobachten, welches aufgrund der Tieffeldverschiebung in einer unmittelbaren Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom stehen musste und, da es kein Aufspaltungsmuster zeigte, als H-4, bzw. H-4' identifiziert wurde. Die beiden übrigen Signale, die bei  $\delta_H$  4,75 ppm und  $\delta_H$  3,80 ppm auftraten, zeigten eine Kopplungskonstante von 7,4 Hz, was auf eine axiale-axiale Positionierung der Protonen zueinander hindeutet. Die chemische Tieffeldverschiebung zeigte auch hier die unmittelbare Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom an. Die beiden Signale konnten somit den Positionen 1 und 2, bzw. 1' und 2' zugeordnet werden. Aufgrund dieser Zuordnung und des Fehlens eines Signals von H-5 der Altersolanol A Untereinheit, mussten die beiden Substrukturen über eine Biarylachse zwischen 5 und 5' miteinander verknüpft sein. Ein weiteres Indiz hierfür war der Vergleich mit den chemischen Verschiebungen des Altersolanol A, was ebenfalls in deuteriertem Methanol gemessen wurde. H-6 von Altersolanol A lag dort mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta_H$  6,72 ppm vor, welches äquivalent zum H-7 des Alterporriol D ist. Letzteres liegt jedoch bei  $\delta_H$  7,13 ppm.

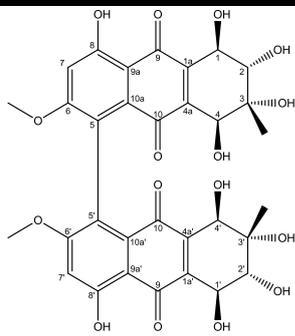
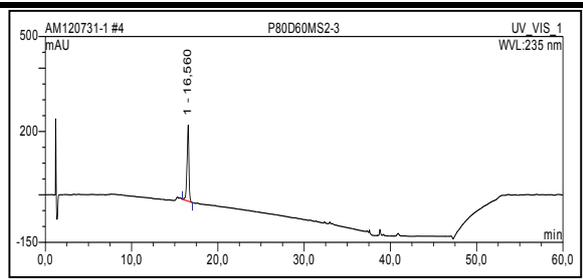
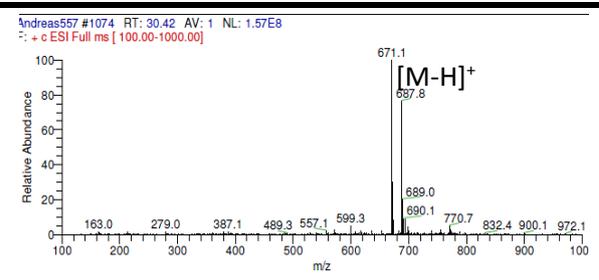
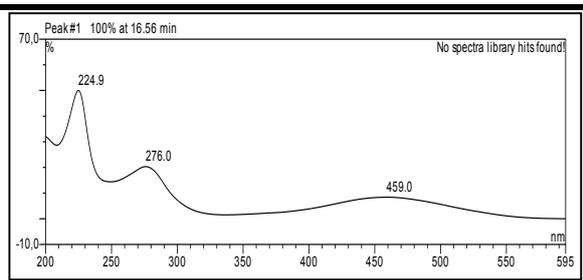
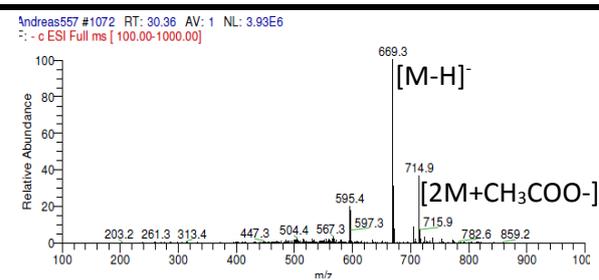
Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-100^\circ$  ( $c = 0,1$ ; EtOH), der Literaturwert beträgt  $-800^\circ$  ( $c = 0,01$ ; EtOH) (Suemitsu, *et al.*, 1989b).

Bisher wurde Alterporriol D aus *Stemphyllium globiferum* (Debbab, *et al.*, 2009), *Ampelomyces* sp. (Aly, *et al.*, 2008), *Alternaria porrii* (Ohnishi, *et al.*, 1991) und *Pleospora herbarum* (Kanamaru, *et al.*, 2012) isoliert.

**Tab. 3.23:** NMR Daten von Alterporriol D. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 400 MHz (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1/1'	4,75 (1H, d, <i>J</i> =7,4Hz)	4,74 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)	68,4
1a/1a'			144,5
2/2'	3,80 (1H, d, <i>J</i> =7,4Hz)	4,32 (1H, d, <i>J</i> =6,5Hz)	73,7
3/3'			72,8
4/4'	4,32 (1H, s)	4,26 (1H, s)	68,2
4a/4a'			142,7
5/5'			121,4
6/6'			163,6
7/7'	6,85 (1H, s)	6,77 (1H, s)	104,1
8/8'			163,5
9/9'			188,8
9a/9a'			109,3
10/10'			184,0
10a/10a'			129,8
3-Me/3'-Me	1,38 (3H, s)	1,33 (3H, s)	22,2
6-OMe/6'-OMe	3,73 (3H, s)	3,71 (3H, s)	56,7

a) (Hassan, 2007)

Alterporriol E	
<b>Synonyme</b>	6,6'-Dimethoxy-3,3'-dimethyl-1,2,3,4,8,1',2',3',4',8'-decahydroxy-1,1',2,2',4,4'-hexahydro-5,5'-bianthrachinon
<b>Probencode</b>	P80D60MS2-3
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Rote Nadeln
<b>Summenformel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	670 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	16,6 min
<b>Drehwert</b>	-384° (c = 0,1; EtOH)
	
	
	

Alterporriol E wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,2 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 225, 276 und 459 nm auf. Das UV Spektrum erinnert in seiner Ausprägung, wie auch das des Alterporriol D, an die strukturverwandten Verbindungen Altersolanol A und Altersolanol C. Im

ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  671,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  669,3  $[M-H]^-$  erkennen, durch welche auf ein Molekulargewicht von 670 g/mol geschlossen werden konnte. Neben den Basispeaks war auch das pseudomolekulare Ion  $m/z$  714,9  $[2M+CH_3COO]^-$  zu erkennen.

Die Struktur wurde, wie auch die des Alterporriol D mit Hilfe von  $^1H$  NMR Daten, sowie dem Vergleich des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Die Untersuchung des in deuteriertem Methanol aufgenommenen  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.24) zeigte die Anwesenheit von nur zehn Protonen, welches jedoch unter Berücksichtigung des gleichen Molekulargewichtes wie beim Alterporriol D von 670 g/mol, als das Signalset eines Homodimers interpretiert wurde. Die Untersuchung des aromatischen Bereiches zeigte die Anwesenheit von einem aromatischen Proton bei  $\delta_H$  6,79 ppm, welches aufgrund der Ausprägung als Singulett der Position 7, bzw. 7' zugeordnet wurde. Ebenfalls dem Aromaten wurde ein Singulett, auftretend bei  $\delta_H$  3,70 ppm und mit einer Integration von drei Protonen, als die aromatische Methoxyfunktion in Position 6, bzw. 6' zugeordnet. Neben den aromatischen Signalen konnten vier Signale des aliphatischen Bereiches identifiziert werden. Eines davon, resonierend bei  $\delta_H$  1,36 ppm und mit einer Integration von drei Protonen, konnte der Methylgruppe in Position 3, bzw. 3' zugeschrieben werden. Des Weiteren ließ sich ein Singulett bei  $\delta_H$  4,29 ppm beobachten, welches aufgrund der Tieffeldverschiebung in einer unmittelbaren Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom stehen musste und somit, ebenfalls durch die fehlende Aufspaltung begründet, der Position 4 bzw. 4' zugeordnet werden konnte. Die beiden übrigen Signale bei  $\delta_H$  4,75 ppm und  $\delta_H$  3,80 ppm zeigten eine Kopplungskonstante von 7,2 Hz, die auf eine axiale-axiale Positionierung der Protonen zueinander hindeutete, wie es bereits beim Alterporriol D zu beobachten war. Die chemische Tieffeldverschiebung zeigt auch hier erneut die unmittelbare Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom. Die beiden Signale konnten somit den Positionen 1 und 2, bzw. 1' und 2' zugeordnet werden. Mit Ausnahme eines fehlenden Signals für H-5 entsprach das Signalmuster erneut dem des Altersolanol A. Die Verknüpfung der beiden Altersolanols A Untereinheiten musste mit gleicher Begründung identisch zu der des Alterporriol D beschaffen sein. Die voneinander abweichende Retentionszeit der beiden Alterporriolderivate, trotz chemisch identischer Teilstrukturen, kann auf die unterschiedliche Orientierung der Biarylachse zurückgeführt werden, wie es bereits durch NOESY NMR Experimente (Suemitsu, *et al.*, 1989b) und CD-Spektrometrie (Kanamaru, *et al.*, 2012) nachgewiesen wurde.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-384^\circ$  ( $c = 0,1$ ; EtOH), der Literaturwert  $-695^\circ$  ( $c = 0,01$ ; EtOH) (Suemitsu, *et al.*, 1989b).

Alterporriol E wurde bisher aus *Stemphyllium globiferum* (Debbab, *et al.*, 2009), *Ampelomyces* sp. (Aly, *et al.*, 2008), *Alternaria porri* und *Alternaria solani* (Suemitsu, *et al.*, 1990), sowie

## Ergebnisse

*Pleospora herbarum* (Kanamaru, *et al.*, 2012) isoliert. Auffällig ist das grundsätzlich immer simultane Vorhandensein von Alterporriol D und E.

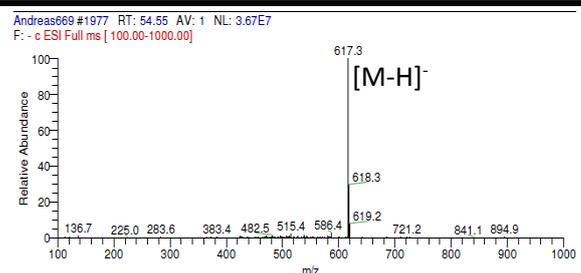
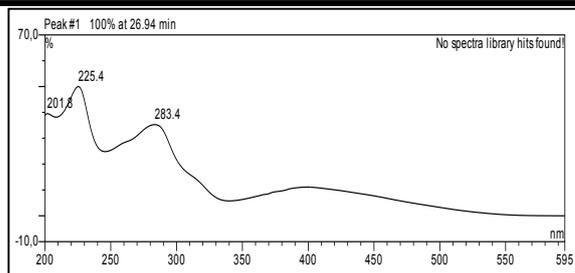
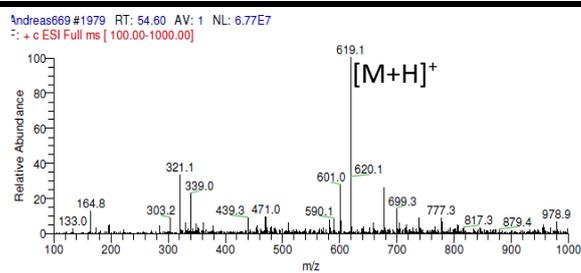
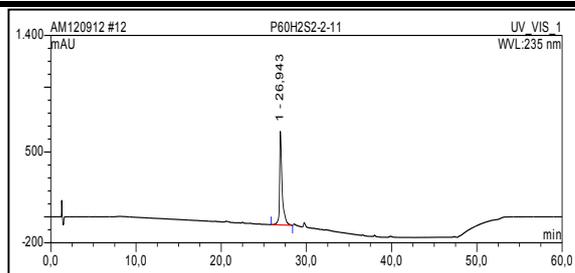
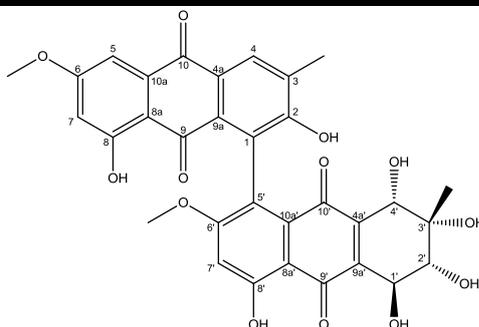
**Tab. 3.24:** NMR Daten von Alterporriol E. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz		Lit. 400 MHz (THF- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	500 MHz		$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
	$\delta_{\text{H}}$ (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )			
1/1'	4,75 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	4,75 (1H, d, <i>J</i> =6,4Hz)	68,3	
1a/1a'			143,5	
2/2'	3,80 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	4,35 (1H, d, <i>J</i> =6,4Hz)	73,8	
3/3'			72,9	
4/4'	4,29 (1H, s)	4,26 (1H, s)	68,3	
4a/4a'			142,8	
5/5'	--	--	122,5	
6/6'			164,7	
7/7'	6,79 (1H, s)	6,77 (1H, s)	103,9	
8/8'			163,9	
9/9'			188,8	
9a/9a'			109,3	
10/10'			183,8	
10a/10a'			128,9	
3-Me/3'-Me	1,36 (3H, s)	1,36 (3H, s)	22,2	
6-OMe/6'-OMe	3,70 (3H, s)	3,67 (3H, s)	56,8	

a) (Hassan, 2007)

## Alterporriol N

<b>Synonyme</b>	5,5',6,6',7,7',8,8'-Octahydro-1',2,2',3',4',8,8'- octahydroxy-2,2'-dimethoxy-3,3'-dimethyl-(1'R,2'R,3'R, 4'R)-1,5'-bianthracen
<b>Probencode</b>	P60H2S2-3-11
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Rote Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	618 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	27,0 min
<b>Drehwert</b>	+121° (c = 0,3; MeOH)



Alterporriol N wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,4 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 225, 283 und 408 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven als auch im negativen

## ***Ergebnisse***

---

Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  619,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  617,3  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 618 g/mol schließen lassen.

Die Struktur wurde anhand des Abgleiches der  $^1\text{H}$  NMR Spektraldaten und des Drehwerts aufgeklärt. Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.25), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Präsenz von vier aromatischen Protonen welche bei  $\delta_{\text{H}}$  8,04 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,17 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6,77 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,96 ppm auftraten. Die beiden als Singulett erscheinenden Signale bei  $\delta_{\text{H}}$  8,04 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,96 ppm wurden den Positionen 4 und 7' zugeordnet, die beiden anderen Signale, mit 2,1 Hz koppelnd, den Positionen 5 und 7 des *meta*-koppelnden Aromaten. Ebenfalls dem Aromaten konnte ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  2,32 ppm, mit einer Integration von drei Protonen, als die aromatische Methylgruppe in Position 3 zugeordnet werden. Insgesamt konnten drei weitere Methylgruppen identifiziert werden, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  3,71 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,90 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  1,39 ppm resonierten und den Positionen 6, 6' und 3' zugeschrieben wurden. Neben diesen Signalen konnten drei weitere Signale im tieffeldverschobenen aliphatischen Bereich bei  $\delta_{\text{H}}$  4,48 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,57 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  4,05 ppm beobachtet werden, welche als die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen liegenden Positionen 1', 2' und 4' identifiziert wurden. Die Kopplungskonstanten von 7,2 Hz zwischen den Protonen 1' und 2' deuteten auf eine axiale Positionierung der Protonen zueinander hin. Im Tieffeld ließen sich zudem drei scharfe Singuletts mit einer Integration von je einem Protonen erkennen, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  9,46 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  13,09 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  12,52 ppm auftraten. Diese wurden den Wasserstoffbrücken ausbildenden Hydroxylgruppen in den Positionen 2, 8 und 8' zugeordnet. Die Tatsache der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke der Hydroxylgruppe in Position 2 zur Ketogruppe in Position 10' zeigt die unmittelbare räumliche Nähe dieser beiden Gruppen zueinander. Die Struktur konnte daher als ein Heterodimer aus Macrosporin und Altersolanol A beschrieben werden. Die Verknüpfung über eine Biarylachse zwischen C-1 und C-5 konnte durch den Vergleich der chemischen Verschiebung der Protonen zwischen dem Alterporriol N und den Untereinheiten bestätigt werden. So konnte das Fehlen von H-8 der Macrosporin-, sowie der Altersolanol A Untereinheit beobachtet werden, wohingegen die übrigen Signale mit nahezu identischer chemischer Verschiebung vorlagen.

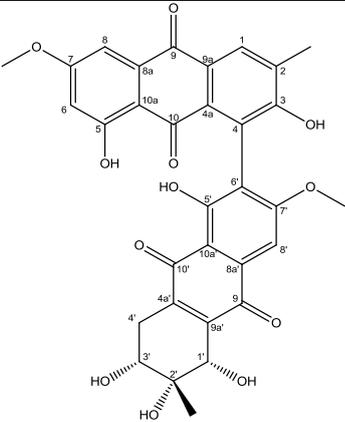
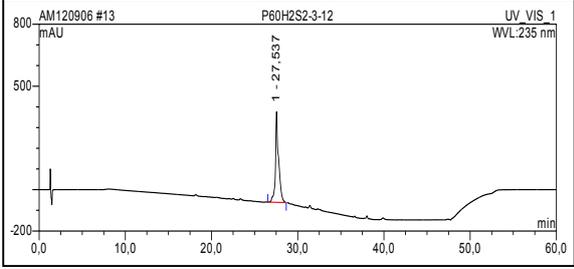
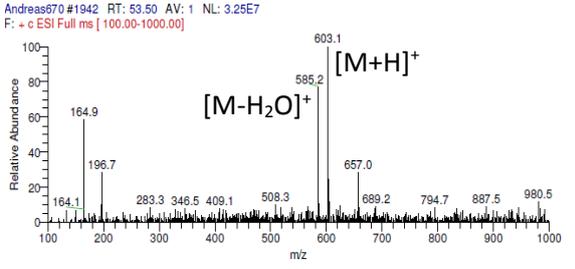
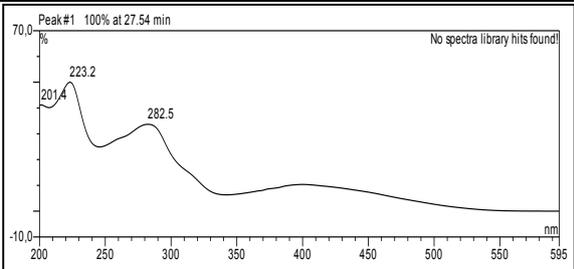
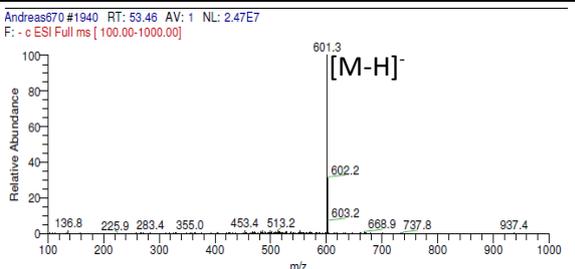
Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+121^\circ$  ( $c = 0,3$ ; MeOH), der Literaturwert  $+203,2^\circ$  ( $c = 0,033$ ; MeOH) (Yagi, *et al.*, 1993).

Bisher wurde Alterporriol N nur aus *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012) isoliert.

Tab. 3.25: NMR Daten von Alterporriol N. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 500 MHz (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1			132,6
2			160,5
3			131,1
4	8,04 (1H, s)	8,07 (1H, s)	130,8
4a			126,8
5	7,17 (1H, d, <i>J</i> =2,1Hz)	7,22 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	107,6
6			167,3
7	6,77 (1H, d, <i>J</i> =2,1Hz)	6,59 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	106,8
8			166,2
8a			112,0
9			189,2
9a			128,0
10			183,2
10a			136,2
1'	4,48 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	4,74 (1H, d, <i>J</i> =7,6Hz)	70,6
2'	3,57 (1H, d, <i>J</i> =7,2Hz)	3,69 (1H, d, <i>J</i> =7,6Hz)	75,2
3'			74,7
4'	4,05 (1H, s)	4,26 (1H, s)	70,0
4a'			143,8
5'			124,8
6'			166,3
7'	6,96 (1H, s)	6,87 (1H, s)	105,0
8'			166,5
8a'			113,4
9'			190,7
9a'			143,9
10'			185,6
10a'			132,9
3-Me	2,32 (3H, s)	2,32 (3H, s)	17,3
6-OMe	3,71 (3H, s)	3,74 (3H, s)	57,1
3'-Me	1,39 (3H, s)	1,32 (3H, s)	22,3
6'-OMe	3,90 (3H, s)	3,87 (3H, s)	56,2
2-OH	9,46 (1H, s)		
8-OH	13,09 (1H, s)		
8'-OH	12,52 (1H, s)		

a) (Debbab, *et al.*, 2012)

Alterporriol P	
<b>Synonyme</b>	1',2',3',4'-Tetrahydro-1',2,3,3',5,5'-hexahydroxy-7,7'-dimethoxy-2,2'-dimethyl-(1'R,2'R,3'R)-[4,6,2'-bianthracen]-9,9',10,10'-tetron
<b>Probencode</b>	P60H2S2-2-12
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	rotes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	602 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	27,5 min
<b>Drehwert</b>	-120° (c = 0,1; Aceton)
	
	
	

Alterporriol P wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,2 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 201, 223 und 283 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, wie auch negativen

Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  603,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  601,3  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 602 g/mol schließen ließen. Dieses konnte durch die Beobachtung des pseudomolekularen Ions bei  $m/z$  585,2  $[M+H-H_2O]^+$  untermauert werden.

Die Struktur wurde anhand des Abgleichs der  $^1\text{H}$  NMR Spektraldaten und des Drehwerts aufgeklärt. Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.26), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte wie auch bei den anderen Alterporriolderivaten vier aromatische Protonen, von denen zwei als Singulets bei  $\delta_{\text{H}}$  8,05 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,95 ppm, interpretiert als H-1 und H-8', sowie zwei als Dubletts, mit 2,6 Hz koppelnd, auftraten. Letztere wurden den *meta*-koppelnden Protonen des Aromaten in Position 6 und 8 zugeschrieben. Neben den aromatischen Protonen ließen sich zwei Signale aromatischer Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3,91 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,71 ppm beobachten, welche den Positionen 12 und 12' zugeordnet wurden. Des Weiteren zeigte das  $^1\text{H}$  NMR Spektrum die Anwesenheit von zwei weiteren Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  1,15 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  2,33 ppm, welche sich als die aliphatische Methylgruppe 11', sowie die aromatische Methylgruppe in Position 11 darstellten. Im Hochfeldbereich zeigten sich zudem zwei Signale mit einer Verschiebung von  $\delta_{\text{H}}$  4,06 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,97 ppm, die den Positionen 1' und 3' angerechnet wurden. Typischerweise zeigten sich auch bei diesem Alterporriolderivat drei scharf ausgeprägte Singulets im Tieffeld bei  $\delta_{\text{H}}$  9,40 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  13,16 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  12,55 ppm, welche als die Hydroxylgruppen 3-OH, 5-OH und 8'-OH festgelegt wurden. Die Verschiebung von 5-OH und 5'-OH konnte durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu der in  $\beta$ -Position befindlichen Ketogruppe erklärt werden. Die Struktur konnte daher als ein Heterodimer aus Macrosporin und Altersolanol C beschrieben werden. Die Verknüpfung über eine Biarylachse zwischen C-4 und C-6' konnte über den Vergleich der chemischen Verschiebung der Protonen zwischen dem Alterporriol P und den Untereinheiten bestätigt werden. So konnte das Fehlen von H-8 des Macrosporins, sowie des Altersolanol C beobachtet werden, wohingegen die übrigen Signale mit nahezu identischer chemischer Verschiebung vorlagen.

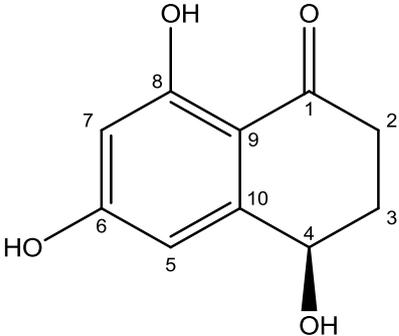
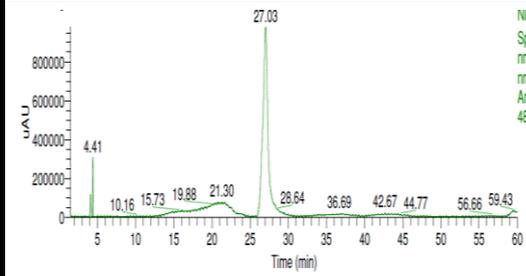
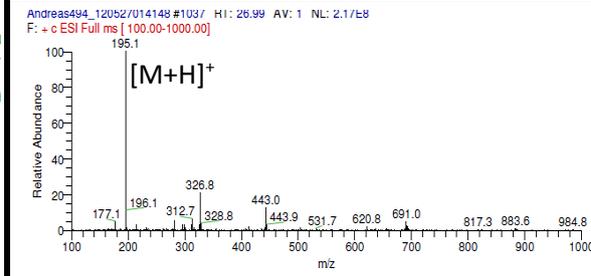
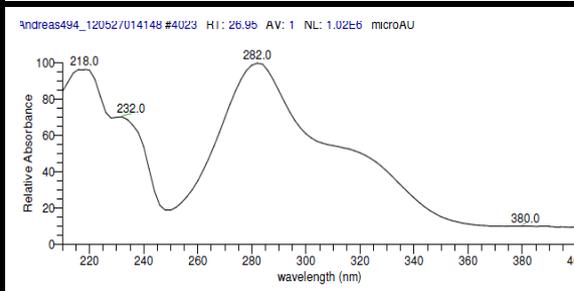
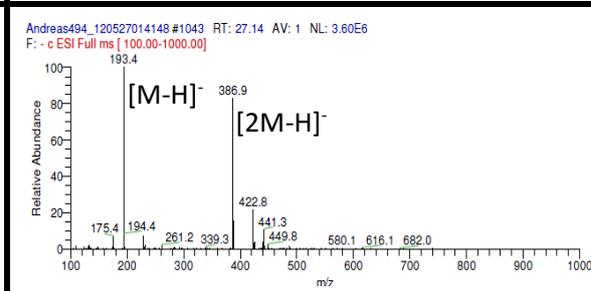
Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-120^\circ$  ( $c = 0,1$ ; Aceton), der Literaturwert beträgt  $-28^\circ$  ( $c = 0,35$ ; Aceton) (Zheng, *et al.*, 2012).

Alterporriol P wurde bisher nur aus *Alternaria* sp. (Zheng, *et al.*, 2012) isoliert.

Tab. 3.26: NMR Daten von Alterporriol P. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 500 MHz (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	8,05 (1H, s)	8,14 (1H, s)	131,4
1a			127,1
2			133,0
3			160,2
4			129,1
4a			132,4
5			168,0
6	6,78 (1H, d, <i>J</i> =2,6Hz)	6,66 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	107,6
7			166,8
8	7,18 (1H, d, <i>J</i> =2,6Hz)	7,26 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	108,7
9			183,1
9a			133,3
10			191,1
10a			112,7
11	2,33 (3H, s)	2,40 (3H, s)	18,1
7-OMe	3,91 (3H, s)	3,96 (3H, s)	58,1
3-OH	9,40 (1H, s)		
5-OH	13,16 (1H, s)		
1'	4,06 (1H, br s)	4,29 (1H, s)	71,5
1a'			144,7
2'			74,3
3'	3,97 (1H, br s)	3,93 (1H, dd, <i>J</i> =9,0, 5,4Hz)	69,6
4'	Überlagert von DMSO	ax. 2,54 (1H, dd, <i>J</i> =19,8, 9,0Hz) äq. 2,98 (1H, dd, <i>J</i> =19,8, 5,4Hz)	28,5
4a'			145,5
5'			168,0
6'			123,8
7'			166,8
8'	6,95 (1H, s)	6,88 (1H, s)	105,6
9'			185,8
9a'			137,0
10'			189,0
10a'			111,9
11'	1,15 (3H, s)	1,36 (3H, s)	23,1
7'-OMe	3,71 (3H, s)	3,78 (3H, s)	57,6
5'-OH	12,55 (1H, s)		

a) (Zheng, *et al.*, 2012)

Isoscleron	
<b>Synonyme</b>	3,4-Dihydro-4,6,8-trihydroxy-1(2 <i>H</i> )-naphthalenon; (-)-Regiolon; (4 <i>S</i> )-4,8-Dihydroxy- $\alpha$ -tetralon; ( <i>S</i> )-(+)-Isoscleron; ( <i>S</i> )-Isoscleron; Regiolon
<b>Probencode</b>	P20H-70M-4
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	5,8 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weiß-gelbliches Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	194 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	27,0 min
<b>Drehwert</b>	-17° (c = 0,79; MeOH)
	
	
	
	
	

Isoscleron wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (7,9 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 218, 232

und 282 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  195,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  193,4  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 194 g/mol schließen ließen. Des Weiteren ließ sich im negativen ESI Modus das pseudomolekulare Ion  $m/z$  386,9  $[2M-H]^-$  beobachten.

Die strukturelle Aufklärung des Isoscleron erfolgte mittels ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten, massenspektrometrischen Analysen und Drehwertbestimmung.

Das  $^1H$  NMR Spektrum (s. Tab. 3.27), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte acht Resonanzen. Zwei Resonanzen, auftretend bei  $\delta_H$  6,13 ppm (d, 1,7 Hz) und  $\delta_H$  6,53 ppm (d, 1,7 Hz) deuteten auf einen *meta*-protonierten Aromaten hin. Zusätzlich konnten die drei Hydroxylgruppen 4-OH ( $\delta_H$  5,53 ppm, d, 6 Hz), 6-OH ( $\delta_H$  10,65 ppm, s) und 8-OH ( $\delta_H$  12,83 ppm, s) beobachtet werden. Die fünf beobachteten aliphatischen Protonen wurden  $CH_2$ -2 ( $\delta_H$  2,63 ppm, 2H, m),  $CH_2$ -3 ( $\delta_H$  1,88-2,12 ppm, 2H, m) und H-4 ( $\delta_H$  4,62 ppm, 1H, dt, 9,6, 4,9 Hz) zugeordnet. Die Struktur konnte weiterhin durch den Abgleich der chemischen Verschiebungen im  $^{13}C$  NMR Spektrum mit Literaturwerten, wie auch durch ein HMBC Experiment (s. Abb. 3.10) bestätigt werden. Hierbei konnten in der aliphatischen Partialstruktur die  $^2J$  Korrelationen von  $CH_2$ -2 zu C-1 und C-3, die  $^3J$  Korrelationen zu C-4 und C-9, sowie die  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen von H-3 zu den Kohlenstoffen C-2 und C-4, bzw. zu C-1 und C-10 beobachtet werden. Außerdem waren die Korrelationen von H-4 zu C-2, C-3, C-5 und C-10 zu erkennen, wie auch jene von 4-OH zu C-3, C-4 und C-10, welches die Positionierung der Hydroxylgruppe an C-4 erlaubt. Die aromatischen Protonen H-5 und H-7 zeigten beide eine  $^2J$  Korrelation zu C-6, welches aufgrund seiner chemischen Verschiebung von  $\delta_C$  165,1 ppm eine Hydroxylgruppe tragen musste, sowie eine  $^3J$  Korrelation zu C-9 und C-5 bzw. C-7. Diese Korrelationen, sowie die  $\omega$  Korrelationen von H-5 und H-7 zu C-1 und H-5 zu C-4, erlaubten die sichere Verknüpfung der beiden Teilstrukturen. Die Positionierung von 8-OH erfolgte zum einen durch die  $^2J$  Korrelation von H-7 zu C-8 und die Ausbildung eines scharfen Singulett bei  $\delta_H$  12,83 ppm, welches sich durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zum in  $\beta$ -Position befindlichen Carbonylkohlenstoff begründete und zum anderen durch die Korrelationen zu C-1, C-7, C-8 und C-9. 6-OH konnte durch die Korrelationen zu C-5, C-6 und C-7 eindeutig positioniert werden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-17^\circ$  ( $c = 0,79$ ; MeOH), der Literaturwert beträgt  $-53,78^\circ$  ( $c = 0,44$ ; EtOH) (Dong, *et al.*, 2008).

Bisher wurde Isoscleron aus den Pflanzen *Carya tonkinensis* (Nguyen and Nguyen, 1999), *Cytospora eucalypticola* (Kokubun, *et al.*, 2003), *Carya cathayensis* (Liu, *et al.*, 2009), *Melia azedarach* (Liu, 2011), *Artemisia rupestris* (Xie, *et al.*, 2013), sowie den Pilzen *Botrytis cinerea* (Suga, 1984), *Penicillium diversum* var. *aureum* (Fujimoto, *et al.*, 1986), *Discula* sp.

(Venkatasubbaiah and Chilton, 1991), *Tubakia dryina* (Venkatasubbaiah and Chilton, 1992), *Diplogelasinospora grovesii* (Fujimoto, *et al.*, 1998), *Phaeoacremonium aleophilum* (Evidente, 2000), *Urnula craterium* (Ayer, *et al.*, 2000), *Humicola fucoatra* (Joshi, *et al.*, 2002), *Aspergillus fumigatus* (Zhao, 2007), *Neofusicoccum parvum* (Evidente, 2010), *Pyrenochaeta sp.* (Lin, *et al.*, 2011), *Xylaria cubensis* (Klaiklay, *et al.*, 2012) isoliert.

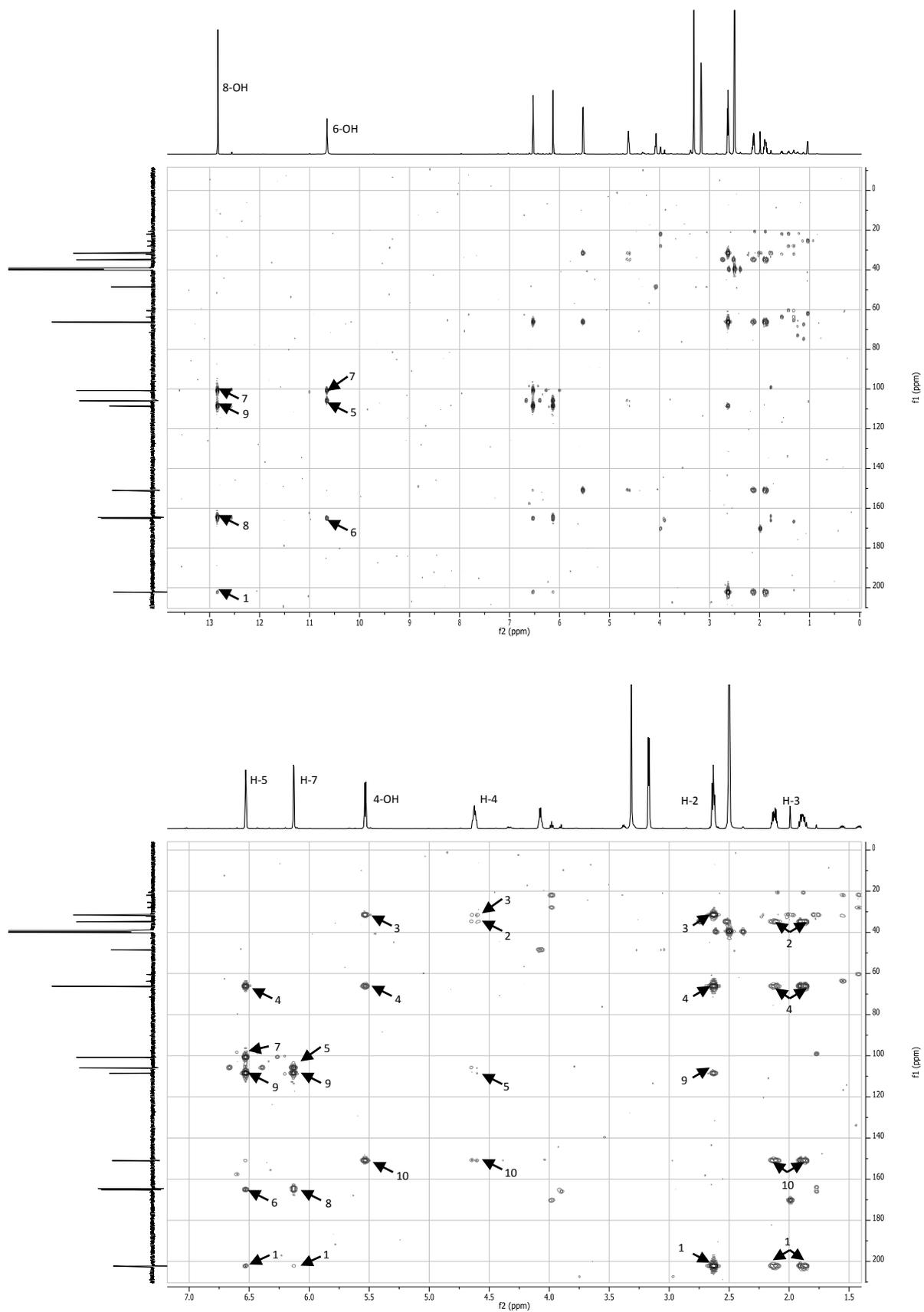


Abb.3.10: HMBC Spektrum von Isoscleron in DMSO-*d*<sub>6</sub> bei 600 MHz

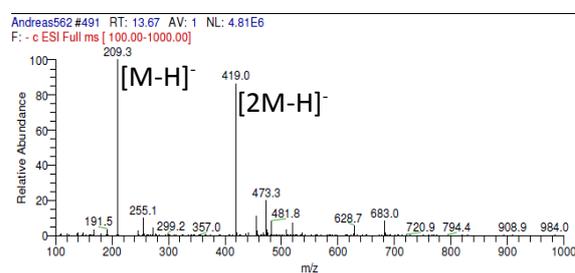
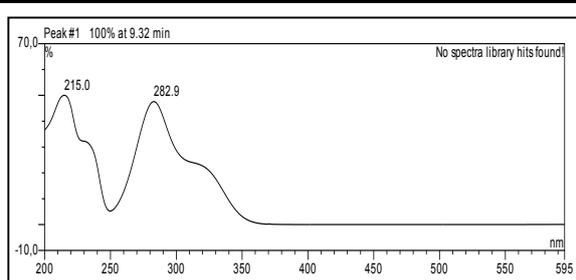
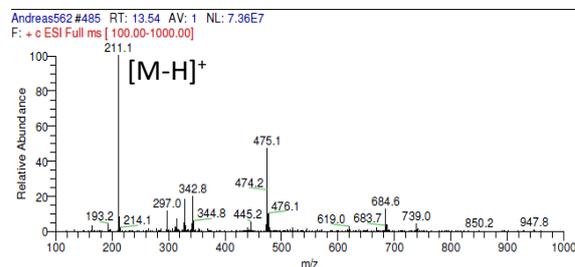
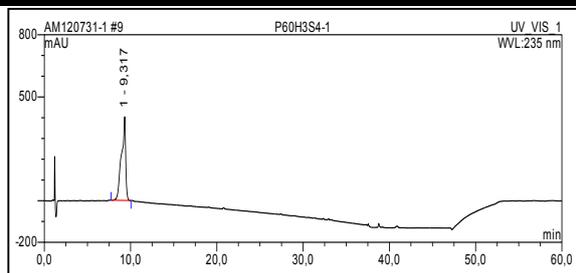
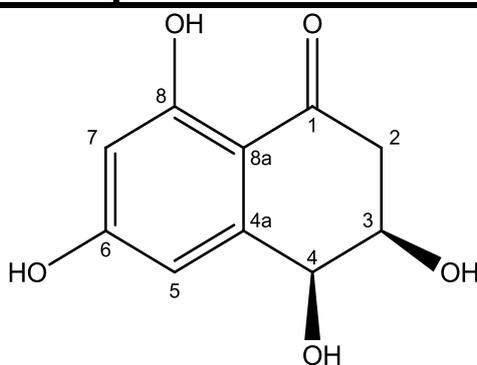
Tab. 3.27: NMR Daten von Isoscleron. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 400 MHz/100 MHz (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		202,3			203,7
2	2,63 (2H, m)	34,9	1, 3, 4, 9	2,63 – 2,80 (2H, dt, $J=18,2, 9,9, 4,8\text{Hz}$ )	35,7
3	1,88 – 2,12 (2H, m)	31,6	1, 2, 4, 10	2,04 – 2,26 (2H, m)	32,7
4	4,62 (1H, dt, $J=9,6, 4,9\text{Hz}$ )	66,2	2, 3, 5, 10	4,73 (1H, w, $J=10,0\text{Hz}$ )	68,5
5	6,53 (1H, d, $J=1,7\text{Hz}$ )	105,9	1, 4, 6, 7, 9	6,54 (1H, s)	107,4
6		165,1			166,8
7	6,13 (1H, d, $J=1,7\text{Hz}$ )	100,8	1, 5, 8, 9	6,17 (1H, s)	102,5
8		164,6			166,7
9		108,5			110,2
10		151,0			151,0
4-OH	5,53 (1H, d, $J=6,0\text{Hz}$ )		3, 4, 10		
6-OH	10,65 (1H, s)		5, 6, 7		
8-OH	12,83 (1H, s)		1, 7, 8, 9	12,87 (1H, s)	

a) (Dong, *et al.*, 2008)

## 4-Hydroxyscytalon

<b>Synonyme</b>	Cis-3,4-Dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-naphtalen-1(2H)-on
<b>Probencode</b>	P60H3S4-1
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	0,9 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weiß-gelbliche Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	210 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	9,3 min
<b>Drehwert</b>	-5° (c = 0,225; MeOH)



4-Hydroxyscytalon wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (0,9 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215 und 283 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  211,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  209,3  $[M-H]^-$

beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 210 g/mol schließen ließen. Ebenfalls ließ sich das pseudomolekulare Ion  $m/z$  419,0  $[2M-H]^-$  beobachten.

Die strukturelle Aufklärung erfolgte anhand der Untersuchungen der  $^1H$  NMR Spektraldaten und Vergleich des Drehwertes mit Literaturwerten.

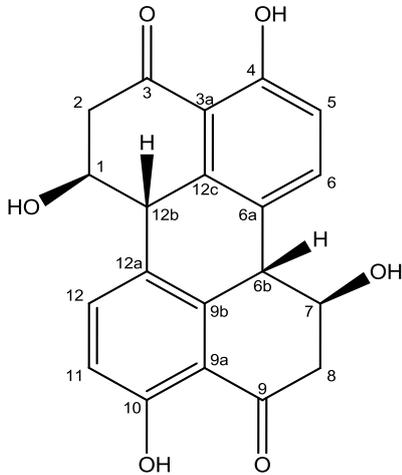
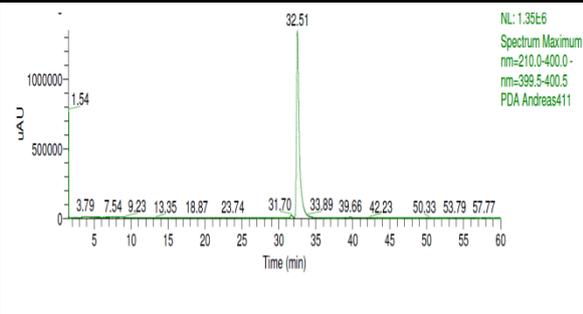
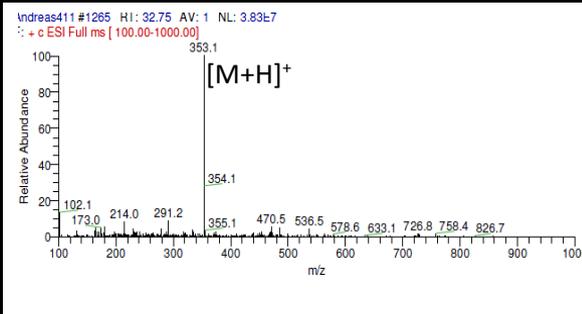
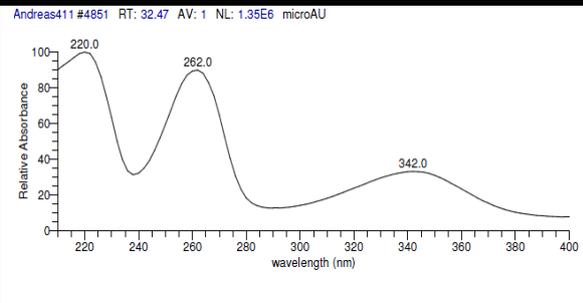
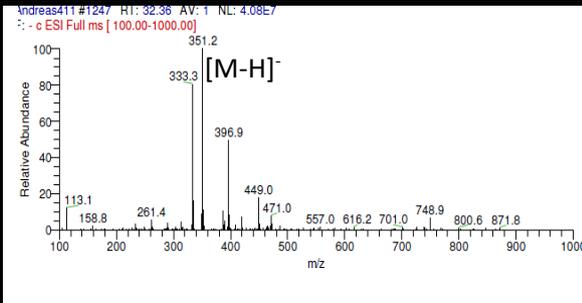
Das  $^1H$  NMR Spektrum (s. Tab. 3.28), aufgenommen in deuteriertem Methanol, zeigte die Anwesenheit von insgesamt sechs Protonen. Die Resonanzen, auftretend bei  $\delta_H$  6,56 ppm und  $\delta_H$  6,19 ppm wurden aufgrund ihrer Kopplungskonstante von 2,3 Hz den Protonen H-5 und H-7 des *meta*-koppelnden aromatischen Systems zugeordnet. Neben den aromatischen Signalen ließen sich außerdem zwei weiter hochfeldverschobene Signale bei  $\delta_H$  4,22 ppm und  $\delta_H$  4,72 ppm beobachten, welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebung in einer unmittelbaren Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen liegen mussten und daher als die Positionen H-3 und H-4 identifiziert wurden. Die Kopplungskonstante von 2,4 Hz zwischen diesen beiden Protonen deutete auf die äquatoriale-äquatoriale Positionierung der Protonen zueinander hin. Neben diesen Signalen konnten zudem die Signale der  $CH_2$ -Funktion  $CH_2$ -2 identifiziert werden, welche mit  $\delta_H$  2,78 ppm und  $\delta_H$  2,87 ppm verschoben vorlagen.

Bisher konnte 4-Hydroxyscytalon aus *Daldinia eschscholzii* (Zhang, *et al.*, 2011) und *Xylaria polymorpha* (Jang, *et al.*, 2009) isoliert werden.

**Tab. 3.28:** NMR Daten von 4-Hydroxyscytalon. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 400 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_H$ (MeOD- $d_4$ )	$\delta_H$ (MeOD- $d_4$ )
2	2,87 (1H, dd, $J=17,3, 3,85$ Hz)	2,88 (1H, dd, $J=13,0, 4,2$ Hz)
	2,78 (1H, dd, $J=17,3, 6,9$ Hz)	2,81 (1H, dd, $J=13,0, 4,2$ Hz)
3	4,22 (1H, m)	4,21 (1H, ddd, $J=2,8, 4,2, 6,8$ Hz)
4	4,72 (1H, d, $J=2,4$ Hz)	4,70 (1H, br d, $J=2,8$ Hz)
5	6,56 (1H, d, $J=2,3$ Hz)	6,60 (1H, dd, $J=2,2, 1,0$ Hz)
7	6,19 (1H, d, $J=2,3$ Hz)	6,18 (1H, d, $J=2,2$ Hz)

a) (Bürki, *et al.*, 2003)

Stemphyrylenol	
Synonyme	1,2,6b,7,8,12b-Hexahydro-1,4,7,10-tetrahydroxy-[1S-(1 $\alpha$ ,6 $\beta$ a,7 $\alpha$ ,12 $\beta$ a)]-3,9-perylenedion
Probencode	P20H-3
Quelle	<i>Pleospora</i> sp.
Menge	1,5 mg
Physikalische Beschreibung	Gelb-rötliches Pulver
Summenformel	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht	352 g/mol
HPLC-Retentionszeit	32,5 min
Drehwert	+400° (c = 0,3; MeOH)
	
	
	

Stemphyrylenol wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,5 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$

(MeOH) 220, 262 und 342 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, wie auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  353,1  $[M+H]^+$  und 351,2  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 352 g/mol schließen ließen.

Die Struktur von Stemphyerylenol wurde anhand von ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten und Literaturvergleich der gewonnenen Daten aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.29), gemessen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt sieben Signale, welche sowohl dem aromatischen, als auch dem aliphatischen Bereich entstammten. Dies und die Tatsachen, dass das Molekulargewicht bei 352g/mol lag und im  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum nur zehn Signale zu identifizieren waren, deutete auf das Vorhandensein eines symmetrischen Dimers hin. Die Substrukturen konnten wie folgt beschrieben werden: Zwei aromatische Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  6,87 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  8,02 ppm, welche mit einer für *ortho*-ständige Protonen typischen Konstante von 8,7 Hz koppelten wurden H-5 und H-6 bzw. H-11 und H-12 zugeordnet. Die übrigen Signale ließen sich der aliphatischen Partialstruktur zuordnen. Ein Proton, resonierend bei  $\delta_{\text{H}}$  3,73 ppm wurde als H-12b,  $\delta_{\text{H}}$  4,61 ppm als H-1, sowie eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe, bei  $\delta_{\text{H}}$  2,93 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,16 ppm als  $\text{CH}_2$ -2 identifiziert. Ein scharfes tieffeldverschobenes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  12,03 ppm, das wie beim Isoscleron auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen einer Hydroxylgruppe und einem in  $\beta$ -Position befindlicher Carbonylfunktion hindeutete, wurde als 4-OH festgelegt. Die Substrukturen wurden mittels der HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.11) zusammengefügt. Hierbei ließen sich die  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen der aromatischen Protonen H-5 zu C-3a und C-6a, sowie von H-6 zu C-6b, C-9b, C-12c und C-4 beobachten. C-4 wies aufgrund seiner chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{C}}$  159,1 ppm auf eine Sauerstoffsubstitution hin. Neben diesen Korrelationen konnten zudem einige Korrelationen des aliphatischen Bereiches beobachtet werden. So zeigte die  $\text{CH}_2$ -Funktion  $\text{CH}_2$ -2  $^2J$  Korrelationen zu C-1 und C-3, als auch  $^3J$  Korrelationen zu C-3a und C-12b. H-6b zeigte starke  $^3J$  Korrelationen zu C-12a und C-9b, sowie eine starke  $^2J$  Korrelation zu C-1. Hinzu kam die  $^3J$  Korrelation zu C-3a und die  $\omega$  Korrelationen zu C-12 und C-10. Die Positionierung von 4-OH konnte durch die Korrelationen zu C-4 und C-5 bestätigt werden. Insbesondere die starken Kopplungen von H-6 zu C-6b, welche für eine  $\omega$  Korrelation zu C-12b deutlich zu stark ausgeprägt war, wie auch jene von H-12b zu C-9, bestätigten den Aufbau der Struktur. Die beschriebenen HMBC Korrelationen waren daher für beide Untereinheiten ebenfalls als identisch zu betrachten, welche in ihrer Konsequenz die Verknüpfung über C-12a/12b und C-6a/6b erlaubten.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+400^\circ$  ( $c = 0,3$ ; MeOH), der Literaturwert  $+411^\circ$  ( $c = 0,2$ ; MeOH) (Hassan, 2007).

## ***Ergebnisse***

---

Bisher wurde Stemphyperylenol aus *Talaromyces* sp. (Liu, *et al.*, 2010), *Alternaria* sp. (Gao, *et al.*, 2009, Hradil, *et al.*, 1989, Kjer, *et al.*, 2009) und *Stemphylium* sp. (Andersen, *et al.*, 1995) isoliert.

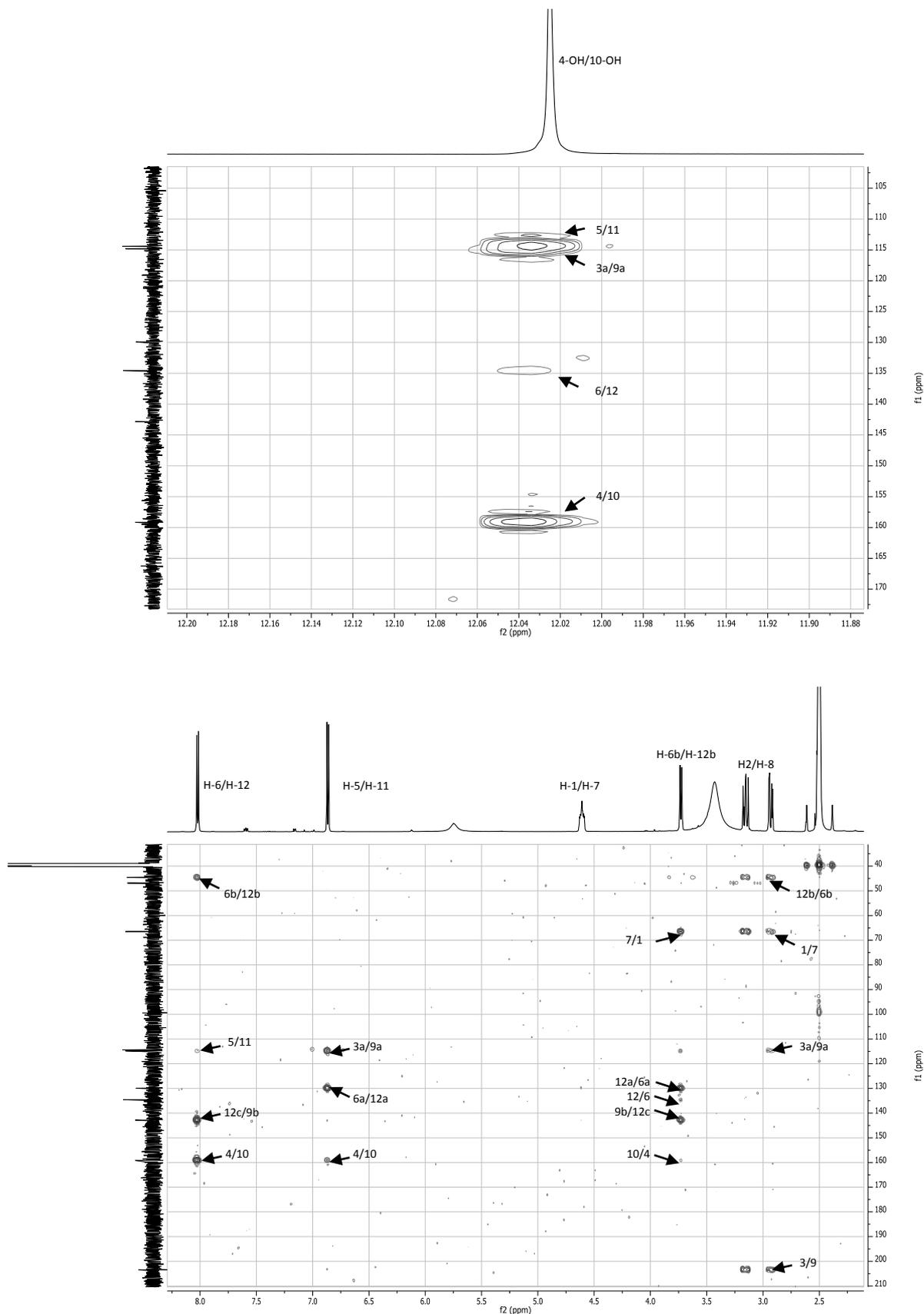


Abb. 3.11: HMBC Spektrum von Stenphyperylenol in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

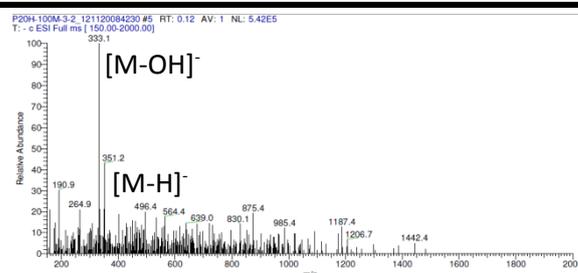
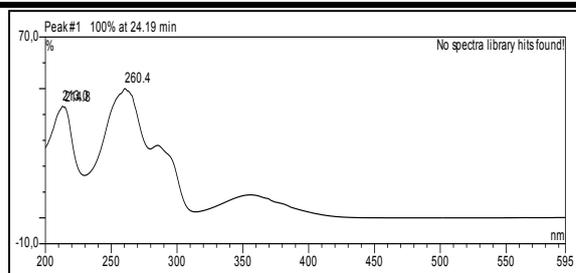
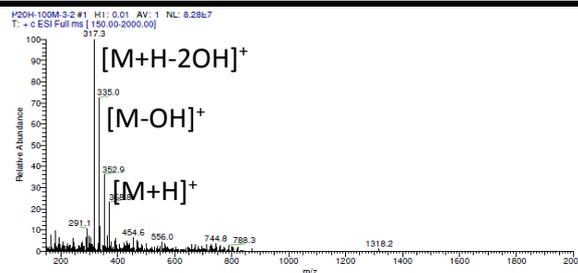
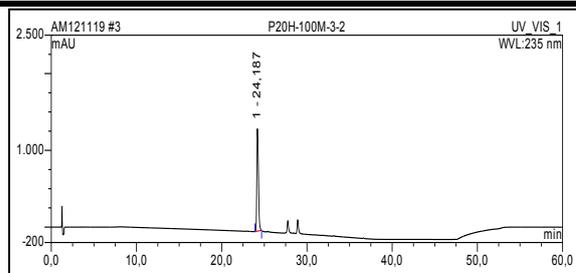
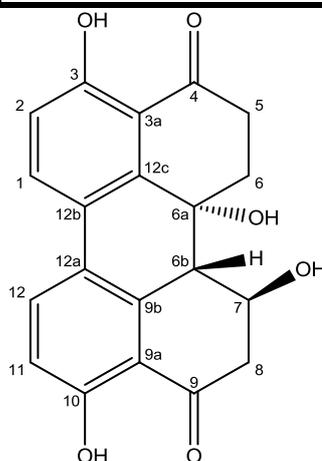
Tab. 3.29: NMR Daten von Stempyperlylenol. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	600 MHz/150 MHz		$\delta_C$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	Lit. 300 MHz/75 MHz <sup>a)</sup>	
	$\delta_H$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_H$ (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> )			$\delta_H$ (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_C$ (Aceton/ DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
1	4,61 (1H, m)	4,78 (1H, m)	66,5		4,76	68,32
2	2,93 (1H, dd, <i>J</i> =15,5, 4,4Hz) 3,16 (1H, m)	3,07(1H, dd, <i>J</i> =16,5, 4,5Hz) 3,19 (1H, dd, <i>J</i> =15,4, 12,3Hz)	46,9	1, 3, 3a, 12b	3,07 3,17	47,84
3			203,5			204,01
3a			114,8			115,92
4-OH	12,03 (1H, s)	12,08 (1H, s)	159,1	3a, 4, 5	12,09	161,03
5	6,87 (1H, d, <i>J</i> =8,7Hz)	6,84 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	114,4	3a, 4, 6a	6,81	115,55
6	8,02 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	8,16 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	134,6	4,5, 6b, 12c	8,14	135,58
6a			129,9			130,90
6b	3,73 (1H, d, <i>J</i> =8,9Hz)	3,78 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	44,6	7, 9b, 10, 12, 12a	3,75	46,05
7	4,61 (1H, m)	4,78 (1H, m)	66,5		4,67	68,32
8	2,93 (1H, dd, <i>J</i> =15,5, 4,4Hz) 3,16 (1H, m)	3,07 (1H, dd, <i>J</i> =16,5, 4,5Hz) 3,19 (1H, dd, <i>J</i> =15,4, 12,3Hz)	46,9	6b, 7, 9, 9a	3,07 3,17	47,84
9			203,5			204,01
9a			114,8			115,92
9b			142,8			143,73
10-OH	12,03 (1H, s)	12,08 (1H, s)	159,1	9a, 10, 11	12,09	161,03
11	6,87 (1H, d, <i>J</i> =8,7Hz)	6,84 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	114,4	9a, 10, 12a	6,81	115,55
12	8,02 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	8,16 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	134,6	9b, 10, 11, 12b	8,14	135,58
12a			129,9			130,90
12b	3,73 (1H, d, <i>J</i> =8,9Hz)	3,78 (1H, d, <i>J</i> =8,8Hz)	44,6	1, 4, 6, 6a, 9b, 12c	3,75	46,05
12c			142,8			143,73

a) (Arnone, *et al.*, 1986)

### Alttoxoin I

<b>Synonyme</b>	1,2,11,12,12a,12b-Hexahydro-1,4,9,12a-tetrahydroxy-(1S,12aR,12bS)-3,10-perylenedion
<b>Probencode</b>	P20H100M3-2
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	17,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Oranges Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	334 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	24,2 min
<b>Drehwert</b>	+173° (c = 0,2; MeOH)



Alttoxoin I wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (17,2 mg). Die Substanz wies zwei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  214 und 260 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen

## Ergebnisse

---

Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  317,3  $[M-2H_2O]^+$  und  $m/z$  333,1  $[M-H_2O]^+$  beobachtet werden, welches eine Bestimmung des Molekulargewicht auf 352 g/mol zuließ. Dieses konnte durch die Beobachtung der pseudomolekularen Ionen  $m/z$  335,0  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  352,9  $[M+H]^+$  und  $m/z$  351,2  $[M-H]^+$  untermauert werden.

Die strukturelle Aufklärung des Altertoxin I erfolgte anhand massenspektrometrischer- und NMR Experimente, sowie des Literaturabgleichs mit den aufgezeichneten Daten.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.30), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt sechszehn Protonen. Im aromatischen Bereich konnten bei  $\delta_H$  8,06 ppm,  $\delta_H$  7,04 ppm,  $\delta_H$  6,95 ppm und  $\delta_H$  8,00 ppm die aromatischen Protonen H-1, H-2, H-11 und H-12 identifiziert werden. Die Protonen traten als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8,8 Hz, bzw. 8,7 Hz auf, wodurch sie in *ortho*-Position zueinander angeordnet werden konnten. Die aromatischen Hydroxylgruppen 3-OH und 10-OH traten, bedingt durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu den Ketofunktionen in Position 4 und 9, als scharfe Singulets bei  $\delta_H$  12,74 ppm und  $\delta_H$  12,33 ppm auf. Bei den aliphatischen Protonen  $CH_2$ -5,  $CH_2$ -6 und  $CH_2$ -8 lagen die axialen und äquatorialen Protonen komplex aufgespalten vor.  $CH_2$ -5 resonierte bei  $\delta_H$  3,09 ppm (ax.) und  $\delta_H$  2,58 ppm (äq.),  $CH_2$ -6 bei  $\delta_H$  2,31 ppm (ax.) und  $\delta_H$  3,09 ppm (äq.). Hierbei zeigte sich eine axiale Kopplung von 14,3 Hz, sowie eine äquatoriale Kopplungskonstante von 3,9 Hz.  $CH_2$ -8 resonierte bei  $\delta_H$  3,09 ppm (ax.) und  $\delta_H$  2,88 ppm (äq.), jeweils komplex als Multipllett aufgespalten. Weiter tieffeldverschoben konnte H-7 bei  $\delta_H$  4,53 ppm identifiziert werden, aufgespalten zum Dublett vom Dublett, mit der axialen Kopplungskonstante von 11,3 Hz, sowie einer äquatorialen von 4,6 Hz. H-6b konnte als Multipllett bei  $\delta_H$  2,88 ppm identifiziert werden. Die Substanz konnte daher eindeutig als Altertoxin I identifiziert werden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+173^\circ$  ( $c = 0,2$ ; MeOH), der Literaturwert beträgt  $+484^\circ$  ( $c = 0,002$ ;  $CHCl_3$ ) (Stack, *et al.*, 1986).

Altertoxin I wurde bereits aus der Pflanze *Aristolochia* sp. (Yang, *et al.*, 2012) und den Pilzen *Alternaria* sp. (Andersen, *et al.*, 2008, Gao, *et al.*, 2009, Kjer, *et al.*, 2009) und *Uldocladium* sp. (Andersen and Hollensted, 2008) isoliert.

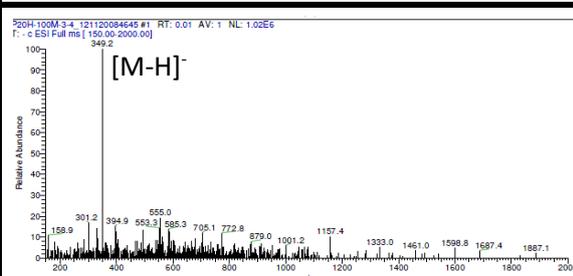
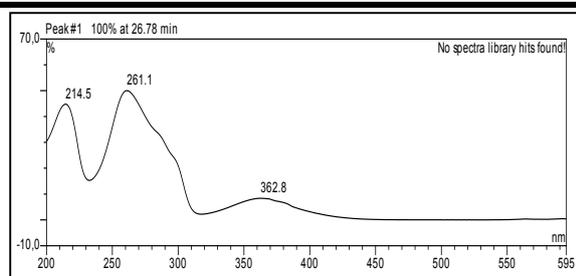
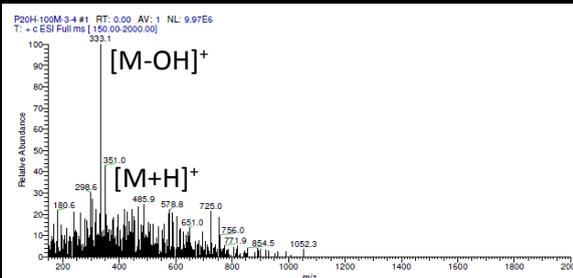
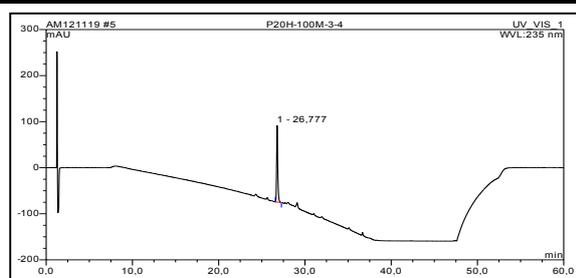
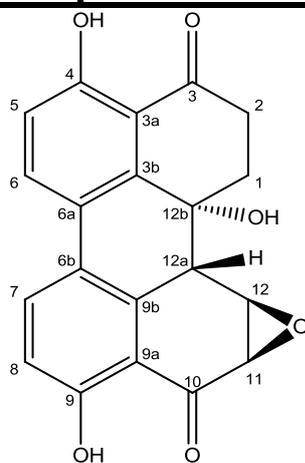
Tab. 3.30: NMR Daten von Alvertoxin I. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500MHz	Lit. 360 MHz/90 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	8,06 (1H, d, <i>J</i> =8,8 Hz)	8,10 (1H, d)	132,9
2	7,04 (1H, d, <i>J</i> =8,8 Hz)	7,10 (1H, d)	117,8
3			161,0
3a			113,8
4			206,0
5	ax. 3,09 (1H, m) äq. 2,58 (1H, dt, <i>J</i> =14,3, 3,9Hz)	ax. 3,00 (1H, m) äq. 2,59 (1H, dt)	33,5
6	ax. 2,31 (1H, dt, <i>J</i> =14,3, 3,9Hz) äq. 3,09 (1H, m)	ax. 2,30 (1H, dt) äq. 3,00 (1H, m)	34,8
6a			68,0
6b	2,88 (1H, m)	2,86 (1H, m)	51,4
7	4,53 (1H, dd, <i>J</i> =11,3, 4,6Hz)	4,50 (1H, d)	64,7
8	ax. 3,09 (1H, m) äq. 2,88 (1H, m)	ax. 3,00 (1H, m) äq. 2,86 (1H, m)	47,5
9			204,2
9a			116,5
9b			140,7
10			160,4
11	6,95 (1H, d, <i>J</i> =8,7Hz)	6,90 (1H, d)	115,5
12	8,00 (1H, d, <i>J</i> =8,7Hz)	8,00 (1H, d)	132,5
12a			124,8
12b			123,5
12c			138,4
3-OH	12,74 (1H, s)	12,70 (1H, s)	
6a-OH			
10-OH	12,33 (1H, s)	12,30 (1H, s)	

a) (Stack, *et al.*, 1986) (Kopplungskonstanten nicht angegeben)

## Stemphytoxin II

<b>Synonyme</b>	7a,8a,8b,8c,9,10-Hexahydro-1,6,8c-trihydroxy-(7aR,8aR,8bS,8cR)-Perylo[1,2-b]oxiren-7,11-dion
<b>Probencode</b>	P20H100M3-4
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	22,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Oranges Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	350 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	26,8 min
<b>Drehwert</b>	+363° (c = 0,1; MeOH)



Stemphytoxin II wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (22,6 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Maxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 215, 261 und

363 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  333,1  $[M-OH]^+$  und  $m/z$  349,2  $[M-H]^-$  beobachtet werden, was eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 350 g/mol zuließ. Zudem konnte das pseudomolekulare Ion  $m/z$  351,0  $[M+H]^+$  beobachtet werden.

Die strukturelle Aufklärung des Stemphylotoxins II erfolgte anhand von  $^1H$  NMR- und massenspektrometrischen Experimenten, sowie einer Drehwertbestimmung in Abgleich mit den Literaturwerten.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.31), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt zwölf Signale. Vier Signale bei  $\delta_H$  7,08 ppm,  $\delta_H$  8,17 ppm,  $\delta_H$  8,09 ppm und  $\delta_H$  7,00 ppm konnten den aromatischen Protonen H-5, H-6, H-7 und H-8 zugeordnet werden. Die *ortho*-Positionierung der Protonen konnte durch die typische Kopplungskonstante von 8,8 Hz bestätigt werden. Die aromatischen Hydroxylgruppen 4-OH und 9-OH konnten durch ihre Ausprägung als scharfe Singulets bei  $\delta_H$  12,73 ppm und  $\delta_H$  11,90 ppm, bedingt durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur in  $\beta$ -Position befindlichen Ketofunktion, identifiziert werden. Die aliphatischen Protonen H-1 und H-2 lagen bei  $\delta_H$  2,76 und  $\delta_H$  2,70 ppm als Multiplett aufgespalten vor. Die Signale der Epoxid-Protonen H-11 und H-12 konnten aufgrund ihrer Sauerstoffsubstitution weiter tieffeldverschoben bei  $\delta_H$  3,77 ppm und  $\delta_H$  4,38 ppm detektiert werden. Durch ihre Kopplung von 3,7 Hz konnte eine äquatoriale Positionierung der Protonen zueinander bestätigt werden. Das in  $\alpha$ -Position dazu befindliche H-12a konnte als breites Singulett bei  $\delta_H$  3,60 ppm detektiert werden, wie auch 12b-OH bei  $\delta_H$  5,59 ppm.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+363^\circ$  ( $c = 0,1$ ; MeOH), der Literaturwert beträgt  $+355,9^\circ$  ( $c = 0,05$ ; MeOH) (Arnone, *et al.*, 1986).

Stemphyloxin II wurde bereits aus *Alternaria cassiae* (Hradil, *et al.*, 1989) und *Stemphylium botryosum* (Arnone, *et al.*, 1986) isoliert.

Tab. 3.31: NMR Daten von Stemphylotoxin II. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 300 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (Aceton- $d_6$ )
1	2,76 (2H, m)	2,95
		2,59
2	2,70 (2H, m)	2,25
		2,77
5	7,08 (1H, d, $J=8,8\text{Hz}$ )	7,06
6	8,17 (1H, d, $J=8,8\text{Hz}$ )	8,13
7	8,09 (1H, d, $J=8,8\text{Hz}$ )	8,04
8	7,00 (1H, d, $J=8,8\text{ Hz}$ )	6,99
11	3,77 (1H, d, $J=3,7\text{ Hz}$ )	3,72
12	4,38 (1H, d, $J=3,7\text{ Hz}$ )	4,44
12a	3,60 (1H, br s)	3,62
4-OH	12,73 (1H, s)	12,79
6-OH	5,59 (1H, s)	4,80
9-OH	11,90 (1H, s)	12,09

a) (Arnone, *et al.*, 1986) (Kopplungskonstanten und Multiplizitäten nicht angegeben.)

## Xanalteric Acid I

## Synonyme

1,10-Dihydro-1,4,9-trihydroxy-10-oxo-2*H*-benz[5,10]anthra[1,9-*bc*]pyran-2-carboxylsäure

## Probencode

P60DK2040-6-1

## Quelle

*Pleospora* sp.

## Menge

1,5 mg

## Physikalische Beschreibung

Oranges Pulver

## Summenformel

C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

## Molekulargewicht

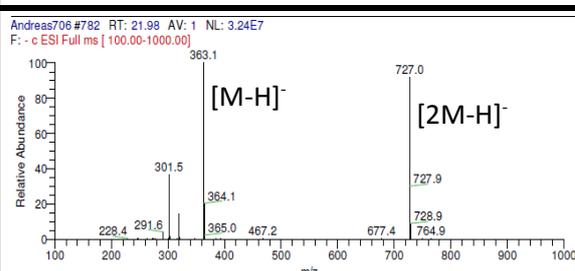
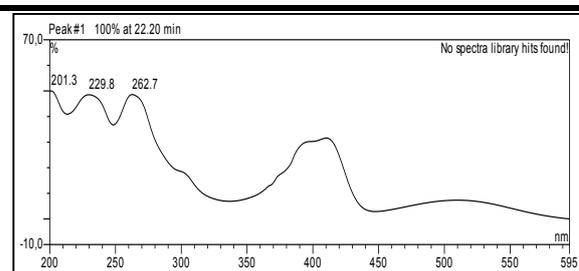
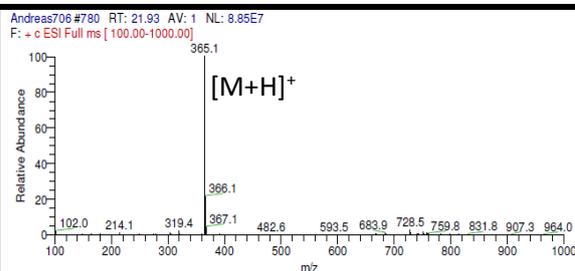
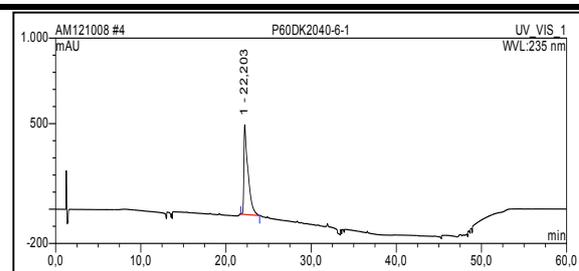
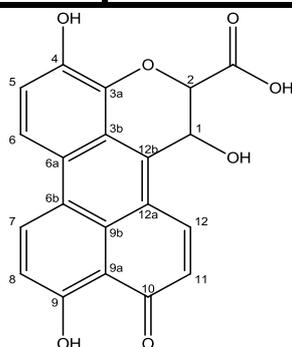
366 g/mol

## HPLC-Retentionszeit

22,2 min

## Drehwert

-118° (c = 0,3; MeOH)



Xanalteric Acid I wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (17,2 mg). Die Substanz wies vier charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 201, 230, 263 und ca. 400 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  365,1 [M+H]<sup>+</sup> und

363,1 [M-H]<sup>-</sup> beobachtet werden, was eine Bestimmung des Molekulargewichts bei 364 g/mol ermöglichte. Außerdem ließ sich das pseudomolekulare Ion  $m/z$  727,0 [2M-H]<sup>-</sup> beobachten.

Die strukturelle Aufklärung von Xanalteric Acid I wurde anhand von ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten, Drehwertbestimmung und Literaturabgleich der gewonnenen Daten vorgenommen.

Die Untersuchung des <sup>1</sup>H NMR Spektrums (s. Tab. 3.32), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt zwölf Protonen. Sechs der Signale waren dem aromatischen Bereich zuzuordnen. Sie resonierten bei  $\delta_H$  8,36 ppm,  $\delta_H$  7,49 ppm,  $\delta_H$  9,15 ppm,  $\delta_H$  7,49 ppm,  $\delta_H$  7,05 ppm und  $\delta_H$  8,69 ppm und wurden den Protonen H-5, H-6, H-7, H-8, H-11 und H-12 zugeordnet. Typischerweise zeigten sie eine Kopplungskonstante von 9,1, bzw. 9,8 Hz, was ihre Positionierung in *ortho*-Stellung zueinander belegte. Des Weiteren konnten zwei phenolische Hydroxylgruppen bei  $\delta_H$  9,69 ppm und  $\delta_H$  15,09 ppm beobachtet werden, die 4-OH und 9-OH zugeordnet wurden. 9-OH zeigte die charakteristische Tieffeldverschiebung einer chelatisierten Hydroxylgruppe, wie sie bereits bei Stemphyperylenol und den Stemphyllotoxinen beobachtet wurde. Die chemische Hochfeldverschiebung von 4-OH zeigte das Fehlen einer Carbonylfunktion in  $\beta$ -Position an. Im aliphatischen Bereich ließen sich außerdem drei weitere Signale bei  $\delta_H$  5,97 ppm,  $\delta_H$  5,39 ppm und  $\delta_H$  6,36 ppm beobachten, welche als die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen befindlichen Protonen H-1 und H-2, sowie als 1-OH identifiziert wurden. Die beobachteten Substrukturen wurden mit Hilfe von COSY und HMBC Experimenten zusammengefügt. Im HMBC Spektrum (s. Abb 3.12) zeigte H-6 die <sup>2</sup>J und <sup>3</sup>J Korrelationen zu C-4, C-5, C-3b und C-6a, H-5 zu C-4, C-3a und C-6a, H-7 zu C-6b, C-9 und C-9b und H-8 zu C-9, C6b und C-9a und die  $\omega$  Korrelation zu C-10. Die Korrelationen von H-6 und H-8 zu C-6b ermöglichte die Verknüpfung der beiden phenolischen Ringsysteme über C-6a/C-6b. Die Protonen H-11 und H-12 des dritten aromatischen Systems zeigten ebenfalls <sup>2</sup>J und <sup>3</sup>J Korrelationen zu C-12a und C-9a, bzw. C-12a, C-9b und C-10. Durch die <sup>3</sup>J Korrelation von H-12 und die  $\omega$  Korrelation von H-8 zu C-10, welches bei  $\delta_C$  187,9 ppm resonierte, ermöglichten die Bestätigung der Naphtalenonpartialstruktur. H-2 zeigte Korrelationen zu C-1, C-3 und C-3a. Letztere Korrelation bewies die Verknüpfung der phenolischen Partialstruktur mit den Protonen H-5/H-6 und dem Oxanring. Die chemische Verschiebung von C-3 bei  $\delta_C$  168,8 ppm zeigte die endständige Säurefunktion an. Von H-1 konnte, wie auch von H-11 und H-12, die Korrelation zu C-12b beobachtet werden, welche die Verknüpfung zwischen der Oxan- und Naphtalenonpartialstruktur bestätigte. Durch die COSY und HMBC Korrelationen zwischen 1-OH und H-2 konnten C-1 und C-2 unmittelbar nebeneinander positioniert werden und der Oxanring geschlossen werden. Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug -118° (c = 0,3; MeOH), der Literaturwert -120° (c = 0,03; MeOH) (Kjer, *et al.*, 2009).

Xanalteric Acid I wurde bisher nur aus *Alternaria alternata* (Kjer, *et al.*, 2009) isoliert.

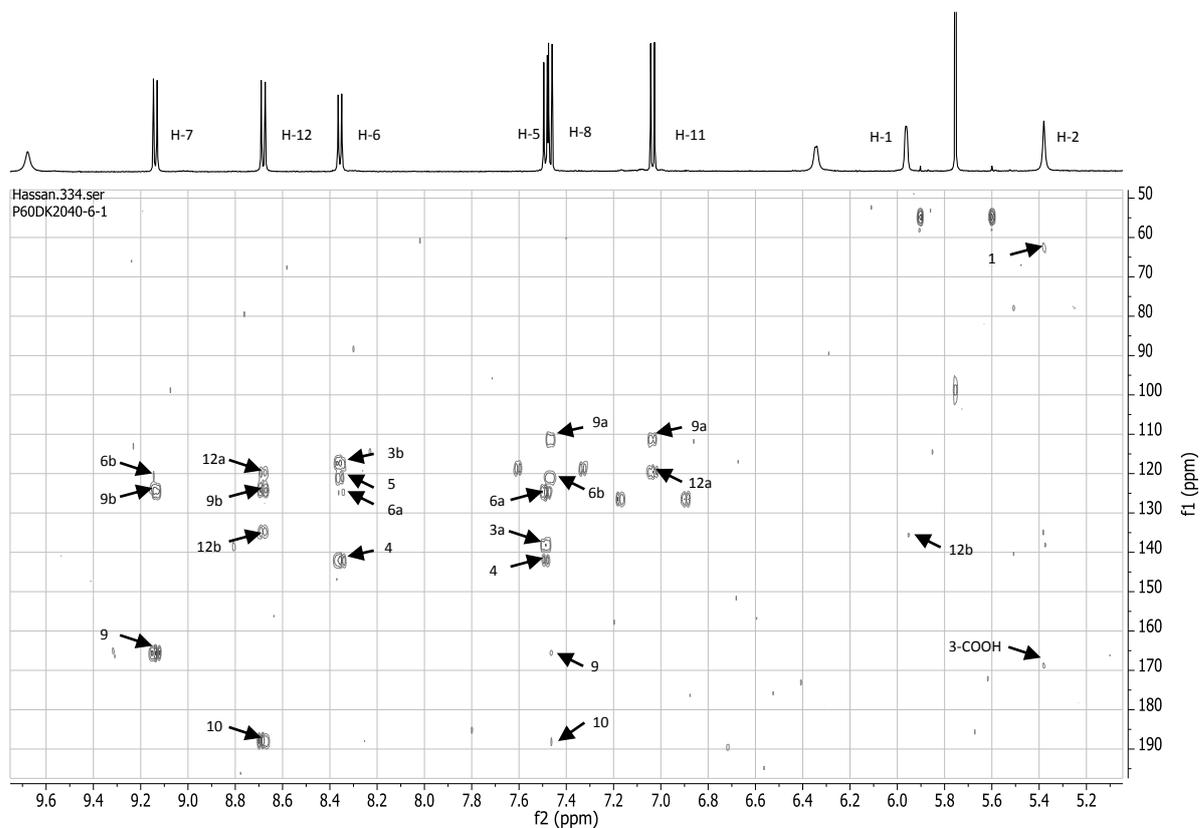
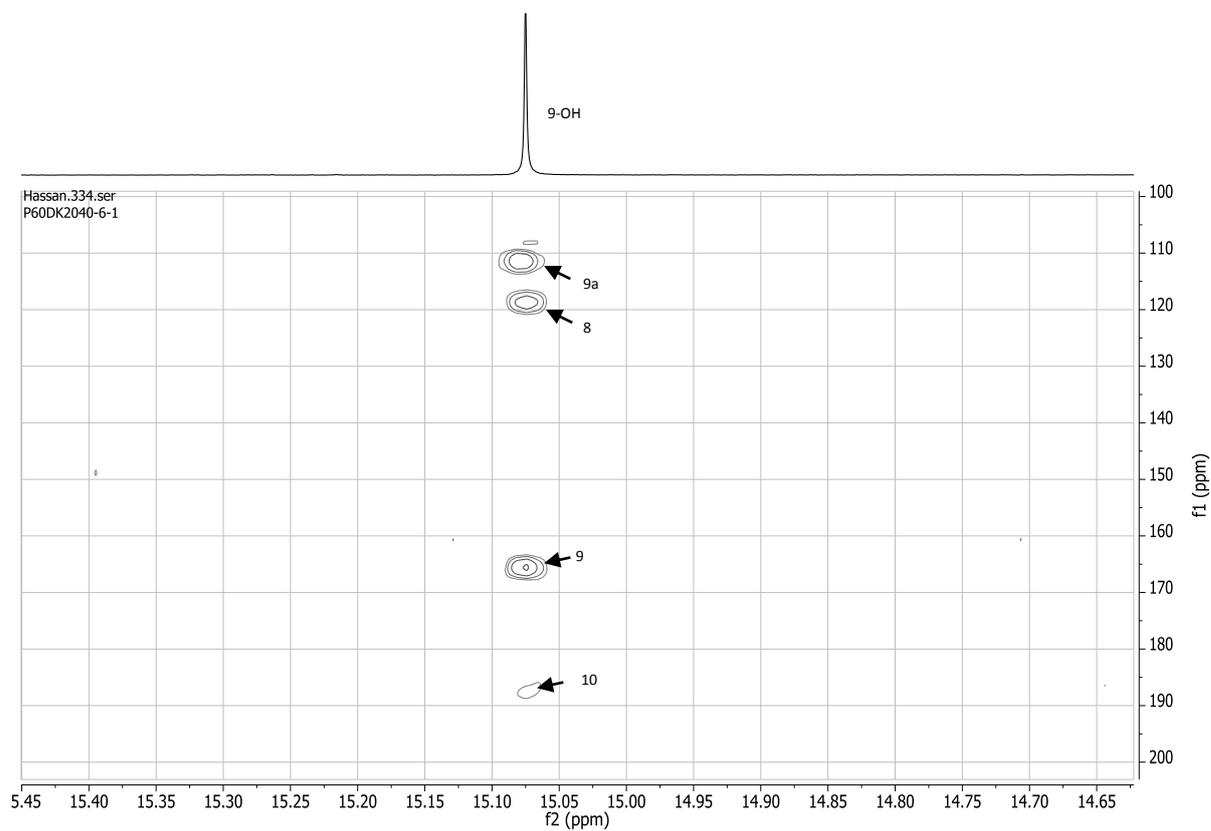


Abb.3.12: HMBC Spektrum von Xanaleric Acid I in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

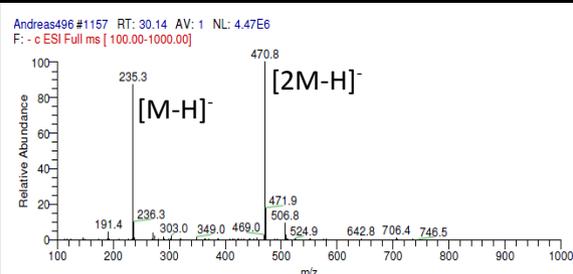
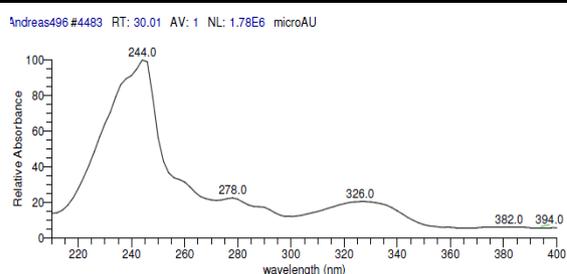
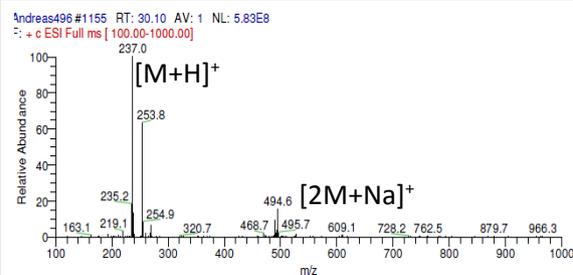
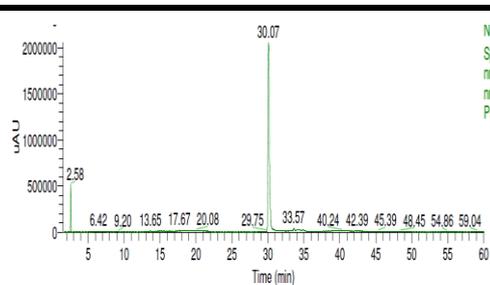
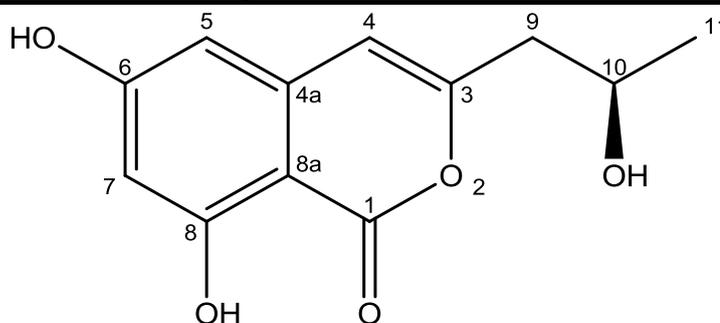
**Tab. 3.32:** NMR Daten von Xanalteric Acid I. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )				Lit. 500 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>			
	$\delta_H$	$\delta_C$	COSY	HMBC	$\delta_H$	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	5,97 (1H, d, <i>J</i> =3,3Hz)	61,9	1-OH	12b	5,93 (1H, d, <i>J</i> =2,3Hz)	65,1	2, 1-OH	3b, 12a, 12b, 2-COOH
2	5,39 (1H, s)	77,8		1, 3-COOH	4,74 (1H, br s)	81,7	1	1, 3a, 12b, 2-COOH
3								
3a		138,3				140,6		
3b		117,4				119,3		
4		142,1				143,6		
5	7,49 (1H, d, <i>J</i> =9,1Hz)	121,8	5	3a, 4, 6a	7,35 (1H, d, <i>J</i> =7,4Hz)	123,3	6	3a, 4, 6a
6	8,36 (1H, d, <i>J</i> =9,1Hz)	114,7	6	3b, 4, 5, 6a	8,16 (1H, d, <i>J</i> =9,3Hz)	115,9	5	3a, 3b, 4, 6a, 6b
6a		124,6				126,9		
6b		120,7				122,9		
7	9,15 (1H, d, <i>J</i> =9,1Hz)	133,3	8	6b, 9, 9b	9,04 (1H, d, <i>J</i> =7,5Hz)	134,0	8	6a, 6b, 9, 9a, 9b, 12a
8	7,49 (1H, d, <i>J</i> =9,1Hz)	118,5	7	6b, 9, 9a, 10	7,35 (1H, d, <i>J</i> =7,4Hz)	119,6	7	6b, 9, 9a, 9b
9		165,6				167,1		
9a		111,4				112,9		
9b		124,2				126,4		
10		187,9				191,0		
11	7,05 (1H, d, <i>J</i> =9,8Hz)	126,3	12	9a, 12a	6,94 (1H, d, <i>J</i> =9,4)	127,3	12	9, 9a, 9b, 12a
12	8,69 (1H, d, <i>J</i> =9,8Hz)	138,5	11	9b, 10, 12a, 12b	8,62 (1H, d, <i>J</i> =7,3Hz)	140,4	11	6b, 9a, 9b, 10, 12a, 12b
12a		119,7				121,6		
12b		134,8				137,1		
3-COOH	13,20 (1H, s)	168,8			8,73 (1H, s)	174,7		
1-OH	6,36 (1H, d, <i>J</i> =5,1Hz)		1		5,75 (1H, d, <i>J</i> =3,3Hz)		1	
4-OH	9,69 (1H, s)							
9-OH	15,09 (1H, s)			8, 9, 9a, 10	15,12 (1H, s)			

a) (Kjer, *et al.*, 2009)

## Orthosporin

<b>Synonyme</b>	6,8-Dihydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-(S)-1 <i>H</i> -2-benzopyran-1-on; (+)-Orthosporin; De- <i>O</i> -methyldiaporthin
<b>Probencode</b>	P20H-70M-9 P20H80MS2-11
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	9,8 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weiß-gelbe Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	236 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	30,0 min
<b>Drehwert</b>	+20° (c = 0,7; MeOH)



Orthosporin wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (9,8 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 244, 278 und 326 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen

## ***Ergebnisse***

---

Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  237,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  235,3  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche auf ein Molekulargewicht von 236 g/mol schließen ließen. Zudem konnten die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  494,6  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  470  $[2M-H]^-$  beobachtet werden, welche die Evidenz erhöhten.

Die strukturelle Aufklärung des Orthosporins erfolgte anhand ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten, massenspektrometrischer Analysen und Drehwertbestimmung.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.33), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit eines *meta*-protonierten aromatischen Systems, was durch die Protonen H-5 und H-7 bei  $\delta_H$  6,32 ppm und  $\delta_H$  6,37 ppm mit einer Kopplungskonstante 2,1 Hz koppelnd bestätigt wurde. Des Weiteren war eine Resonanz bei  $\delta_H$  6,49 ppm als Singulett zu beobachten, welche als H-4 identifiziert wurde. Im Tieffeldbereich konnten die aromatischen Hydroxylgruppen 6-OH und 8-OH bei  $\delta_H$  10,81 ppm und  $\delta_H$  11,00 ppm detektiert werden. Im aliphatischen, weiter hochfeldverschobenen Bereich, konnten insgesamt sechs Protonen detektiert werden. Mit einer Integration von drei Protonen wurde das Signal mit der chemischen Verschiebung  $\delta_H$  1,14 ppm der Methylgruppe 11 zugeordnet. Das Auftreten als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 6,2 Hz bestätigte, dass die als Dublett vom Dublett aufgespaltene CH-Gruppe H-10 bei  $\delta_H$  3,99 ppm mit der gleichen Kopplungskonstante in direkter Nachbarschaft positioniert war. Die beiden übrigen Protonen konnten bei  $\delta_H$  2,50 ppm als Multiplett detektiert werden und wurden der  $CH_2$ -Gruppe H-9 zugeordnet. Die so identifizierten Substrukturen wurden anhand ihrer HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.13a & b) zusammengefügt. H-5 zeigte die  $^2J$  Korrelation zu C-6, die  $^3J$  Korrelationen zu C-4, C-7 und C-8a. H-7 zeigte die  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen zu C-6, C-8, C-8a und C-5. H-4 konnte durch die  $^3J$  Korrelationen zu C-5 und C-8a in  $\beta$ -Position zu H-5 positioniert werden. Die Korrelation zu C-9 ermöglichte die Verknüpfung der Seitenkette an C-3. Die Konstitution der Seitenkette wiederum konnte durch die Korrelationen von H-11 zu C-10 und C-9 und H-10 zu C-3 bestätigt werden. Die chemische Verschiebung von C-3 bei  $\delta_C$  155,3 ppm deutete auf die Präsenz eines Lactonringes hin, was ebenfalls durch die Summenformel und die Massendifferenz eines Sauerstoffatoms bestätigt werden konnte.

Die Stereochemie konnte als *S* anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt werden. Der gemessene Wert betrug  $+20^\circ$  ( $c = 0,7$ ; MeOH), der Literaturwert  $+22^\circ$  ( $c = 0,09$ ; MeOH) (Hallock, *et al.*, 1988).

Orthosporin wurde bisher aus *Rhynchosporem orthosporum* (Ichihara, *et al.*, 1989), *Mollisia* sp. (Weber, 2007), *Staganospora* sp. (Nicolet, *et al.*, 1999) und *Ceratocystis fimbriata* (Gremaud and Tabacchi, 1994) isoliert.

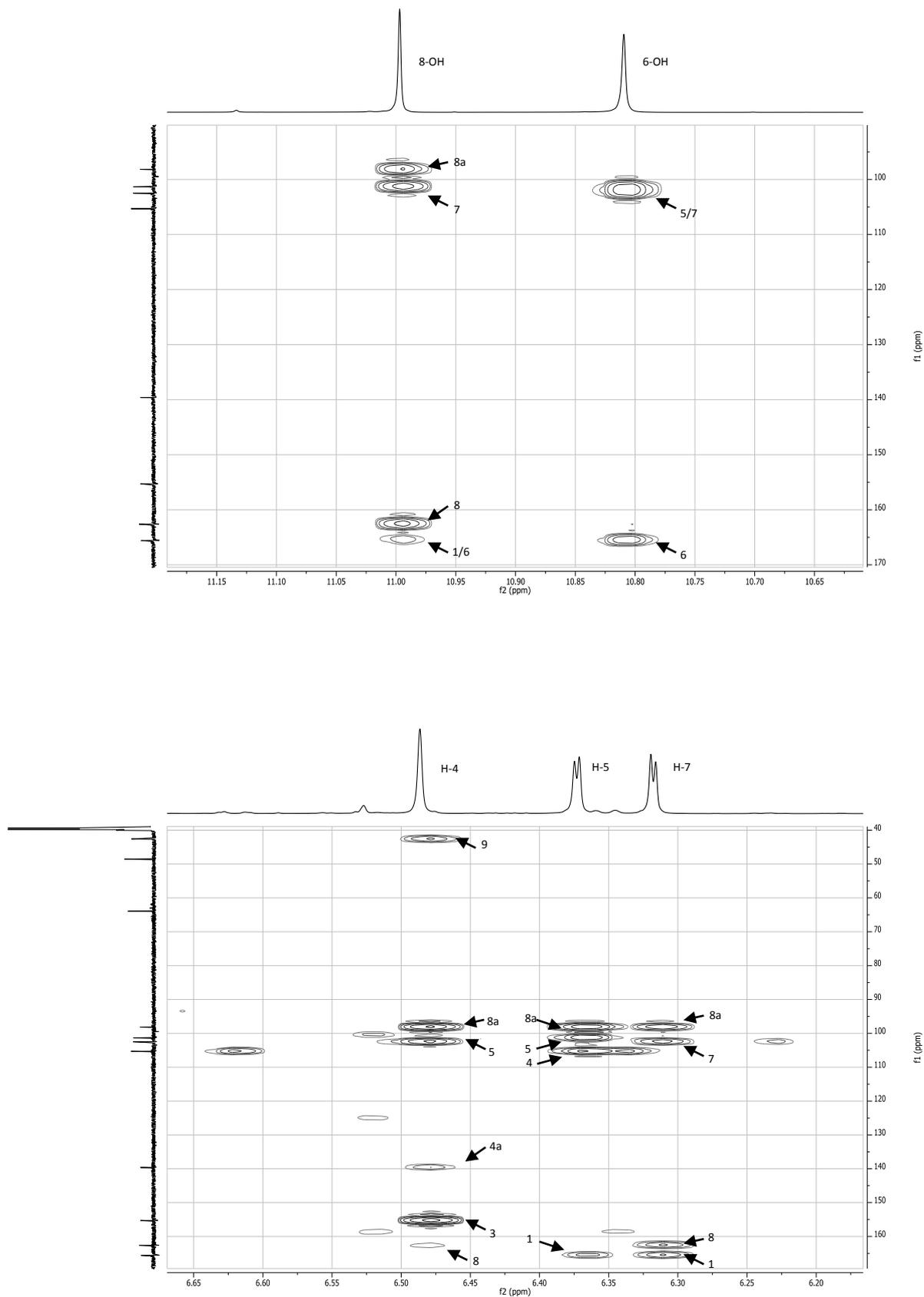


Abb.3.13a: HMBC Spektrum von Orthosporin in DMSO-*d*<sub>6</sub> bei 600 MHz.

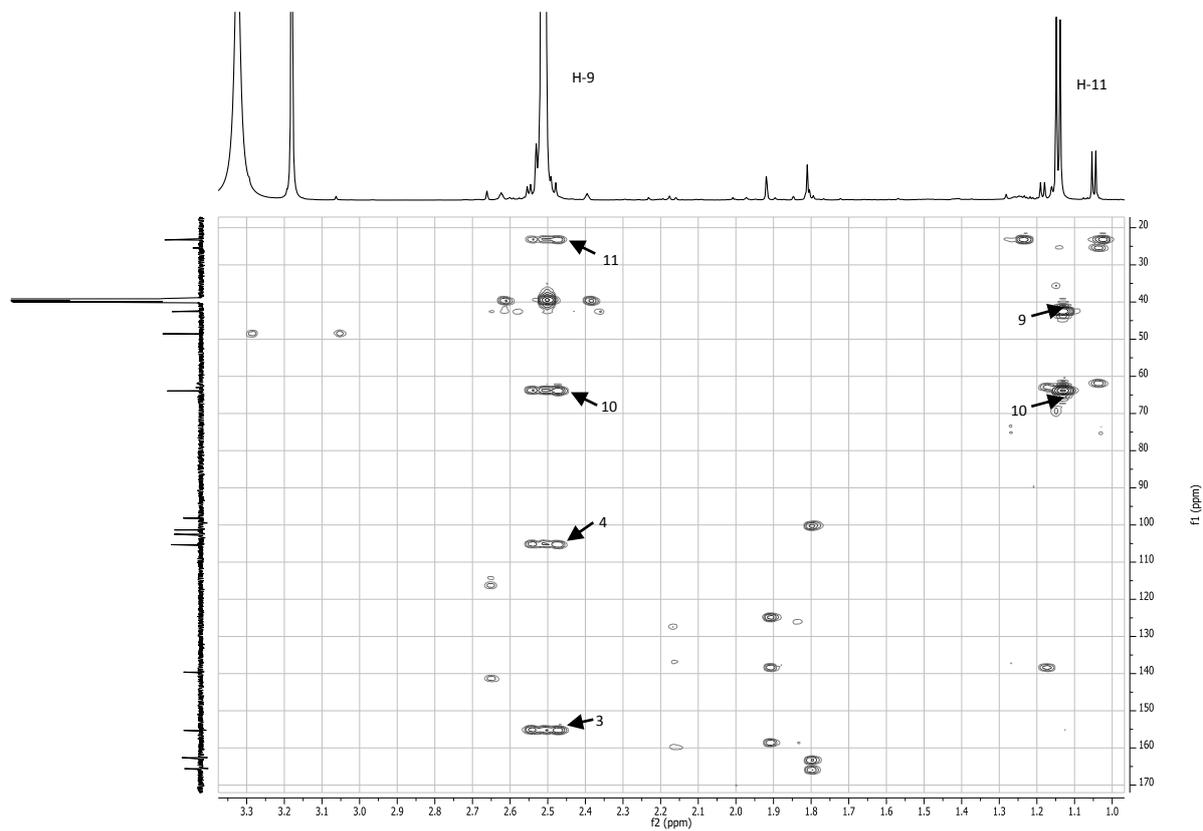
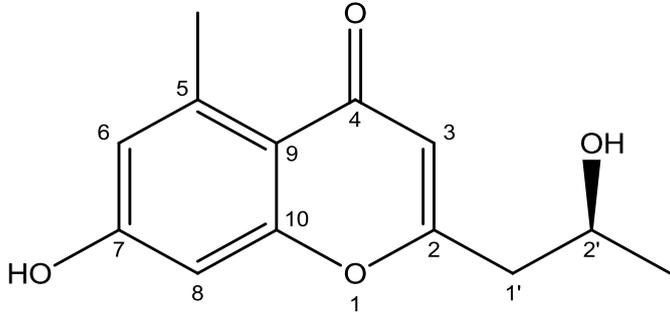
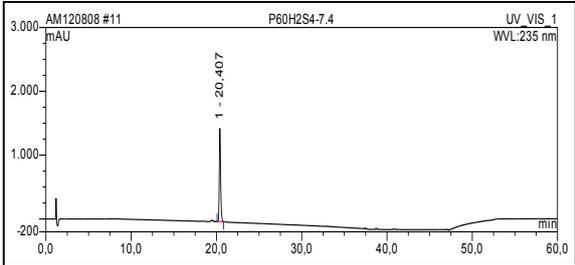
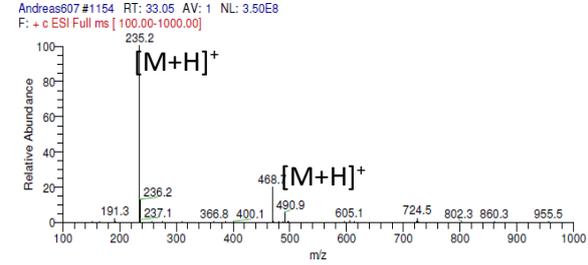
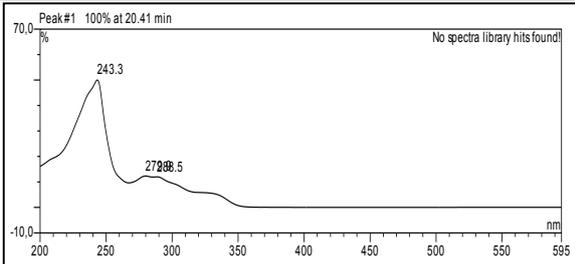
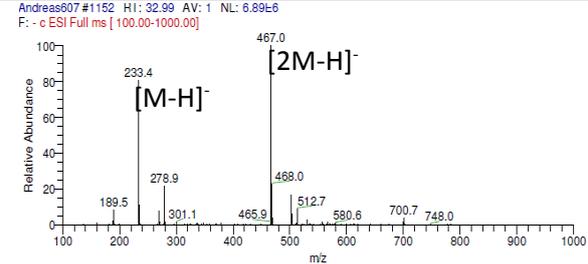


Abb.3.13b: HMBC Spektrum von Orthosporin in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

Tab. 3.33: NMR Daten von Orthosporin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 400 MHz/100 MHz (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		165,6			167,0
3		155,3			156,4
4	6,49 (1H, s)	105,3	3, 4a, 5, 8, 8a, 9	6,54 (1H, s)	106,3
4a		139,6			140,9
5	6,37 (1H, d, <i>J</i> =2,1Hz)	102,5	4, 6, 7, 8a	6,49 (1H, d, <i>J</i> =1,8Hz)	103,3
6		165,6			166,4
7	6,32 (1H, d, <i>J</i> =2,1Hz)	101,3	5, 6, 8, 8a	6,53 (1H, d, <i>J</i> =1,8Hz)	102,1
8		162,5			164,3
8a		98,2			99,7
9	2,50 (2H, m)	42,6	3, 4, 10, 11	2,72 (2H, m)	43,8
10	3,99 (1H, dd, <i>J</i> =12,6, 6,2Hz)	63,9	3	4,28 (1H, m, <i>J</i> =6,18Hz)	69,6
11	1,14 (3H, d, <i>J</i> =6,2Hz)	23,3	9, 10	1,35 (3H, d, <i>J</i> =6,18Hz)	27,7
6-OH	10,81 (1H, s)		5, 6, 7		
8-OH	11,00 (1H, s)		1, 7, 8, 8a		

a) (Gremaud and Tabacchi, 1994)

(+)-Aloesol	
<b>Synonyme</b>	7-Hydroxy-2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-(S)-4H-1-benzopyran-4-on
<b>Probencode</b>	P60H2S4-7.4
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	gelbliches Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	234 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	20,4 min
<b>Drehwert</b>	-15° (c = 0,1; MeOH)
	
	
	

Aloesol wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,4 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Maxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 243, 279 und 288 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  235,2  $[M+H]^+$  und  $m/z$  233,4  $[M-H]^-$  beobachtet

werden, welches eine Bestimmung des Molekulargewichts auf 234 g/mol zuließ. Dieses konnte durch die Beobachtung des pseudomolekularen Ions  $m/z$  468,7  $[2M+H]^+$  untermauert werden.

Die Struktur wurde anhand eines  $^1\text{H}$  NMR Experimentes und des Vergleichs der chemischen Verschiebungen, sowie des Drehwerts mit Literaturwerten aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.34) zeigte die Anwesenheit *meta*-koppelnder Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  6,61 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,63 ppm mit einer Kopplungskonstante von 2,0 Hz. Diese Resonanzen konnten H-6 und H-8 zugeordnet werden. Ebenfalls dem aromatischen Bereich zugeordnet wurde das Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  2,66 ppm, das mit einer Integration von drei Protonen als die aromatische Methylgruppe in Position 5 identifiziert wurde. Neben den aromatischen Signalen ließ sich ein weiteres tieffeldverschobenes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  5,97 ppm beobachten, welches als das olefinische H-3 festgelegt wurde. Komplexer aufgespalten lagen die Signale der aliphatischen Seitenkette vor: Die endständige Methylgruppe konnte als breites Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  1,14 ppm beobachtet werden, die Methylengruppe  $\text{CH}_2$ -1' bei  $\delta_{\text{H}}$  2,64 ppm und die benachbarte CH-Gruppe H-2', aufgrund des abschirmenden Effektes durch das benachbarte Sauerstoffatom, bei  $\delta_{\text{H}}$  4,01 ppm. Neben den Signalen des Aloesols enthielt das Spektrum zusätzlich die Signale des Orthosporins (s. Anhang 34), welche durch den Vergleich mit dem isolierten Orthosporins (s.o.) subtrahiert wurden und die verbleibenden Signale so dem Aloesol zugeordnet werden konnten. Eine zusätzliche Evidenz konnte durch das Fehlen von HMBC Korrelationen zwischen den Signalen des Orthosporins und denen des Aloesols geschaffen werden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $-15^\circ$  ( $c = 0,1$ ; MeOH), der Literaturwert  $-9,1^\circ$  ( $c = 0,23$ ; MeOH) (Kashiwada, *et al.*, 1984).

Bisher wurde Aloesol aus *Pestalotiopsis* sp. (Xu, *et al.*, 2009, Yang, *et al.*, 2013b), *Rhei rhizoma* (Kashiwada, *et al.*, 1984), *Penicillium griseofulvum* (Zhan, *et al.*, 2013), *Trichoderma aureoviride* (Khamthong, *et al.*, 2012) und den Samen von *Cassia fistula* (Kuo, *et al.*, 2002) isoliert.

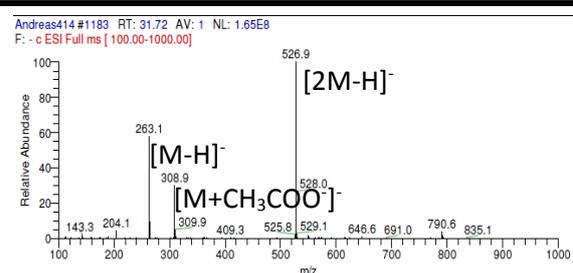
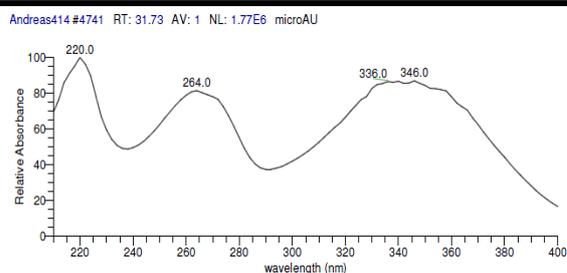
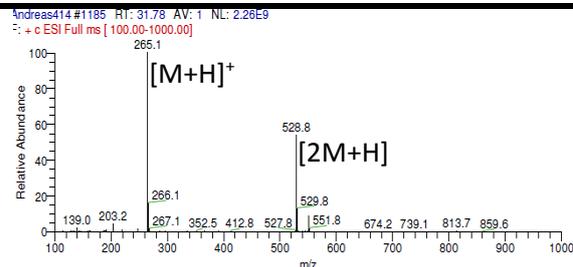
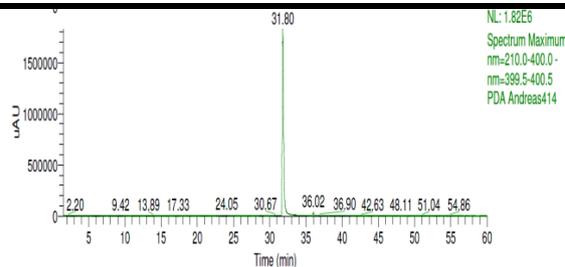
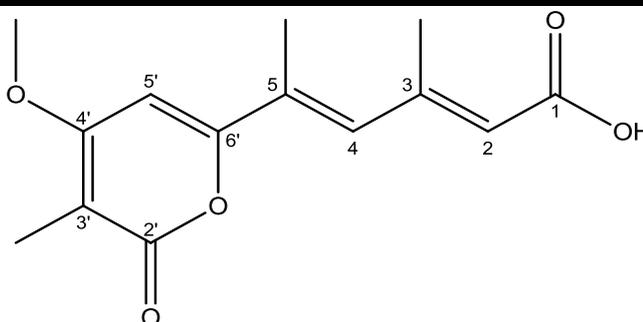
Tab. 3.34: NMR Daten von Aloesol. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 100 MHz/25 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2			73,2
3	5,97 (1H, s)	5,97 (1H, s)	44,6
4			191,2
5			139,5
6	6,61 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	6,62 (1H, s)	114,0
7			164,0
8	6,63 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	6,62 (1H, s)	101,6
9			162,6
10			111,9
1'	2,64 (2H, m)	2,67 (2H, d, <i>J</i> =6Hz)	40,5
2'	4,01 (1H, d, <i>J</i> =6,7Hz)	4,02 (1H, m)	172,1
3'	1,14 (3H, br s)	1,14 (3H, d, <i>J</i> =6Hz)	20,4
7-OH	10,49 (1H, s)	10,48 (1H, s)	
5-Me	2,66 (3H, s)	2,65 (3H, s)	22,2

a) (Kashiwada, *et al.*, 1984)

## Infectopyron

<b>Synonyme</b>	5-(4'-Methoxy-3'-methyl-2'-oxo-pyran-6'-yl)-3-methyl-(2E,4E)-2,4-hexadiensäure
<b>Probencode</b>	P40M-4 P80D60MS2-7
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	17,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	264 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	31,8 min



Infectopyron wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (17,4 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 220, 264 und 341 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  265,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$  263,1  $[M-H]^-$

beobachtet werden, was eine Bestimmung des Molekulargewicht auf 264 g/mol ermöglichte. Zudem konnten die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  528,8  $[2M+H]^+$ ,  $m/z$  308,9  $[M+CH_3COO]^-$  sowie  $m/z$  526,9  $[2M-H]^-$  beobachtet werden.

Die Struktur des Infectopyrons wurde durch ein- und zweidimensionale NMR und massenspektrometrische Experimente aufgeklärt werden.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.35), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte deutlich die Anwesenheit von vier Methylgruppen bei  $\delta_H$  2,25 ppm,  $\delta_H$  2,08 ppm,  $\delta_H$  1,82 ppm und  $\delta_H$  3,97 ppm. Diese wurden den Positionen 3- $CH_3$ , 5- $CH_3$ , 3'- $CH_3$  und 4'- $OCH_3$  zugeordnet. Neben den Methylgruppen konnten drei weitere Singulets detektiert werden, welche bei  $\delta_H$  5,78 ppm,  $\delta_H$  6,85 ppm und  $\delta_H$  6,69 ppm resonierten und den olefinischen Positionen H-2, H-4 und H-5' zugeordnet wurden. Zudem konnte die Hydroxylgruppe in Position 1 bei  $\delta_H$  12,25 ppm identifiziert werden. Der Zusammenbau der Struktur erfolgte anhand der HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.14). Die Seitenkette konnte durch die  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen von H-2 zu C-3 und C1, bzw. C-4 und C-3Me, von 3- $CH_3$  zu C-3, bzw. C-2 und C-4, von H-4 zu C-5, bzw. C-2 und 5-Me und jenen von 5- $CH_3$  zu C-5, bzw. C-4 bestätigt werden. Die Konstitution des Pyronringes konnte ebenfalls durch die HMBC Korrelationen bestimmt werden. 3'- $CH_3$  zeigte  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen zu C-2', C3', C4' und C-5', H-5' zu C-3' und C-4'. Gleichzeitig konnte die Korrelation von 4'- $OCH_3$  zu C-4' beobachtet werden, welches die Positionierung der Methoxygruppe in Position 4' erlaubte. Die Untersuchung der chemischen Verschiebung von C-2' und C-6' zeigte eine starke Entschirmung der Kerne, so dass diese bei  $\delta_C$  167,1 ppm und  $\delta_C$  158,3 ppm resonierten. Diese Verschiebungen und die verbleibende Differenz von 32 amu zum bestimmten Molekulargewicht indizierten den Lactonring. Die Verknüpfung der offenkettigen Partialstruktur und dem Pyronkörper konnte durch die Korrelationen von H-5' zu C-5, sowie den Korrelationen von H-4 und 5- $CH_3$  zu C-6' bestätigt werden.

Der Stereochemie der Doppelbindungen konnte durch die NOESY Korrelationen (s. Abb. 3.15) von H-5' zu 4'-OMe und 5-Me, sowie den Korrelationen von 5-Me zu 3-Me bestätigt werden.

Bisher wurde Infectopyron aus *Alternaria* sp. (Ostenfeld Larsen, *et al.*, 2003, Pedras, *et al.*, 2009) und *Ulocladium* sp. (Andersen and Hollensted, 2008) isoliert.

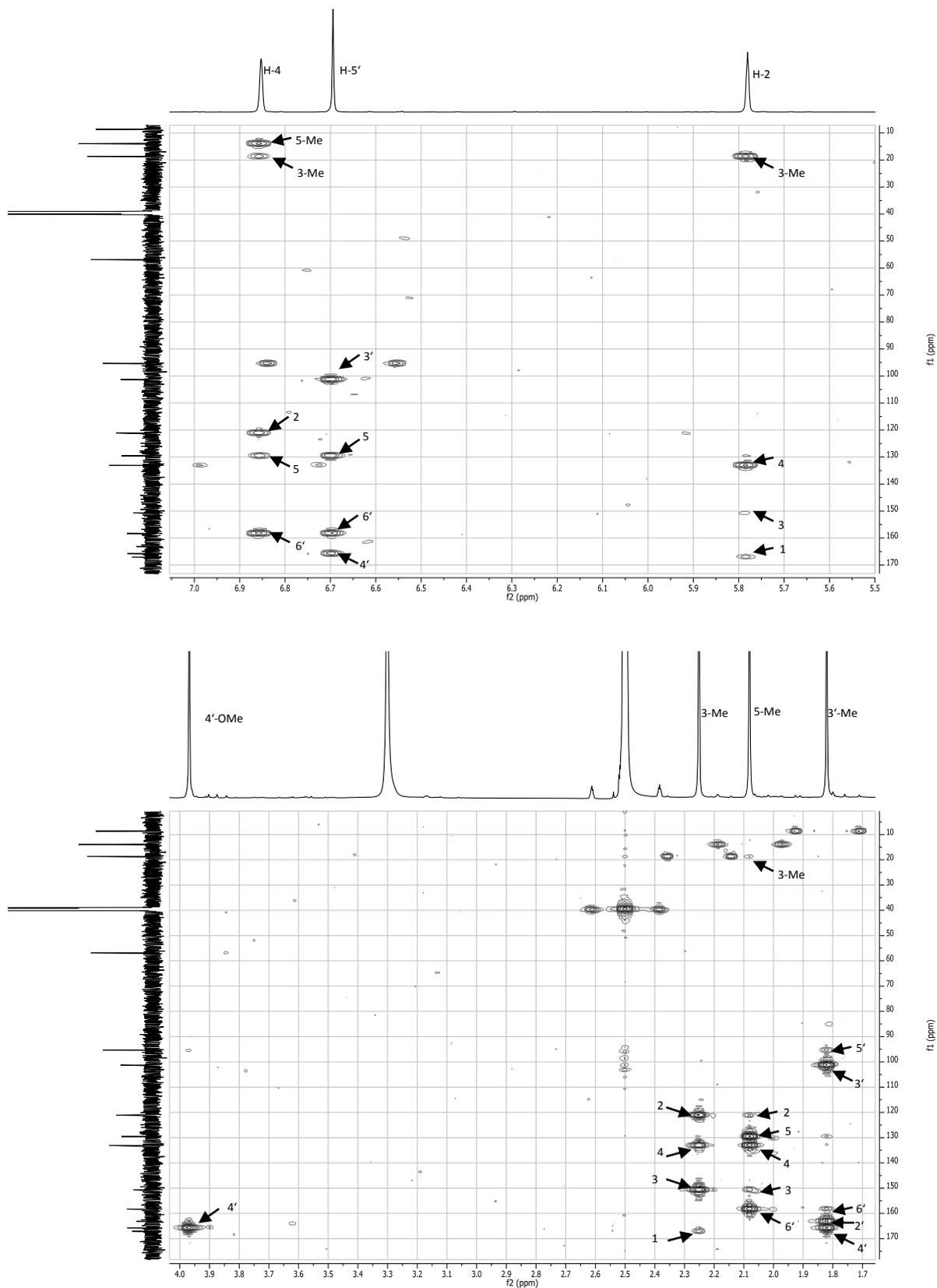
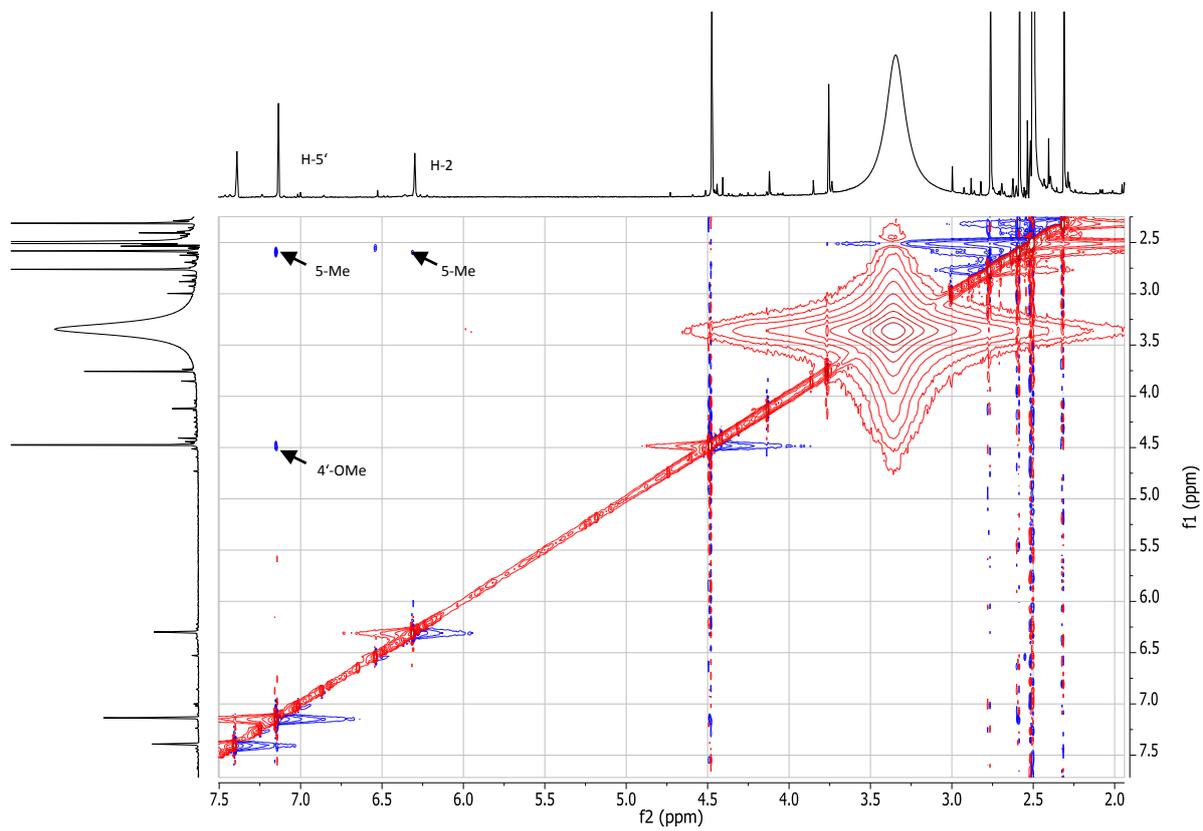


Abb.3.14: HMBC Spektrum von Infectopyron in  $DMDO-d_6$  bei 600 MHz.



**Abb.3.15:** NOESY Spektrum von Infectopyron in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz

Tab. 3.35: NMR Daten von Infectopyron. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 500 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1	12,25 (1H, br s)	167,1			167,3	
2	5,78 (1H, br s)	121,1	1, 3, 4, 3-Me	5,90 (1H, m, <i>J</i> =1,5Hz)	121,5	1, 4, 5, 3-Me
3		150,7			150,5	
4	6,85 (1H, br s)	133,1	2, 5, 6', 3-Me, 5-Me	6,96 (1H, br s)	133,3	2, 5, 6', 5-Me
5		129,6			129,6	
2'		163,2			163,3	
3'		101,3			101,4	
4'		165,8			165,9	
5'	6,69 (1H, s)	95,3	5, 3', 4', 6'	6,79 (1H, m, <i>J</i> =1,5Hz)	95,5	5, 3', 4', 6', 3'-Me
6'		158,3			158,5	
3-Me	2,25 (3H, s)	18,7	1, 2, 3, 4	2,36 (3H, m, <i>J</i> =1,5Hz)	18,8	1, 2, 3, 4
5-Me	2,08 (3H, s)	13,9	2, 3, 4, 5, 6', 3-Me	2,19 (3H, m, <i>J</i> =1,5Hz)	14,1	4, 5, 6', 3-Me
3'-Me	1,82 (3H, s)	8,7	2', 3', 4', 5', 6'	1,93 (3H, s)	8,8	3', 4', 5'
4'-OMe	3,97 (3H, s)	56,8	4'	4,08(3H, s)	57,0	

a) (Ostenfeld Larsen, *et al.*, 2003)

4Z-Infectopyron	
<b>Synonyme</b>	5-(4'-Methoxy-3'-methyl-2'-oxo-pyran-6'-yl)-3-methyl-(2E,4Z)-2,4-hexadiensäure
<b>Probencode</b>	P40M-3
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,5 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	264 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	29,5 min

4Z-Infectopyron wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,5 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 224, 262 und 336 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im

negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  265,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  263,1  $[M-H]^-$  beobachtet werden, welche eine Bestimmung des Molekulargewichts auf 264 g/mol zuließen. Zudem wurden die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  550,9  $[2M+Na]^+$ ,  $m/z$  308,8  $[M+CH_3COO]^-$  sowie  $m/z$  526,9  $[2M-H]^-$  detektiert.

Die Struktur des 4Z-Infecopyrons wurde anhand von ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten aufgeklärt. Wie auch beim Infecopyron zeigten sich im  $^1H$  NMR Spektrum (s. Tab. 3.36), aufgenommen in deuteriertem DMSO, vier Methylgruppen, eine davon durch die Verschiebung von  $\delta_H$  3,91 ppm als Methoxygruppe interpretiert, sowie drei Singulets im Bereich von  $\delta_H$  2,08 ppm,  $\delta_H$  2,07 ppm und  $\delta_H$  1,81 ppm, welche 3-Me, 5-Me und 3'-Me zugeordnet werden konnten. Neben den Signalen der Methylgruppen konnten drei weitere olefinische Signale bei  $\delta_H$  5,70 ppm,  $\delta_H$  6,43 ppm und  $\delta_H$  6,62 ppm beobachtet werden, welche den Positionen H-2, H-4 und H-5' zugeordnet wurden. Beim Vergleich der chemischen Verschiebungen, insbesondere von H-4 und 3-Me, mit denen des *all trans*-Infecopyrons konnte eine stärkere Abschirmung von H-4 um  $\Delta\delta_H$  0,41 ppm, sowie eine stärkere Abschirmung der Methylgruppe von rund  $\Delta\delta_H$  0,20 ppm beobachtet werden. Dem gegenüber standen die nahezu unveränderten chemischen Verschiebungen der übrigen Positionen, welches auf eine Änderung der Konfiguration an C-4 hindeutete. Die Untersuchung des NOESY NMR Spektrums (s. Abb. 3.16) zeigte deutliche Korrelationen von H-5' zu 4'-OMe, sowie 5-Me. 5-Me wiederum zeigte deutliche Korrelationen zu H-4 und dieses zu H-2. Dies ließ den Schluss zu, dass alle Protonen räumlich gleich ausgerichtet waren und damit die Doppelbindung in Position 4 eindeutig als *z*-konfiguriert identifiziert werden konnte. Andernfalls hätte H-4, wie auch im Fall des Infecopyrons, keine Korrelation zu 5-Me zeigen dürfen.

4Z-Infecopyron wurde bisher aus *Alternaria infectoria* (Andersen, *et al.*, 2009, Christensen, *et al.*, 2005) isoliert.

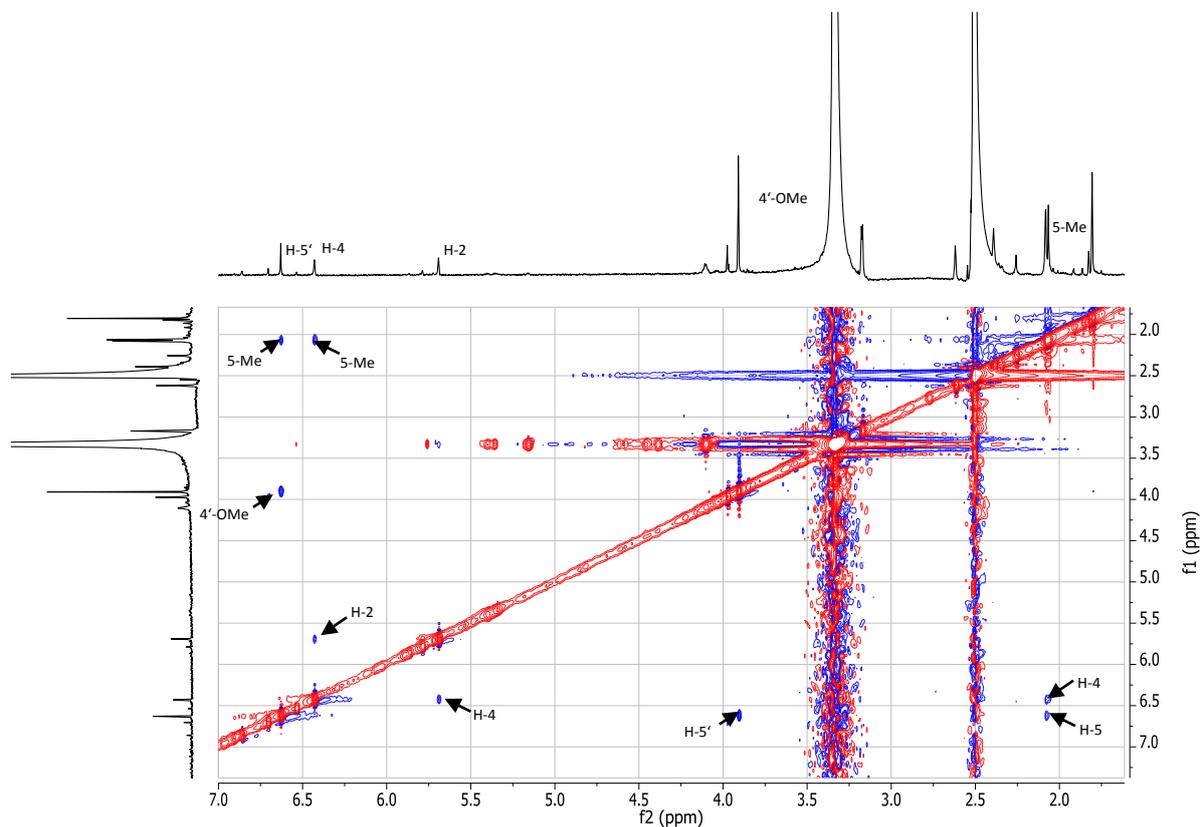


Abb.3.16: NOESY Spektrum von 4Z-Infectedopyron in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

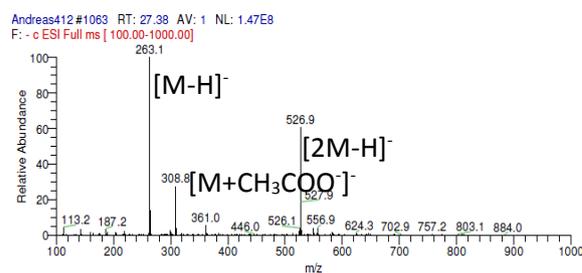
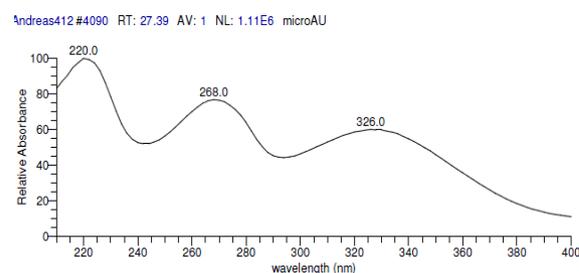
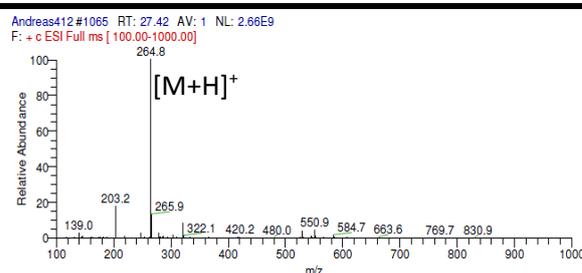
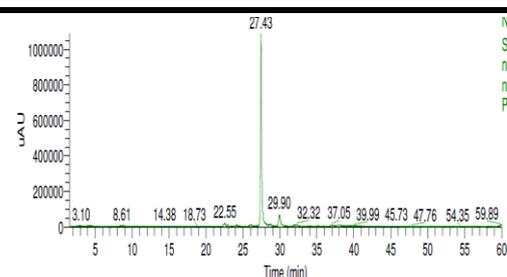
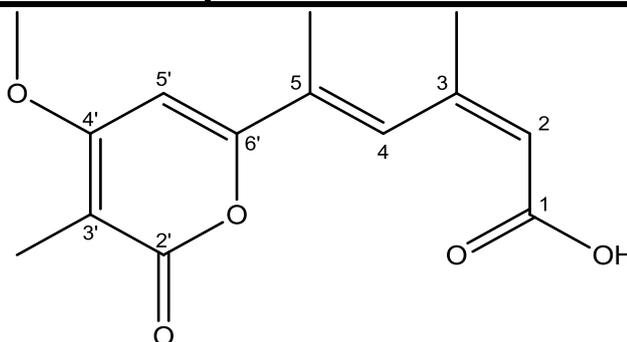
Tab. 3.36: NMR Daten von 4Z-Infectedopyron. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz		Lit. 500 MHz/125 MHz (Aceton- $d_6$ ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_H$ (DMSO- $d_6$ )	NOESY	$\delta_H$	$\delta_C$
1				168,2
2	5,70 (1H, s)	H-4	5,87 (1H, m)	121,1
3				154,2
4	6,43 (1H, s)	H-2, H-5Me	6,50 (1H, s)	136,8
5				133,7
2'				164,9
3'				103,2
4'				166,7
5'	6,62 (1H, s)	H-5-Me, H-4'-OMe	6,64 (1H, m)	98,2
6'				160,6
3-Me	2,08 (3H, d, $J=1,0$ Hz)		2,27 (3H, m)	19,1
5-Me	2,07 (3H, d, $J=1,0$ Hz)	H-4, H-5	2,20 (3H, d, $J=1,5$ Hz)	23,3
3'-Me	1,81 (3H, s)		1,93 (3H, s)	9,3
4'-OMe	3,91 (3H, s)	H-5'	4,05 (3H, s)	57,7

a) (Christensen, *et al.*, 2005)

**2Z-Infectopyron**

<b>Synonyme</b>	5-(4'-Methoxy-3'-methyl-2'-oxo-pyran-6'-yl)-3-methyl-(2Z,4E)-2,4-hexadiensäure
<b>Probencode</b>	P40M-2
<b>Quelle</b>	<i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	1,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	264 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	27,4 min



2Z-Infectopyron wurde aus der Ethylacetatfraktion des Reisextraktes von *Pleospora* sp. gewonnen (1,2 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 220, 268 und 326 nm auf. Im ESI Massenspektrum konnten sowohl im positiven, als auch im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  264,8  $[M+H]^+$  und  $m/z$  263,1  $[M-H]^-$

## ***Ergebnisse***

---

beobachtet werden, welche eine Bestimmung des Molekulargewichts auf 264 g/mol ermöglichten. Zudem ließen sich die pseudomolekularen Ionen bei  $m/z$  308,8  $[M+CH_3COO]^-$  und  $m/z$  526,9  $[2M-H]^-$  beobachten.

Die Struktur des 2Z-Infecopyrons wurde anhand von  $^1H$ -NMR- und massenspektrometrischen Experimenten und Literaturvergleich bestätigt.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.37), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte ein ähnliches Muster, wie es bereits bei den anderen Infecopyrnderivaten beobachtet worden war: insgesamt traten vier Methylgruppen bei  $\delta_H$  2,04 ppm,  $\delta_H$  1,92 ppm,  $\delta_H$  1,83 ppm und  $\delta_H$  3,97 ppm auf, welche den Positionen 3-Me, 5-Me, 3'-Me und 4'-OMe zugeordnet wurden. Neben diesen Signalen waren ebenfalls drei weitere, weiter tieffeldverschobene olefinische Signale bei  $\delta_H$  5,87 ppm,  $\delta_H$  7,28 ppm und  $\delta_H$  6,62 ppm zu beobachten, welche als die Protonen H-2, H-4 und H-5' interpretiert wurden. Im Vergleich zu den anderen bereits beschriebenen Infecopyrnderivaten zeigte sich eine deutliche Tieffeldverschiebung von  $\Delta\delta_H$  0,59 ppm bis  $\Delta\delta_H$  0,66 ppm des Protons H-5', das auf eine stärkere Entschirmung hindeutet, wohingegen 3-Me und 5-Me stärker abgeschirmt waren. Als mögliche Erklärung hierfür kann die räumlich verkürzte Distanz zwischen der Säurefunktion und H-5' gesehen werden. Die chemischen Verschiebungen des Pyronteils waren nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen erlaubten, im Vergleich mit den Literaturwerten, die Identifizierung als 2Z-Infecopyron.

Bisher wurde 2Z-Infecopyron nur synthetisch hergestellt (Geiseler and Podlech, 2012) und wurde hier erstmals als Naturstoff isoliert.

Tab. 3.37: NMR Daten von 2Z-Infectopyron. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz	Lit. 400 MHz/100 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	12,10 (1H, s)	12,18 (1H, s)	166,2
2	5,87 (1H, m)	5,86 (1H,s)	120,7
3			150,3
4	6,62 (1H, m)	6,61 (1H, s)	131,0
5			127,8
2'			163,2
3'			100,8
4'			165,8
5'	7,28 (1H, s)	7,27 (1H, s)	94,3
6'			158,3
3-Me	2,04 (3H, s)	2,03 (3H, s)	13,7
5-Me	1,92 (3H, s)	1,91 (3H, s)	23,9
3'-Me	1,83 (3H, s)	1,82 (3H, s)	8,6
4'-OMe	3,97 (3H, s)	3,96 (3H, s)	56,7

a) (Geiseler and Podlech, 2012)

3.1.3.2 Semisynthetische Verbindungen aus *Pleospora* sp. Metaboliten

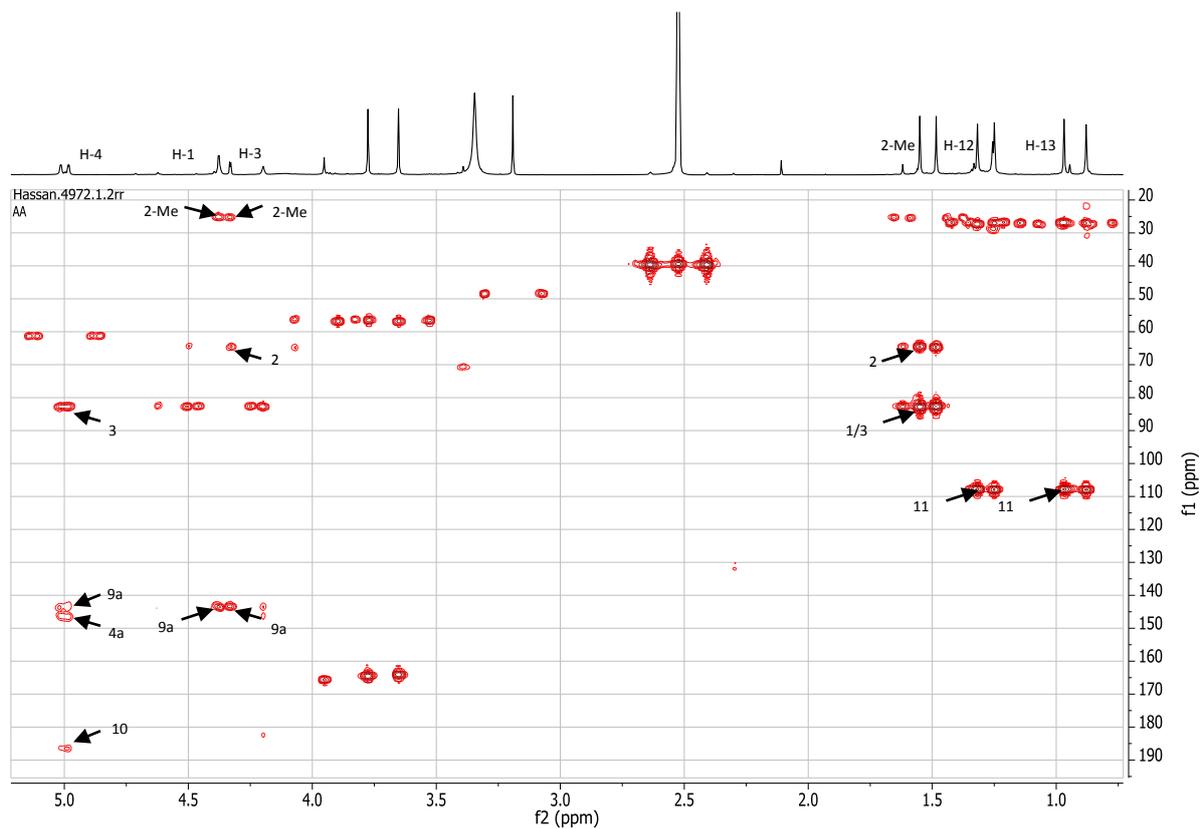
Altersolanol A Acetonid	
Probencode	Altersolanol A Acetonid
Quelle	Semisynthetisch aus Altersolanol A aus <i>Pleospora</i> sp.
Menge	18,0 mg
Physikalische Beschreibung	Rotes Pulver
Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>
Molekulargewicht	376 g/mol
HPLC-Retentionszeit	27,7 min
Drehwert	+164 ° (c = 0,5; MeOH)

Altersolanol A Acetonid wurde aus Altersolanol A semisynthetisch hergestellt (18,0 mg) (s. 2.2.6.2.2). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 220, 270 und 436 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, bzw. im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  774,9  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  375,4  $[M-H]^-$

erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 376 g/mol schließen ließen. Ebenfalls ließen sich die pseudomolekularen Peaks bei  $m/z$  377,2  $[M+H]^+$  und  $m/z$  750,8  $[2M-H]^-$  erkennen.

Die strukturelle Aufklärung von Altersolanol A Acetonid erfolgte durch massenspektrometrische sowie NMR Experimente.

Die Untersuchung des in deuteriertem DMSO gemessenen  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.38) zeigte die Anwesenheit von insgesamt zwanzig Protonen. Im direkten Vergleich zu Altersolanol A konnten zwei zusätzliche Signale bei  $\delta_H$  1,31 ppm und  $\delta_H$  0,97 ppm beobachtet werden, welche jeweils über eine Integration von drei Protonen verfügten. Diese Signale wurden den Methylgruppen des Acetonids zugeordnet. Durch die Untersuchung des HMBC Spektrums (s. Abb. 3.17) konnte die Substitution des ungesättigten Ringsystems bestätigt werden. Als wichtige Korrelationen sind hierbei jene von H-1 zu C-2Me und C-9a, H-2Me zu C-1, C-2 und C-3, H-3 zu C-2 und C-2Me und H-4 zu C-3, C-4a, C-9a und C-10, sowie von H-12 und H-13 zu C-11 identifiziert werden. Insbesondere der Vergleich der chemischen Verschiebungen von C-2 und C-3 bei  $\delta_C$  64,5 ppm und  $\delta_C$  82,6 ppm mit denen des Altersolanol A zeigten an, dass die Hydroxylgruppen substituiert vorliegen mussten. In Kombination mit dem im Vergleich zum Altersolanol A um 40 amu erhöhten Molekulargewicht, konnte das Altersolanol A Acetonid so eindeutig identifiziert werden.



**Abb. 3.17:** Ausgewählte HMBC Korrelationen des Altersolanol A Acetonid gemessen in DMSO- $d_6$  bei 600MHz.

Tab. 3.38: NMR Daten von Altersolanol A Acetonid.

Position	Altersolanol A Acetonid 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		Altersolanol A Lit. 100 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	4,40 (1H, br s)	64,5	4,38 (1H, s)	68,3
2		82,8		72,7
3	4,31 (1H, br s)	82,6	3,64 (1H, m)	73,6
4	4,95 (1H, br s)	61,3	4,54 (1H, m)	68,3
4a		146,3		144,2
5		164,1		162,9
6	6,99 (1H, br s)	104,4	6,72 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	105,6
7		164,2		165,1
8	7,03 (1H, br s)	104,5	6,93 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	106,7
8a		122,6		132,9
9		182,5		183,3
9a		143,4		141,8
10		186,5		188,1
10a		108,6		109,2
11		107,9		
12	1,31 (3H, s)	26,9		
13	0,97 (3H, s)	27,3		
2-Me	1,53 (3H, s)	25,8	1,24 (3H, s)	22,2
7-OMe	3,75 (3H, s)	56,9	3,90 (3H, s)	56,1
1-OH			5,30 (1H, s)	
2-OH			4,48 (1H, br s)	
3-OH			5,00 (1H, d, <i>J</i> =7,0Hz)	
5-OH	12,97 (1H, s)		12,15 (1H, s)	

<sup>a)</sup> (Yagi, *et al.*, 1993)

## Altersolanol A Acetonidtrimethylether

Probencode

Altersolanol A Actonidtrimethylether

Quelle

Semisynthetisch aus Altersolanol A Acetonid

Menge

3,4 mg

Physikalische Beschreibung

Rotes Pulver

Summenformel

 $C_{22}H_{26}O_8$ 

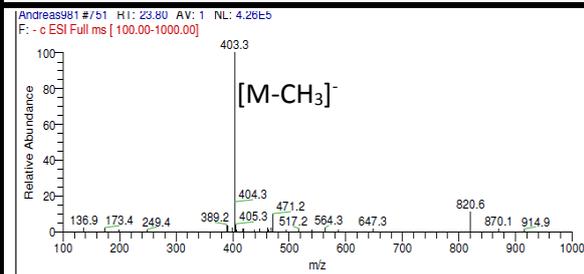
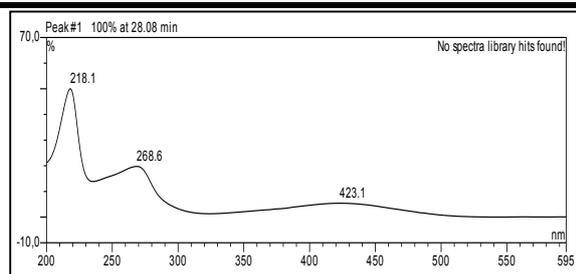
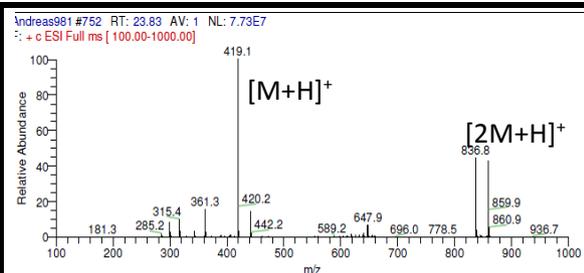
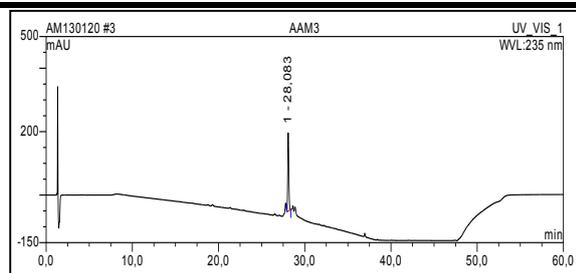
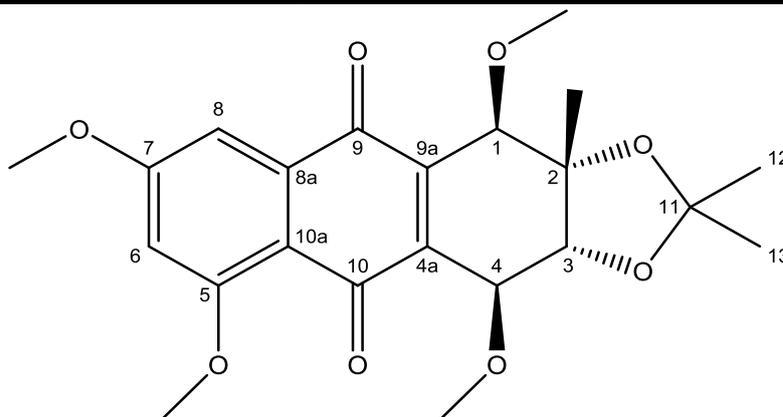
Molekulargewicht

418 g/mol

HPLC-Retentionszeit

28,1 min

Drehwert

 $+49^\circ$  (c=0,1; MeOH)

Altersolanol A Acetonidtrimethylether wurde aus Altersolanol A Acetonid semisynthetisch hergestellt (mg) (s. 2.2.6.2.2). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 218, 269 und 423 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, als auch negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  419,1  $[M+H]^+$  und  $m/z$

403,3 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> erkennen, welche auf ein Molekulargewicht von 418 g/mol schließen ließen. Ebenfalls ließ sich das pseudomolekulare Ion mit  $m/z$  836,8 [2M+H]<sup>+</sup> beobachten, das die Aussage festigte.

Die Struktur wurde aufgrund der massenspektrometrischen und UV spektroskopischen Analysen bestätigt.

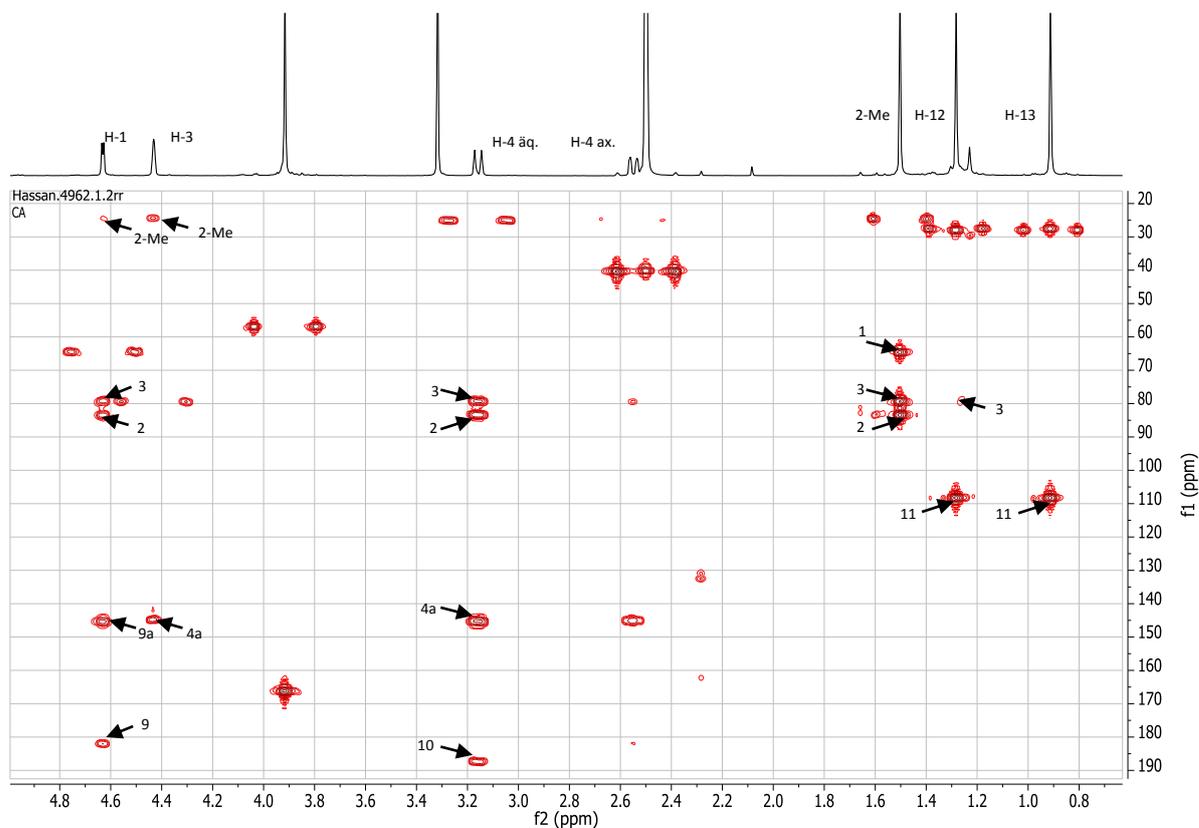
Altersolanol C Acetonid	
<b>Probencode</b>	P20H-70M-7
<b>Quelle</b>	Semisynthetisch aus Altersolanol C
<b>Menge</b>	16,4 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelb-rote Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	360 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	28,3 min
<b>Drehwert</b>	+105 ° (c = 0,5; MeOH)

Altersolanol C Acetonid wurde aus Altersolanol C aus *Pleospora* sp. hergestellt (16,4 mg). Die Substanz wies drei charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 218, 271 und 433 nm auf. Im ESI Massenspektrum ließen sich sowohl im positiven, bzw. im negativen Ionisierungsmodus die Basispeaks bei  $m/z$  361,4  $[M+H]^+$  und  $m/z$  359,3  $[M-H]^-$  erkennen, welche

auf ein Molekulargewicht von 360 g/mol schließen ließen. Ebenfalls ließen sich die pseudomolekularen Peaks bei  $m/z$  742,8  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  718,8  $[2M-H]^-$  erkennen.

Die Struktur von Altersolanol C Acetonid wurde mit Hilfe von  $^1H$ ,  $^{13}C$  und HMBC NMR Experimenten bestätigt (s. Tab. 3.39).

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums, aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte eine ähnliche Signalverteilung wie bereits zuvor für das Altersolanol C (s. 3.1.2) beschrieben. Im Gegensatz zu diesem zeigten sich jedoch zwei zusätzliche Signale bei  $\delta_H$  1,28 ppm und  $\delta_H$  0,91 ppm, welche den Methylgruppen des Acetonids zugeordnet wurden. Die Struktur konnte durch die Untersuchung des HMBC Spektrums (s. Abb. 3.18) eindeutig identifiziert werden. Die wichtigsten Korrelationen zur Bestätigung der ungesättigten Ringstruktur sind jene von H-1 zu C-2, C-3, C-9, C-2Me und C-9a, von H-2Me zu C-1, C-2 und C-3, von H-3 zu C-1, C-4a und C-2Me, sowie von H-4 zu C-2, C-3, C-4a und C-10. C-2 ( $\delta_C$  83.3 ppm) und C-3 ( $\delta_C$  79.6 ppm) zeigten eine deutliche Tieffeldverschiebung im Vergleich zu den beiden Kohlenstoffatomen des Altersolanol C, welche bei  $\delta_C$  71,9 ppm bzw.  $\delta_C$  66,7 ppm vorlagen und deuteten damit eine Substitution der Hydroxylgruppen an. Dieses, in Kombination mit der HMBC Korrelation von H-12 zu C-3 und dem im Vergleich zum Altersolanol C um 40 amu vergrößerten Molekulargewicht bestätigte eindeutig die Struktur des Altersolanol C Acetonids.



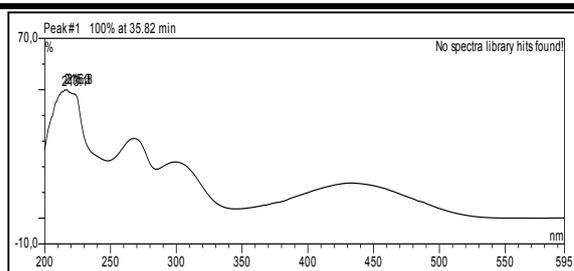
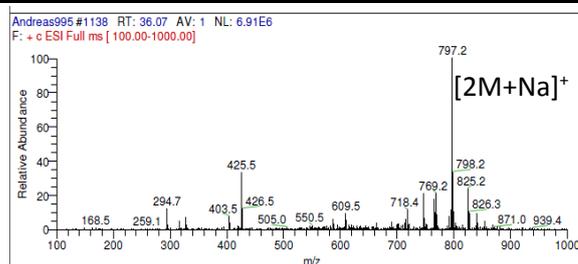
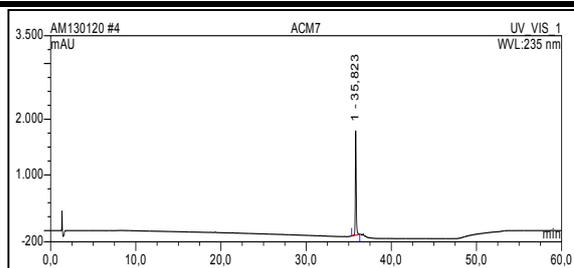
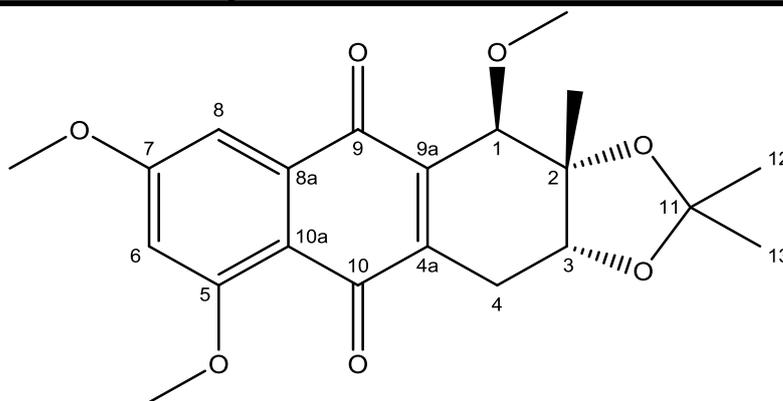
**Abb. 3.18:** Ausgewählte HMBC Korrelationen des Altersolanol C Acetonid gemessen in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

Tab. 3.39: NMR Daten von Altersolanol C Acetonid.

Position	Altersolanol C Acetonid 600 MHz/150 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		Altersolanol C 600 MHz/150 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	4,63 (1H, d, 4,5 Hz)	65,0	4,33 (1H, d, <i>J</i> =6,6Hz)	69,2
2		83,3		71,9
3	4,43 (1H, dt, 16,4, 2,0 Hz)	79,6	3,75 (1H,dd, <i>J</i> =16,1, 6,3Hz)	66,7
4	2,55 (1H, dd, <i>J</i> =20,0, 2,0Hz)	28,6	2,35 (1H, dt, <i>J</i> =19,4, 9,8Hz)	29,0
	3,15 (1H, dd, <i>J</i> =20,0, 9,0Hz)		2,79 (1H, dd, <i>J</i> =19,4, 5,9Hz)	
4a		144,6		143,8
5		164,1		163,3
6	6,86 (1H, br s)	106,4	6,82 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	105,6
7		165,5		165,6
8	7,10 (1H,br s)	108,0	7,03 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	106,9
8a		133,6		133,4
9		181,7		182,9
9a		145,2		143,0
10		187,4		188,1
10a		109,3		109,1
11		108,3		
12	1,28 (3H, s)	27,5		
13	0,91 (3H, s)	27,5		
2-Me	1,50 (3H, s)	24,9	1,27 (3H, s)	21,8
7-OMe	3,92 (3H, s)	56,9	3,91 (3H, s)	56,3
1-OH	5,60 (1H, d, 4,0 Hz)		5,50 (1H, s)	
2-OH			4,38 (1H, s)	
3-OH			4,67 (1H, d, <i>J</i> =6,8Hz)	
5-OH	12,15 (1H, s)		12,19 (1H, s)	

## Altersolanol C Acetoniddimethylether

<b>Probencode</b>	P20H-70M-7
<b>Quelle</b>	Semisynthetisch aus Altersolanol C aus <i>Pleospora</i> sp.
<b>Menge</b>	3,8 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelb-rote Kristalle
<b>Summenformel</b>	C <sub>219</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	388 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	35,8 min
<b>Drehwert</b>	+45° (c=0,1; MeOH)



Keine Ionisierung

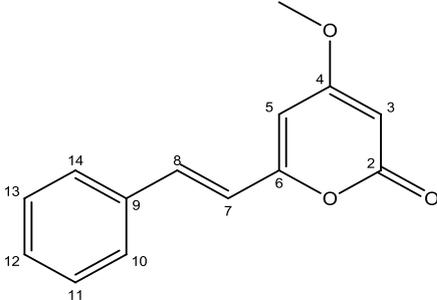
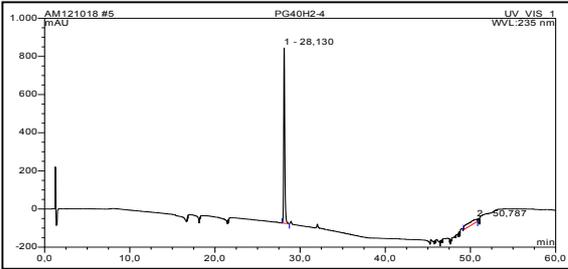
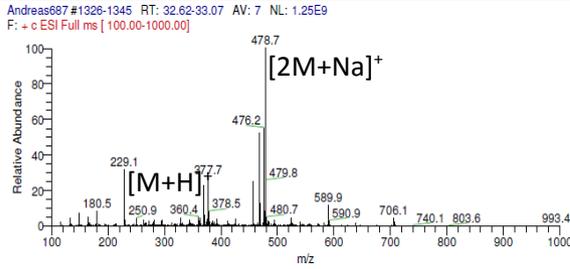
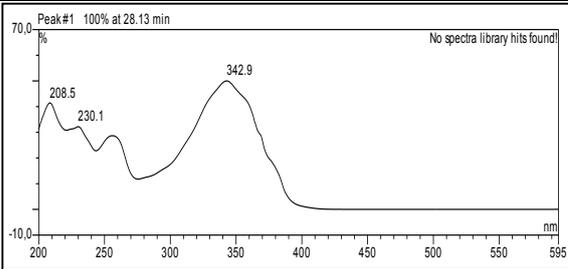
Altersolanol C Acetoniddimethylether wurde aus Altersolanol C Acetonid semisynthetisch hergestellt (mg) (s. 2.2.6.2.2). Die Substanz wies vier charakteristische UV Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 222, 268, 300 und 434 nm auf. Das ESI Massenspektrum ließ im positiven Modus der Basispeak  $m/z$  797,2  $[2M+Na]^+$  erkennen, welcher auf ein Molekulargewicht von 388 g/mol schließen ließ.

## *Ergebnisse*

---

Die Struktur wurde aufgrund der massenspektrometrischen und UV spektroskopischen Analysen bestätigt.

3.1.3 Isolierte Verbindungen aus *Penicillium glabrum*

Desmethoxyyangonin	
<b>Synonyme</b>	4-Methoxy-6-(2-phenylethenyl)-(E)-2H-pyran-2-on; 4-Methoxy-6-styryl-(E)-2H-pyran-2-on; Demethoxy-Yangonin; 5,6-Dehydrokavain; 5,6-Dehydrokawain; <i>trans</i> -5,6-Dehydrokawain
<b>Probencode</b>	PG40H2-4
<b>Quelle</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>Menge</b>	20,2 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	228 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	27,9 min
	
	
	Keine Ionisierung

Desmethoxyyangonin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* über eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei

charakteristische Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 209, 230 und 343 nm, welche typisch für Zimtsäurederivate sind. Im Massenchromatogramm ließ sich der Basispeak  $m/z$  478,7  $[2M+Na]^+$  detektieren, sowie  $m/z$  229,1  $[M+H]^+$ , wodurch auf ein Molekulargewicht von 228g/mol geschlossen werden konnte. Eine Ionisierung im negativen ESI Modus konnte nicht beobachtet werden.

Die Struktur des Desmethoxyyangonins wurde anhand eines  $^1\text{H}$  NMR Spektrums aufgenommen in deuteriertem DMSO und Literaturabgleich aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.40) zeigte deutlich die Präsenz eines AA'BB'C-Systems, welches bei  $\delta_{\text{H}}$  7,64 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,41 ppm resonierte, wobei  $\delta_{\text{H}}$  7,64 ppm durch seine Integration von zwei Protonen H-10 und H-14 zugeordnet wurde und  $\delta_{\text{H}}$  7,41 ppm den Protonen H-11 bis H-13. Eine weitere Evidenz für die Positionierung von H-10 und H-14 war durch die Kopplungskonstante von 7,6 Hz gegeben, welche *ortho*-ständige Protonen indizierte. Neben den aromatischen Protonen ließen sich die Protonen einer *trans*-Doppelbindung bei  $\delta_{\text{H}}$  7,01 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,32 ppm identifizieren, welche den Positionen H-7 und H-8 zugeordnet wurden. Zudem konnten dem Spektrum zwei weitere Signale mit der Integration von einem Proton entnommen werden, welche mit 1,9 Hz zueinander koppelten und bei  $\delta_{\text{H}}$  5,65 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,32 ppm resonierten. Diese Signale wurden den Protonen H-3 und H-5 des Pyronteils zugeordnet. Als letztes verbleibendes Signal konnte eine aromatische Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  3,83 ppm beobachtet werden, welche 4-OMe zugeschrieben wurde. Im Vergleich zu den Literaturwerten ist eine Differenz, insbesondere der aromatischen Protonen, von rund  $\delta_{\text{H}}$  0,50 ppm zu beobachten, welche sich durch den stärkeren Anisotropieeffekt des deuterierten Chloroforms im Vergleich zum DMSO und gerätespezifischen Abweichungen erklären lässt.

Bisher wurde Desmethoxyyangonin aus *Piper methysticum* (Dharmaratne, *et al.*, 2002), *Scorzonera austriaca* (Jiang, *et al.*, 2007) und *Boesenbergia rotunda* (Morikawa, *et al.*, 2008) isoliert. Soweit bekannt ist, wurde Desmethoxyyangonin bisher weder aus endophytischen Pilzen noch aus Pilzen generell isoliert.

Tab. 3.40: NMR Daten von Desmethoxyyangonin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz	Lit. 500 MHz/125 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2			164,2
3	5,65 (1H, d, <i>J</i> =1,9Hz)	5,44 (1H, d, <i>J</i> =1,4Hz)	89,2
4			171,4
5	6,32 (1H, d, <i>J</i> =1,9Hz)	5,90 (1H, s)	101,8
6			158,9
7	7,01 (1H, d, <i>J</i> =16,3Hz)	6,54 (1H, d, <i>J</i> =15,9Hz)	119,1
8	7,32 (1H, d, <i>J</i> =16,3Hz)	7,44 (1H, d, <i>J</i> =15,9Hz)	135,8
9			135,6
10	7,64 (1H, d, <i>J</i> =7,6Hz)	7,48 (1H, m)	127,8
11	7,41 (1H, m)	7,35-7,31 (1H, m)	129,2
12	7,41 (1H, m)	7,35-7,31 (1H, m)	129,8
13	7,41 (1H, m)	7,35-7,31 (1H, m)	129,2
14	7,64 (1H, d, <i>J</i> =7,6Hz)	7,48 (1H, m)	127,8
4-OMe	3,83 (3H, s)	3,76 (3H, s)	56,3

a) (Dharmaratne, *et al.*, 2002)

Asterricacid	
<b>Synonyme</b>	3',4-Dihydroxy-6-methoxy-5'-methyl-1,1'-oxydi-2,2'-benzoesäure-7-methylester
<b>Probencode</b>	PG40+20D-1-4
<b>Quelle</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>Menge</b>	10,0 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbliches Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	348 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	24,1 min

Asterricacid konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* über eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipreparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 217, 252 und 316 nm. Beobachtet werden konnten im

Massenchromatogramm die Basispeaks  $m/z$  348,7  $[M+H]^+$  sowie  $m/z$  694,8  $[2M-H]^-$ . Zusätzlich wurden die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  718,3  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  347,1  $[M-H]^-$  detektiert, welche eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 348 g/mol zuließen.

Die strukturelle Aufklärung der Asterricacid erfolgte mittels eines  $^1H$  NMR Experimentes, massenspektrometrischer Analysen und Literaturvergleich der gewonnenen Daten.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.41), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt neun Signale, welche aufgrund ihrer Integration als sechszehn Protonen zu identifizieren waren. Im Hochfeldbereich waren insgesamt drei Methylgruppen zu erkennen, welche bei  $\delta_H$  2,08 ppm,  $\delta_H$  3,61 ppm und  $\delta_H$  3,69 ppm resonierten und daher der aromatischen Methylgruppe 5'-Me, bzw. den aromatischen Methoxygruppen 6-OMe und 7-OMe zugeordnet wurden. Im Tieffeldbereich ließen sich drei Signale bei  $\delta_H$  5,75 ppm,  $\delta_H$  6,32 ppm und  $\delta_H$  6,77 ppm (zwei Signale überlappend) beobachten, welche den aromatischen Protonen H-6' und H-4', bzw. H-3 und H-5 zugeordnet wurden. Noch weiter tieffeldverschoben traten die Signale der Hydroxylgruppen 4-OH ( $\delta_H$  9,88 ppm), 3'-OH ( $\delta_H$  11,20 ppm) und 7'-OH ( $\delta_H$  12,98 ppm) auf.

Asterricacid wurde bisher aus *Penicillium glabrum* (Hammerschmidt, *et al.*, 2012), *Aspergillus* sp. (Lin, *et al.*, 2009, Park, *et al.*, 2002, Wu, *et al.*, 2008), *Dothideomycetes* sp. (Chomcheon, *et al.*, 2009), *Geomyces* sp. (Li, *et al.*, 2008), *Scytalidium* sp. (Stermitz, *et al.*, 1973), *Chrysosporium* sp. (Slater, *et al.*, 1971) und *Phoma* sp. (Fang, *et al.*, 2012) isoliert.

Tab. 3.41: NMR Daten von Asterricacid. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz		Lit. 500 MHz/125 MHz (Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1				134,6
2				125,6
3	6,77 (1H, s)		7,04 (1H, d, $J=2,8\text{Hz}$ )	109,3
4				156,9
5	6,77 (1H, s)		6,92 (1H, d, $J=2,8\text{Hz}$ )	105,6
6				154,8
7				165,6
6-OMe	3,61 (3H, s)		3,73 (3H, s)	52,7
7-OMe	3,69 (3H, s)		3,81 (3H, s)	56,7
4-OH	9,88 (1H, s)		9,06 (1H, s)	
1'				164,3
2'				100,5
3'				159,4
4'	6,32 (1H, s)		6,47 (1H, dq, $J=1,5, 0,6\text{Hz}$ )	106,0
5'				147,8
6'	5,75 (1H, s)		5,91 (1H, dq, $J=1,5, 0,6\text{Hz}$ )	112,6
7'				171,7
5'-Me	2,08 (3H, s)		2,16 (3H, t, $J=0,5\text{Hz}$ )	22,0
3'-OH	11,20 (1H, br s)		11,32 (1H, s)	
7'-OH	12,98(1H, br s)		11,96 (1H, s)	

a) (Park, *et al.*, 2002)

## Methylasterricacid

## Synonyme

2-Hydroxy-6-[3'-hydroxy-1'-(methoxycarbonyl)-5'-methoxyphenoxy]-4-methyl-benzoesäuremethylester

## Probencode

PG40H-2-2

## Quelle

*Penicillium glabrum*

## Menge

14,9 mg

## Physikalische Beschreibung

Gelbliches Pulver

## Summenformel

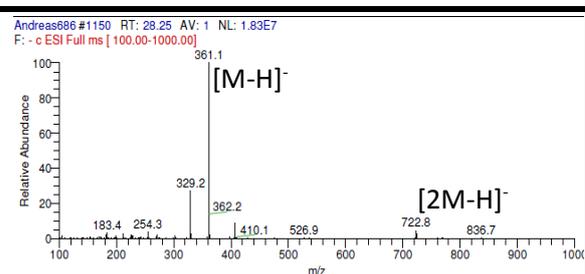
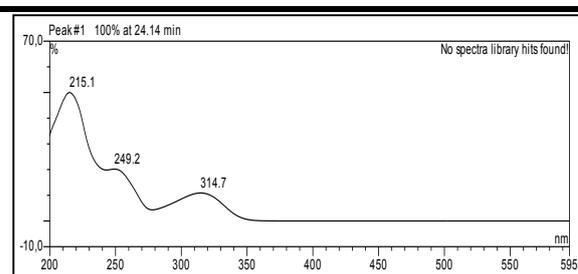
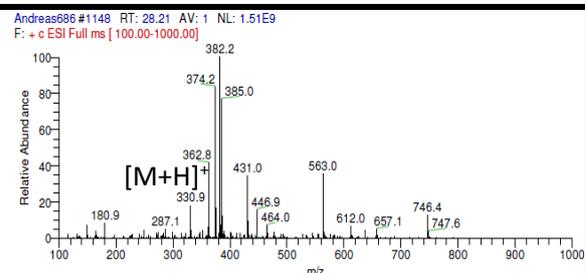
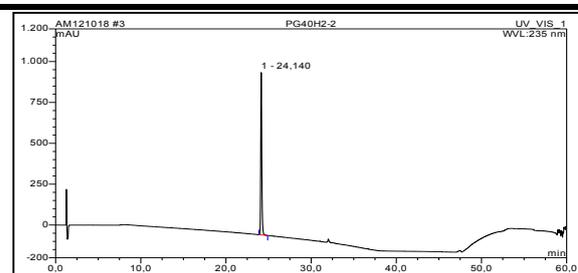
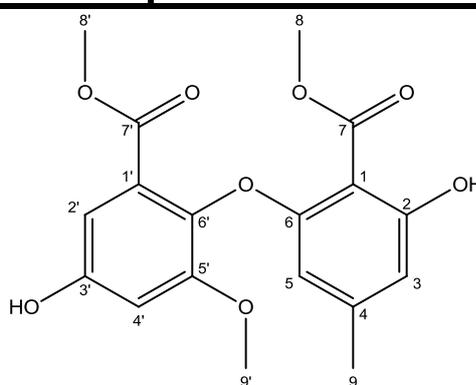
 $C_{18}H_{18}O_8$ 

## Molekulargewicht

362 g/mol

## HPLC-Retentionszeit

24,1 min



Methylasterricacid konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* über eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215, 249 und 315 nm. Im negativen ESI Modus ließ sich

## ***Ergebnisse***

---

der Basispeak bei  $m/z$  361,1  $[M-H]^-$  sowie das pseudomolekulare Ion  $m/z$  722,8  $[2M-H]^-$  erkennen, welches in Kombination mit  $m/z$  362,8  $[M+H]^+$  im positiven ESI-Modus auf ein Molekulargewicht von 362 g/mol schließen ließ.

Die strukturelle Aufklärung der Methylasterricacid erfolgte mittels eines  $^1H$  NMR Experimentes, massenspektrometrischer Analysen und Literaturvergleich.

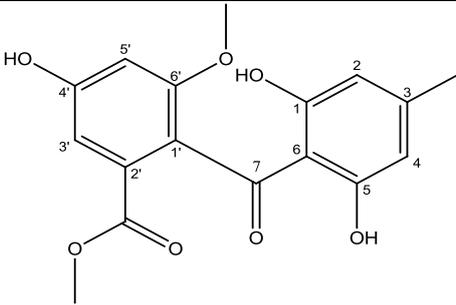
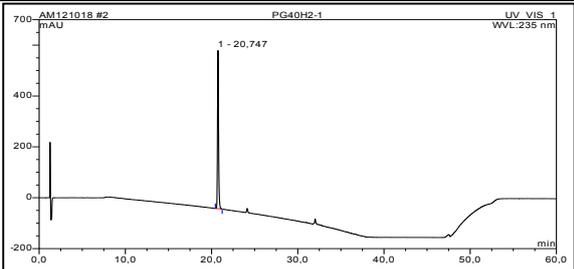
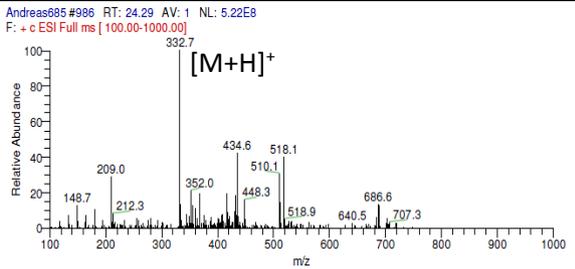
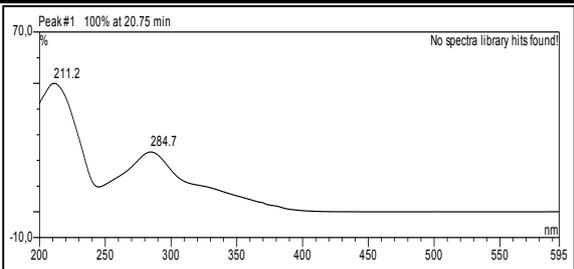
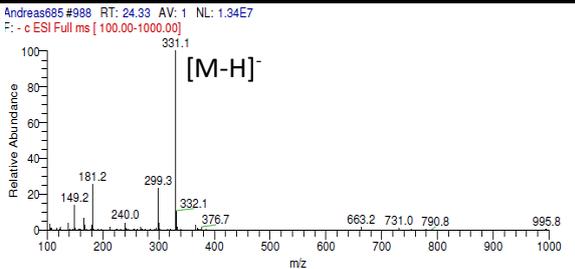
Das  $^1H$  NMR Spektrum (s. Tab. 3.42), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt vier Signale im aromatischen Bereich, wobei zwei von ihnen als breites Singulett bei  $\delta_H$  6,31 ppm und  $\delta_H$  5,63 ppm resonierten, die beiden anderen Signale als Dublett bei  $\delta_H$  6,75 ppm mit einer Kopplungskonstante von 3,4 Hz vorlagen. Die Singulettts konnten anhand des Literaturabgleiches H-3 und H-5 zugeordnet werden, die beiden übrigen Signale den *meta*-ständigen Protonen H-2' und H-4'. Neben den aromatischen Signalen ließen sich insgesamt vier Methylgruppen beobachten: eine aromatische Methylgruppe bei  $\delta_H$  2,06 ppm, sowie drei Methoxygruppen, die bei  $\delta_H$  3,76 ppm,  $\delta_H$  3,61 ppm und  $\delta_H$  3,69 ppm. Die Signale wurden daher entsprechend den Positionen H-9, bzw. H-8, H-8' und H-9' zugeordnet. Zudem konnten dem Spektrum die Signale der Hydroxylgruppen 2-OH und 3'-OH bei  $\delta_H$  10,07 ppm und  $\delta_H$  9,88 ppm entnommen werden. Die Zuordnung von 2-OH zum weiter tieffeldverschoben Signal konnte durch die Präsenz der Ketofunktion in  $\beta$ -Position und der damit verbundenen stärkeren Entschirmung begründet werden.

Bisher wurde Methylasterricacid aus *Phoma* sp. (Fang, *et al.*, 2012), *Dothideomycete* sp. (Chomcheon, *et al.*, 2009), *Aspergillus* sp. (Park, *et al.*, 2002) und *Geomyces* sp. (Li, *et al.*, 2008) isoliert.

**Tab. 3.42:** NMR Daten von Methylasterricacid. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 300 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
3	6,31 (1H, br s)	6,31 (br s)
5	5,63 (1H, br s)	5,63 (br s)
8	3,76 (3H, s)	3,76 (s)
9	2,06 (3H, s)	2,06 (s)
2'	6,75 (1H, d, $J=3,4\text{Hz}$ )	6,74 (d, $J=2,9\text{Hz}$ )
4'	6,75 (1H, d, $J=3,4\text{Hz}$ )	6,76 (d, $J=2,9\text{Hz}$ )
8'	3,61 (3H, s)	3,61 (s)
9'	3,69 (3H, s)	3,69 (s)
2-OH	10,07 (1H, s)	--
3'-OH	9,88 (1H, s)	--

a) (Lee, *et al.*, 2002)

Sulochrin	
<b>Synonyme</b>	7-(4'-Hydroxy-6'-methoxy-2'-benzoylsäure-methylester)-1,5-dihydroxy-3-methyl-benzoesäure
<b>Probencode</b>	PG40H-2-1
<b>Quelle</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>Menge</b>	48,8 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbliches Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	332 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	20,7 min
	
	
	

Sulochrin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* über eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipreparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 211 und 285 nm. Das Molekulargewicht konnte durch die Basispeaks  $m/z$  332,7  $[M+H]^+$  und  $m/z$  331,1  $[M-H]^-$  im ESI Massenspektrum auf 332 g/mol festgelegt werden.

Die Struktur des Secoanthrachinons Sulochrin wurde anhand von eindimensionalen NMR Spektren und Literaturabgleich der gewonnenen Daten aufgeklärt.

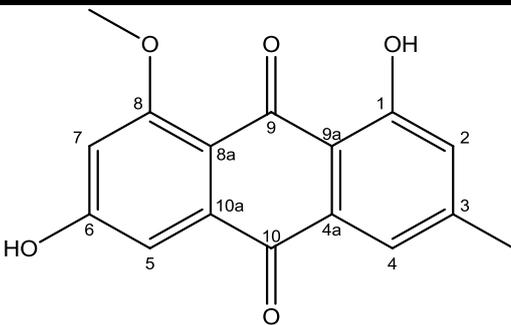
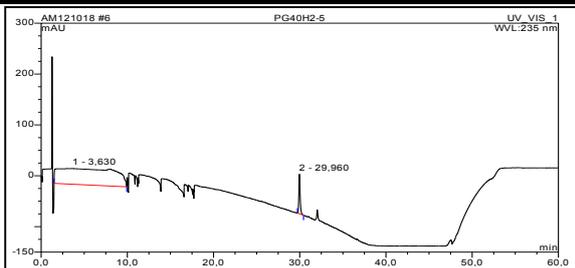
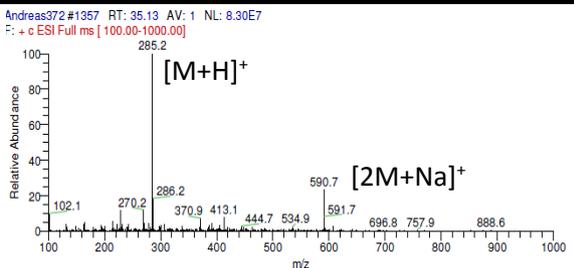
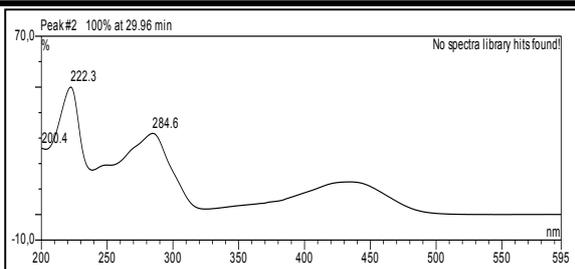
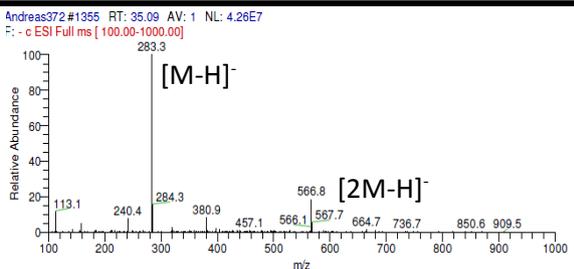
Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.43) zeigte die Anwesenheit von vier aromatischen Protonen, von denen zwei bei  $\delta_{\text{H}}$  6,08 ppm überlagerten vorlagen und den Protonen des symmetrisch substituierten Rings, an den Positionen H-2 und H4 zugeordnet wurden. Die beiden übrigen Signale resonierten bei  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ppm, und koppelten jeweils mit 1,4 Hz, was eine *meta*-Positionierung der Protonen anzeigte und daher als die Positionen H-3'/5' identifiziert wurden. Neben den aromatischen Signalen konnten drei Methylgruppen detektiert werden, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  2,15 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,63 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,64 ppm auftraten und aufgrund ihrer chemischen Verschiebung der aromatischen Methylgruppe 3-Me und den Methoxyfunktionen 6'-OMe und 2'-OMe zugeordnet werden konnten. Durch die Aufnahme des Spektrums in deuteriertem DMSO konnten außerdem die Hydroxylgruppen 1-OH, 5-OH und 4'-OH bei  $\delta_{\text{H}}$  11,44 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  11,44 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  9,98 ppm als Singuletts identifiziert werden.

Bisher wurde Sulochrin aus *Penicillium* sp. (Hammerschmidt, *et al.*, 2012, Smetanina, *et al.*, 2011), *Aspergillus* sp. (Bizukoje and Ledakowicz, 2009, Zhao, 2007) *Dothideomycete* sp. (Chomcheon, *et al.*, 2009) und *Aureobasidium* sp. (Shimada, *et al.*, 2003) isoliert.

**Tab. 3.43:** NMR Daten von Sulochrin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 80/100 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
2	6,08 (1H, s)	6,08 (1H, s)
4	6,08 (1H, s)	6,08 (1H, s)
3'	6,90 (1H, d, <i>J</i> =1,4Hz)	6,89 (1H, d, <i>J</i> =2Hz)
5'	6,68 (1H, d, <i>J</i> =1,4Hz)	6,65 (1H, d, <i>J</i> =2Hz)
1-OH	11,44 (1H, s)	--
5-OH	11,44 (1H, s)	--
3-Me	2,15 (3H, s)	2,15 (3H, s)
6'-OMe	3,63 (3H, s)	3,64 (3H, s)
2'-COOCH <sub>3</sub>	3,64 (3H, s)	3,64 (3H, s)
4'-OH	9,98 (1H, s)	--

a) (Inamori, *et al.*, 1983)

Questin	
<b>Synonyme</b>	1,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-methyl-anthrachinon; Methylemodin
<b>Probencode</b>	PG40H-2-5
<b>Quelle</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>Menge</b>	8,3 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	284 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	29,9 min
	
	
	

Questin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* durch eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipreparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei charakteristische Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 222, 285 und 436 nm, welche typisch für Anthrachinonderivate sind (Vgl. Altersolanol A). Das Molekulargewicht konnte durch die

Beobachtung der pseudomolekularen Massenpeaks von  $m/z$  285,2  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  590,7  $[2M+Na]^+$ ,  $m/z$  283,3  $[M-H]^-$ , sowie  $m/z$  566,8  $[2M-H]^-$  auf 284 g/mol festgelegt werden.

Die strukturelle Aufklärung des Questins erfolgte mit Hilfe von NMR- und massenspektrometrischer Experimente und deren Literaturabgleich.

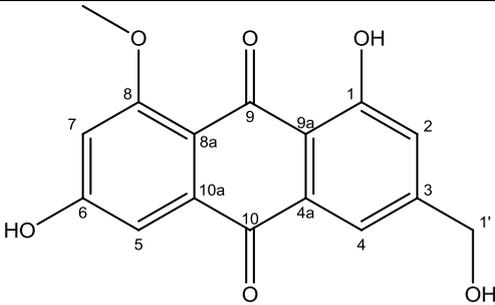
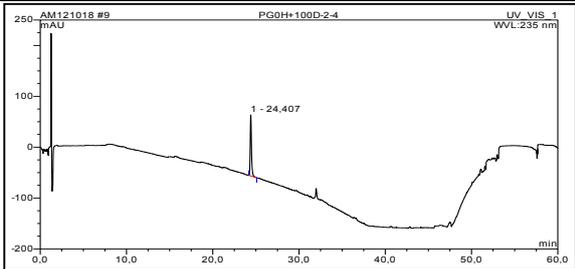
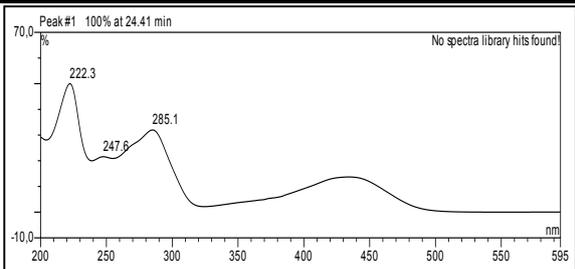
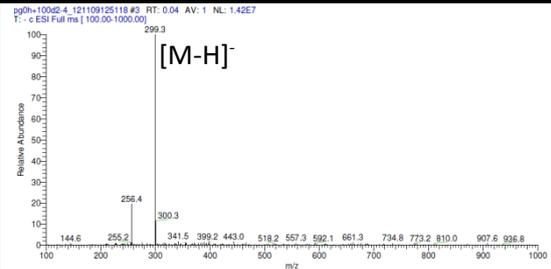
Die Untersuchung des  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums (s. Tab. 3.44) zeigte insgesamt sieben Signale, von denen zwei im Hochfeldbereich und fünf im Tieffeldbereich zu finden waren. Die beiden Signale im Hochfeld traten bei  $\delta_{\text{H}}$  2,39 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,90 ppm auf, zeigten eine Integration von je drei Protonen und wurden daher der aromatischen Methylgruppe 3-Me und der aromatischen Methoxygruppe 8-OMe zugeordnet. Im aromatischen Signalbereich konnten insgesamt vier Signale identifiziert werden, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  6,84 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,12 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7,20 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  7,42 ppm auftraten. Diese Signale wurden den Protonen H-7, H-4, H-5 und H-2 zugeschrieben. Die Protonen H-5 und H-7 zeigten die für eine *meta*-Ständigkeit typische Kopplungskonstante von 2,0 Hz. Noch weiter tieffeldverschoben bei  $\delta_{\text{H}}$  13,25 ppm konnte ein weiteres scharfes Singulett beobachtet werden, welches als 1-OH identifiziert wurde. Die Schärfe des Signals konnte durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur benachbarten Ketogruppe erklärt werden.

Questin wurde bisher aus *Aspergillus* sp. (Du, *et al.*, 2008, Inamori, *et al.*, 1983, Lin, *et al.*, 2009, Liu, *et al.*, 2006, Wang, *et al.*, 2007, Xue, *et al.*, 2012), *Eurotium robrum* (Li, *et al.*, 2009), *Dothideomycetes* sp. (Chomcheon, *et al.*, 2009) und *Chrysosporium* sp. (Slater, *et al.*, 1971) isoliert.

**Tab. 3.44:** NMR Daten von Questin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. ? MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- $d_6$ )
2	7,42 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )	7,37 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
4	7,12 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )	7,03 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
5	7,20 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )	7,14 (1H, d, $J=3,0\text{Hz}$ )
7	6,84 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )	6,76 (1H, d, $J=3,0\text{Hz}$ )
3-Me	2,39 (3H, s)	2,33 (3H, s)
8-OMe	3,90 (3H, s)	3,86 (3H, s)
1-OH	13,25 (1H, s)	
6-OH	n.d.	

a) (Inamori, *et al.*, 1983)

Questinol	
<b>Synonyme</b>	1,6-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-8-methoxy-anthrachinon; $\omega$ -Hydroxymethylemodin
<b>Probencode</b>	PG0H+100D-2-4
<b>Quelle</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>Menge</b>	10,3 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelbes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	300 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	24,4 min
	
	Keine Ionisierung
	

Questinol konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Penicillium glabrum* durch eine Aufreinigung mittels VLC, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei charakteristische Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 222, 285 und 436 nm, welche typisch für Anthrachinonderivate sind (Vgl. Questin, Altersolanol A). Das Molekulargewicht konnte durch

die Beobachtung des Basispeaks  $m/z$  299,3  $[M-H]^-$  auf 300 g/mol festgelegt werden. Eine Ionisierung im positiven ESI Modus konnte nicht beobachtet werden.

Die Struktur des Questinols wurde anhand von ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten, sowie Massenchromatogrammen und Literaturvergleichen aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.45) zeigte insgesamt vier aromatische Protonen, eine aromatische Methoxygruppe bei  $\delta_H$  3,90 ppm, eine aliphatische  $CH_2$ -Gruppe bei  $\delta_H$  4,58 ppm, sowie drei Hydroxylgruppen. Die aromatischen Signale traten bei  $\delta_H$  6,84 ppm,  $\delta_H$  7,20 ppm und  $\delta_H$  7,57 ppm auf, wobei  $\delta_H$  7,20 ppm eine Integration von zwei Protonen aufwies. Die Protonen koppelten mit 2,2 Hz zueinander, welches die *meta*-Positionierung zueinander indizierte. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Signale H-5, H-2, H-7 und H-4 zugeordnet. Die drei Signale der Hydroxylgruppen konnten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung den beiden aromatischen Hydroxylgruppen 1-OH ( $\delta_H$  13,27 ppm) und 6-OH ( $\delta_H$  11,22 ppm), sowie dem aliphatischen 1'-OH ( $\delta_H$  5,51 ppm) zugeschrieben werden. Die Positionierung von 1'-OH neben der  $CH_2$ -1' konnte durch die Aufspaltung der  $CH_2$ -Gruppe zum Dublett und der Hydroxylgruppe zum Triplet, welche mit 5,7 Hz koppelten, bewiesen werden. Die Substrukturen konnten anhand von HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.19a & b) zusammengefügt werden. Der Anthrachinongrundkörper konnte durch die  $^3J$  Korrelationen von H-2 zu C-4 und C-9a, H-4 zu C-2, C-9a und C-10, H-5 zu C-7 und C-8a und H-7 zu C-5 und C-8a in seiner Konstitution bestätigt werden. Zusätzlich konnten die  $^2J$  Korrelationen von H-7 zu C-6 und C-8, H-5 zu C-6 und 8-OMe zu C-8 beobachtet werden, welches die Positionierung von 6-OH zwischen den beiden Protonen H-5 und H-7 eindeutig festlegte. Ebenfalls konnte die  $^2J$  Korrelation von H-2 zu C-1 beobachtet werden, sowie jene von 1-OH zu C-1, C-2 und C-9a. Diese Beobachtung und die Ausbildung eines scharfen Singulets von 6-OH ermöglichte die Positionierung der Hydroxylgruppe an C-1 in  $\beta$ -Position zur Ketogruppe C-9. H-2, H-4 und H-7 zeigten zudem  $\omega$  Korrelationen zu C-9, welche die Verknüpfung der beiden aromatischen Systeme über eine Chinonstruktur bestätigte. Die aliphatische Seitenkette konnte durch die  $^3J$  Korrelationen von H-2 und H-4 zu C-1', 1'-OH zu C-3 sowie den  $^2J$  Korrelationen H-1' zu C-3 und 1'-OH zu C-1' an C-3 verknüpft werden.

Bisher wurde Questinol aus *Penicillium glabrum* (Hammerschmidt, *et al.*, 2012), *Aspergillus* sp. (Arai, *et al.*, 1989, Wang, *et al.*, 2007), *Chrysosporium* sp. (Slater, *et al.*, 1971) und *Polygonum cuspidatum* (Kimura, *et al.*, 1983) isoliert.

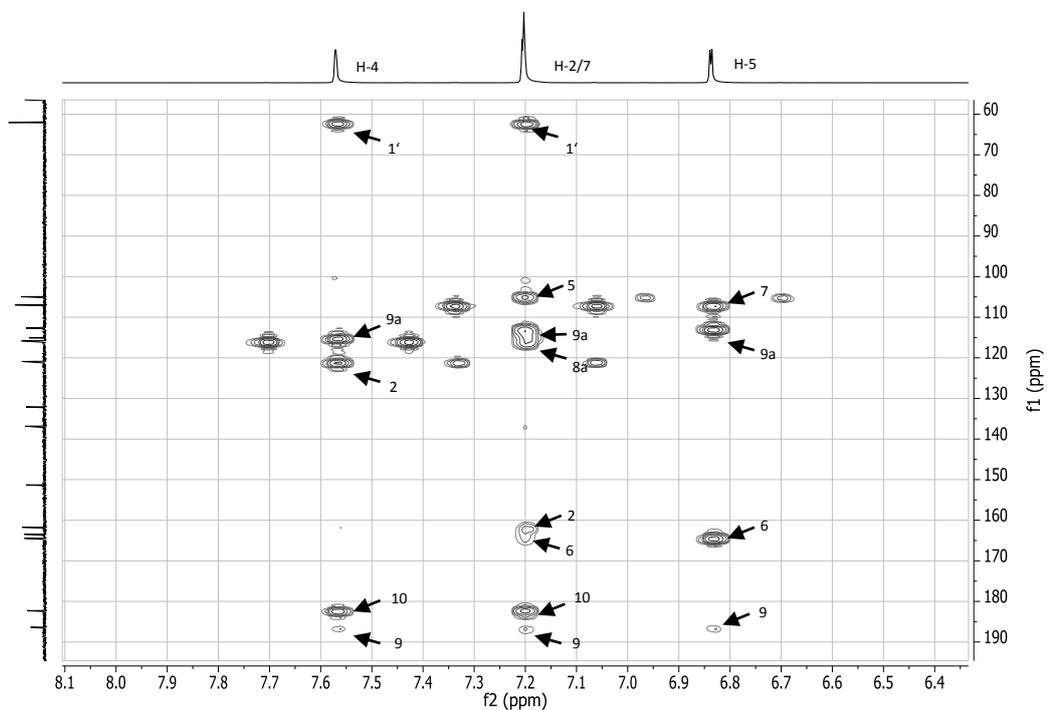
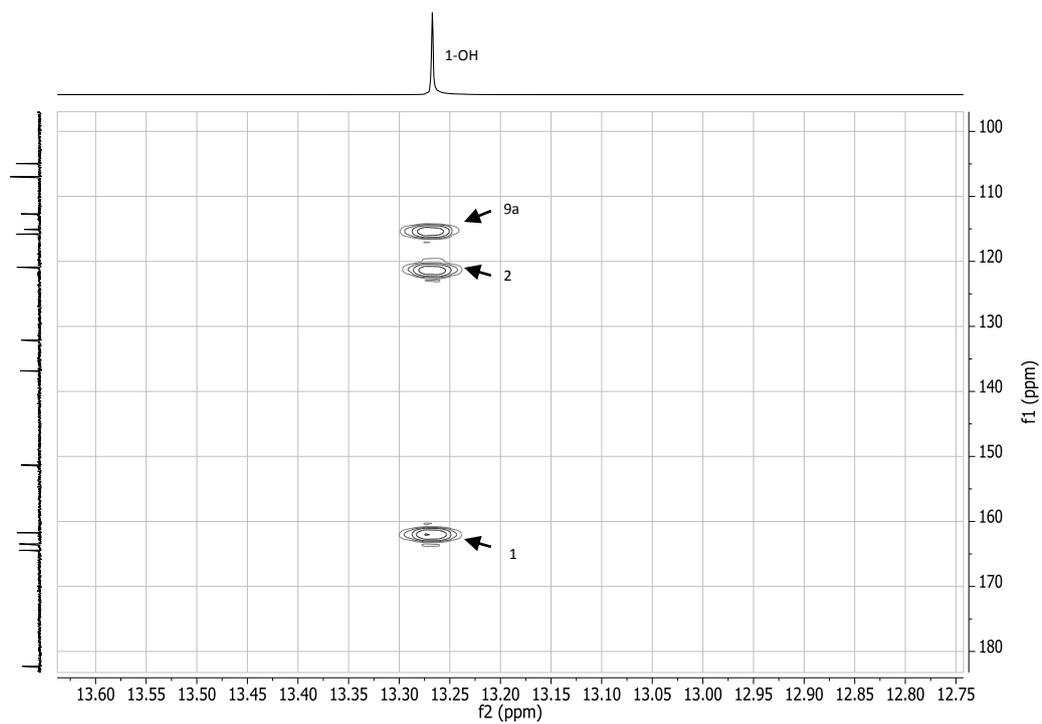
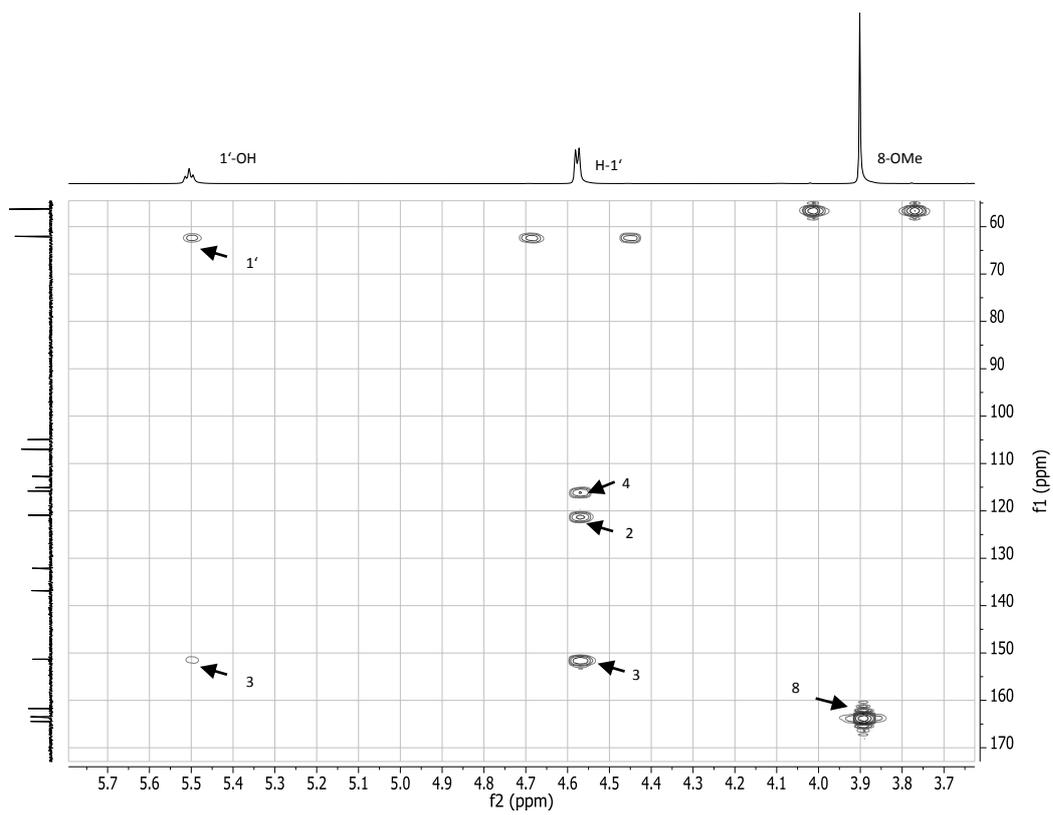


Abb.3.19a: HMBC Spektrum von Questinol in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.



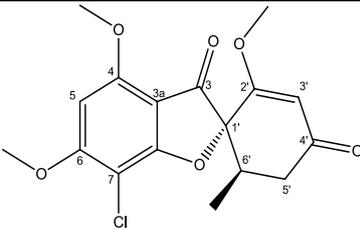
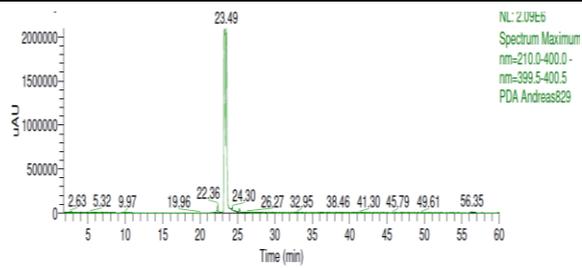
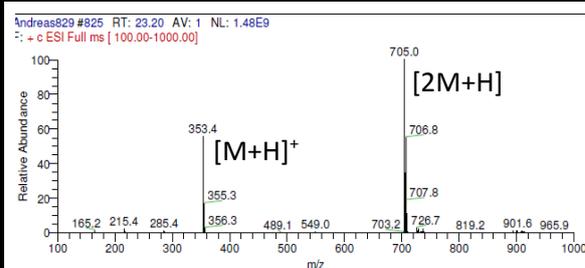
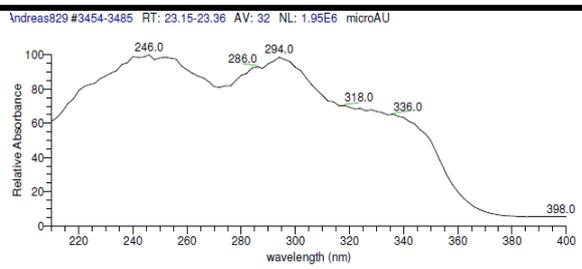
**Abb.3.19b:** HMBC Spektrum von Questinol in DMSO-*d*<sub>6</sub> bei 600 MHz.

Tab. 3.45: NMR Daten von Questinol. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	600 MHz DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>			Lit. 500 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
1		161,7		
2	7,20 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	120,9	1, 4, 9, 9a, 1'	7,24 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)
3		151,3		
4	7,57 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	115,8	2, 9, 9a, 10, 1'	7,61 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)
4a		132,1		
5	6,84 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	105,0	6, 7, 8a, 9	6,85 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)
6		164,4		
7	7,20 (1H, d, <i>J</i> =2,2Hz)	107,0	5, 8, 8a, 9	7,24 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)
8		163,5		
8a		112,7		
9		186,4		
9a		115,1		
10		182,3		
10a		136,8		
8-OMe	3,90 (3H, s)	56,3	8	3,91 (3H, s)
1-OH	13,27 (1H, s)		1, 2, 9a	13,37 (1H, s)
6-OH	11,22 (1H, s)			
1'	4,58 (1H, d, <i>J</i> =5,7Hz)		2, 3, 4	4,60 (2H, s)
1'-OH	5,51 (1H, t, <i>J</i> =5,7Hz)		3, 1'	

a) (Kimura, *et al.*, 1983)

3.1.4 Isolierte Verbindungen aus *Nigrospora sphaerica*

Griseofulvin	
<b>Synonyme</b>	7-Chloro-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-(1'S-trans)-spiro[benzofuran-2(3H)1'-[2]cyclohexen]-3,4'-dion; 7-chloro-2',4,6-trimethoxy-6' $\beta$ -methyl-spiro[benzofuran-2(3H) 1'-[2]cyclohexen]-3,4'-dion; (+)-Griseofulvin; Amudane; Curling factor; Fulcin; Fulvicin; Fulvicin Bolus; Fulvidex; Fulvina; Fulvinil; Fulvistatin; Gricin; Grifulin; Grifulvin; Spirofulvin; Sporostatin; Xuanjing
<b>Probencode</b>	BSL-C-2-7
<b>Quelle</b>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>Menge</b>	8,9 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	352 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	23,5 min
<b>Drehwert</b>	+200° (c = 0,29; CHCl <sub>3</sub> )
	
	
	Keine Ionisierung

Griseofulvin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Nigrospora sphaerica* durch eine Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie gefolgt von einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei charakteristische UV

## ***Ergebnisse***

---

Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 245, 294 und 336 nm. Beobachtet werden konnte im ESI Massenchromatogramm der Basispeak  $m/z$  705,0  $[2M+H]^+$ , sowie die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  353,4  $[M+H]^+$  und  $m/z$  355,3  $[M+H]^+$ , wobei die beiden zuletzt genannten in einem Verhältnis von 1:3 zu den zuvor aufgeführten detektiert wurden. Dieses typische Isotopencluster wies auf das Vorhandensein eines Chloratoms hin. Das Molekulargewicht konnte somit auf 352 g/mol festgelegt werden.

Die Strukturaufklärung des Griseofulvins erfolgte mittels Drehwertbestimmung,  $^1\text{H}$  NMR Experimenten, sowie Literaturabgleich der gewonnenen Daten.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.46), aufgenommen in deuteriertem Chloroform, zeigte insgesamt siebzehn Protonen. Vier Signale konnten aufgrund ihrer Integration von drei Protonen der Methyl- und den drei Methoxygruppen zugeordnet werden. Ihre Signale traten bei  $\delta_{\text{H}}$  0,94 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,60 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,96 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  4,01 ppm auf und wurden den Positionen 6'-Me, 2'-OMe, 2-OMe und 4-OMe zugeordnet. 6'-Me koppelte mit 6,7 Hz als Dublett mit dem benachbarten H-6', welches wiederum komplex zum Dublett vom Triplet vom Dublett, aufgespalten vorlag. Die Kopplung erfolgte mit der benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppe  $\text{CH}_2$ -5', wobei die axiale Kopplung mit 13,4 Hz und die axiale-äquatoriale Kopplung mit 4,7 Hz zu beobachten war. Des Weiteren waren zwei Singulets zuerkennen, welche bei  $\delta_{\text{H}}$  6,11 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  5,55 ppm resonierten und den Protonen H-5 und H-3' zugeordnet wurden.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+200^\circ$  ( $c = 0,2$ ;  $\text{CHCl}_3$ ), der Literaturwert beträgt  $+355,4^\circ$  ( $c = 0,05$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) (Diesel, 2009).

Bisher wurde Griseofulvin aus den Pilzen *Penicillium* sp. (Saykhedkar and Singhal, 2004, Xue, *et al.*, 2006, Zain, 2009, Zhan, *et al.*, 2013), *Xylaria* sp. (Rukachaisirikul, *et al.*, 2013), *Aspergillus* sp. (Zain, 2009), *Nigrospora* sp. (Shang, *et al.*, 2012, Xia, *et al.*, 2011, Zhao, *et al.*, 2012) und *Massrisson* sp. (Sun, *et al.*, 2011) isoliert.

Tab. 3.46: NMR Daten von Griseofulvin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 500 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (CDCl <sub>3</sub> )	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
5	6,11 (1H, s)	6,51 (1H, s)
3'	5,55 (1H, s)	5,61 (1H, s)
5'	3,01 (1H, dd, $J=16,7, 13,4\text{Hz}$ )	2,68 (1H, dd, $J=16,6, 8,3, 4,7\text{Hz}$ )
	2,42 (1H, dd, $J=16,7, 4,7\text{Hz}$ )	2,35 (1H, dd, $J=16,6, 13,0, 4,7\text{Hz}$ )
6'	2,82 (1H, dtd, $J=13,4, 6,7, 4,7\text{Hz}$ )	2,80 (1H, m)
6'-Me	0,94 (3H, d, $J=6,7\text{Hz}$ )	0,85 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$ )
4-OMe	3,96 (3H, s)	3,95 (3H, s)
6-OMe	4,01 (3H, s)	4,05 (3H, s)
2'-OMe	3,60 (3H, s)	3,63 (3H, s)

a) (Diesel, 2009)

Dechlorogriseofulvin	
<b>Synonyme</b>	2',4,6-Trimethoxy-6'-methyl-spiro[benzofuran-2(3 <i>H</i> ),1'-[2]cyclohexen]-3,4'-dion; 2',4,6-Ttrimethoxy-6'-methyl-(1' <i>S</i> -trans)- spiro[benzofuran-2(3 <i>H</i> ),1'-[2]cyclohexen]-3,4'- dion; 7-Dechlorogriseofulvin
<b>Probencode</b>	BSL-C-2-5
<b>Quelle</b>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>Menge</b>	2,9 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	318 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	22,5 min
<b>Drehwert</b>	+886° (c = 0,89; CHCl <sub>3</sub> )

Dechlorogriseofulvin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Nigrospora sphaerica* durch eine Aufreinigung mittels einer Größenausschlusschromatographie und einer semipreparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigt drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 220, 252 und 298 nm. Beobachtet werden konnte im ESI Massenchromatogramm der

Basispeak  $m/z$  319,8  $[M+H]^+$  sowie die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  636,9  $[2M+H]^+$  und  $m/z$  317,1  $[M-H]^-$ , welche eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 318 g/mol ermöglichten. Die Differenz von 34 amu und das Fehlen des Chlorclusters, trotz sehr ähnlichen UV-Spektrums, deuteten bereits an, dass es sich um ein nicht chloriertes Griseofulvinderivat handelte.

Die Struktur wurde mittels  $^1H$  NMR- und massenspektrometrischer Daten und Literaturvergleich bestätigt.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.47), aufgenommen in deuteriertem Chloroform, zeigte wie auch beim Griseofulvin die Präsenz von insgesamt vier Methyl- bzw. Methoxygruppen, welche bei  $\delta_H$  0,95 ppm,  $\delta_H$  3,62 ppm sowie zwei Signale überlagert bei  $\delta_H$  3,88 ppm resonierten. Die aliphatische Methylgruppe zeigte ein identisches Aufspaltungsmuster im Vergleich zum Griseofulvin: 6'-Me koppelte mit 6,7 Hz als Dublett mit dem benachbarten H-6', welches wiederum komplex zum Dublett vom Triplett vom Dublett aufgespalten, vorlag. Die Kopplung erfolgte mit der benachbarten  $CH_2$ -Gruppe  $CH_2$ -5', wobei die axiale Kopplung mit 13,4 Hz und die axial-äquatoriale Kopplung mit 4,7 Hz zu beobachten war. Ebenfalls mit einer ähnlichen chemischen Verschiebung ließen sich die beiden Protonen H-5 und H-3' bei  $\delta_H$  6,21 ppm und  $\delta_H$  5,59 ppm beobachten. Im Unterschied zum Griseofulvin ließ sich ein zusätzliches Singulett bei  $\delta_H$  6,03 ppm beobachten, welches H-7 zugeschrieben wurde. Dies in Kombination mit einer Massendifferenz von 34 amu zum Griseofulvin identifizierte die untersuchte Substanz einwandfrei als Dechlorgriseofulvin.

Die Stereochemie wurde anhand des literaturbekannten Drehwertes bestätigt. Der gemessene Wert betrug  $+886^\circ$  ( $c = 0,2$ ;  $CHCl_3$ ), der Literaturwert beträgt  $+373,3^\circ$  ( $c = 0,05$ ;  $CHCl_3$ ) (Diesel, 2009).

Bisher wurde Dechlorgriseofulvin aus *Penicillium* sp. (Nicoletti, *et al.*, 2007, Wang, *et al.*, 2004a, Wubshet, *et al.*, 2013), *Xylaria* sp. (Park, *et al.*, 2005, Rukachaisirikul, *et al.*, 2013), *Nigrospora* sp. (Xia, *et al.*, 2011, Zhao, *et al.*, 2012) und *Aspergillus versicolor* (Kingston, *et al.*, 1976) isoliert.

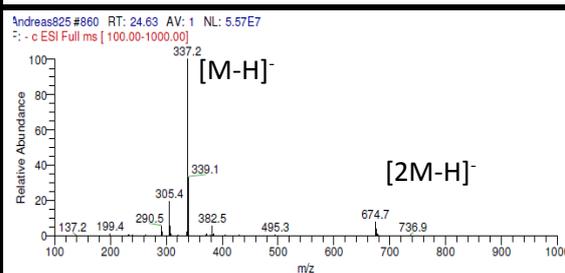
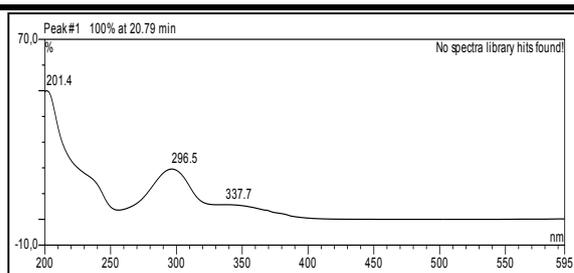
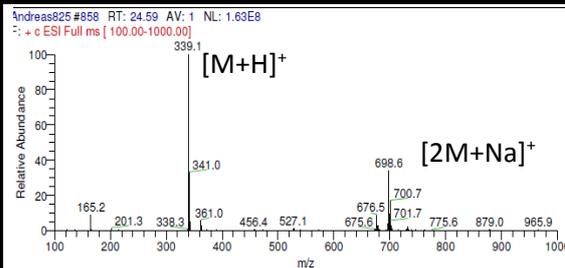
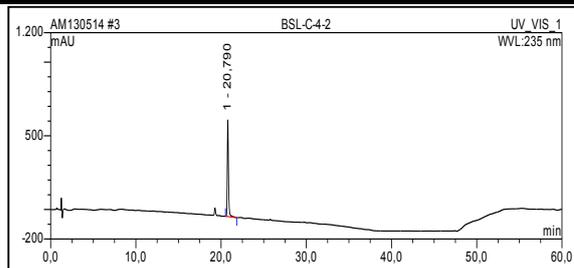
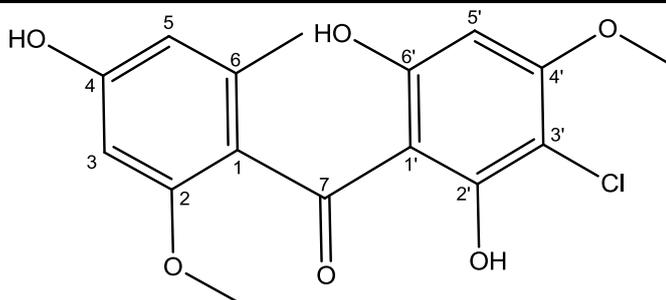
Tab. 3.47: NMR Daten von Dechlorogriseofulvin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 500 MHz <sup>a)</sup>
	$\delta_{\text{H}}$ (CDCl <sub>3</sub> )	$\delta_{\text{H}}$ (CDCl <sub>3</sub> )
5	6,21 (1H, d, $J=1,8\text{Hz}$ )	6,15 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
7	6,03 (1H, d, $J=1,8\text{Hz}$ )	5,97 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$ )
3'	5,59 (1H, s)	5,47 (1H, s)
5'	3,07 (1H, dd, $J=16,7, 13,4\text{Hz}$ )	2,99 (1H, dd, $J=17,0, 13,0\text{Hz}$ )
	2,42 (1H, dd, $J=16,7, 4,7\text{Hz}$ )	2,33 (1H, dd, $J=17,0, 5,0\text{Hz}$ )
6'	2,75 (1H, dtd, $J=13,4, 6,7, 4,7\text{Hz}$ )	2,68 (1H, m)
6'-Me	0,95 (3H, d, $J=6,7\text{Hz}$ )	0,89 (3H, d, $J=6,5\text{Hz}$ )
4-OMe	3,88 (3H, s)	3,82 (3H, s)
6-OMe	3,88 (3H, s)	3,83 (3H, s)
2'-OMe	3,62 (3H, s)	3,55 (3H, s)

a) (Cafêu, *et al.*, 2005)

## Griseophenon B

<b>Synonyme</b>	3'-Chloro-2',4,6'-trihydroxy-2,4'-dimethoxy-6-methylbenzophenon
<b>Probencode</b>	BSL-C-5-2
<b>Quelle</b>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>Menge</b>	1,9 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	338 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	20,8 min



Griseophenon B konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Nigrospora sphaerica* durch eine Aufreinigung mittels einer Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  201, 297 und 338 nm. Beobachtet werden konnten im ESI Massenchromatogramm die Basispeaks  $m/z$  339,1  $[M+H]^+$  sowie  $m/z$  337,2  $[M-H]^-$ . Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  698,6  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  674,7  $[2M-H]^-$  beobachtet werden. Zudem ließ sich wie auch beim

Griseofulvin ein typisches Chlorisotopencluster in Form der Signale  $m/z$  341,0  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  700,7  $[2M+Na]^+$  im positiven ESI Modus und  $m/z$  339,1  $[M-H]^-$  im negativen ESI Modus erkennen. Hierdurch ließ sich das Molekulargewicht auf 338 g/mol festlegen.

Die Struktur des Griseophenon B wurde anhand von ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten, massenspektrometrischen Versuchen und Literaturvergleich der gewonnenen Daten aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.48), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt fünfzehn Protonen, welche durch ihre chemische Verschiebung drei Hydroxylgruppen, drei aromatischen Protonen, einer aromatischen Methylgruppe und zwei aromatischen Methoxygruppen zugeordnet werden konnten. Zwei der Hydroxylgruppen resonierten bei  $\delta_H$  9,50 ppm und  $\delta_H$  10,90 ppm und wurden daher den phenolischen Hydroxylgruppen 4-OH und 6'-OH zugeschrieben. Das verbleibende weiter tieffeldverschobene Signal zeichnete sich als scharfes Singulett bei  $\delta_H$  13,73 ppm aus und wurde daher als 2'-OH identifiziert, welches sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer Ketogruppe befand. Zwei der aromatischen Protonen bei  $\delta_H$  6,20 ppm und  $\delta_H$  6,24 ppm koppelten mit 2,0 Hz, was auf eine *meta*-Positionierung zueinander hindeutete, wohingegen  $\delta_H$  6,03 ppm als scharfes Singulett einen monosubstituierten Aromaten anzeigte. Die Methylgruppe 6-Me resonierte bei  $\delta_H$  1,99 ppm, das auf die Positionierung an einem Aromaten hindeutete. Schließlich konnten die Methoxygruppen bei  $\delta_H$  3,58 ppm und  $\delta_H$  3,84 ppm identifiziert werden und wurden den Positionen 2-OMe und 4'-OMe zugeordnet. Die so identifizierten Substrukturen wurden durch die Untersuchung des HMBC Spektrums (s. Abb. 3.20a & b) zusammengefügt. Die  $^3J$  Korrelationen von H-3 zu C-1 und C-5, H-5 zu C-1 und C-3 und H-5' zu C-1' und C-3' bestätigten die Grundstrukturen der aromatischen Ringsysteme. Die Positionierung von 4-OH erfolgte durch die Korrelationen zu C-3, C-4 und C-5, sowie die  $^2J$  Korrelationen von H-3 zu C-4. 6-Me konnte durch die Korrelationen zu C-1, C-5 und C-6 und  $^2J$  Korrelation von H-5 zu C-6 positioniert werden. Ebenso wurden 6'-OH durch ihre Korrelationen zu C-1', C-5' und C-6', wie auch 4'-OMe durch ihre Korrelationen zu C-4' im Zusammenspiel mit der  $^2J$  Korrelation von H-5' zu C-4' eingeordnet. Die Verknüpfung der beiden Ringsysteme über die Ketogruppe konnte durch die Tatsache, dass C-1 wie auch C-1' quarternäre Kohlenstoffe waren und durch das Fehlen von 28 amu zum Molekulargewicht erklärt werden.

Bisher wurde Griseophenon B nur aus *Penicillium* sp. (Cacho, *et al.*, 2013, Harris, *et al.*, 1976, Sato, *et al.*, 1978, 刘涛, *et al.*, 2012) isoliert.

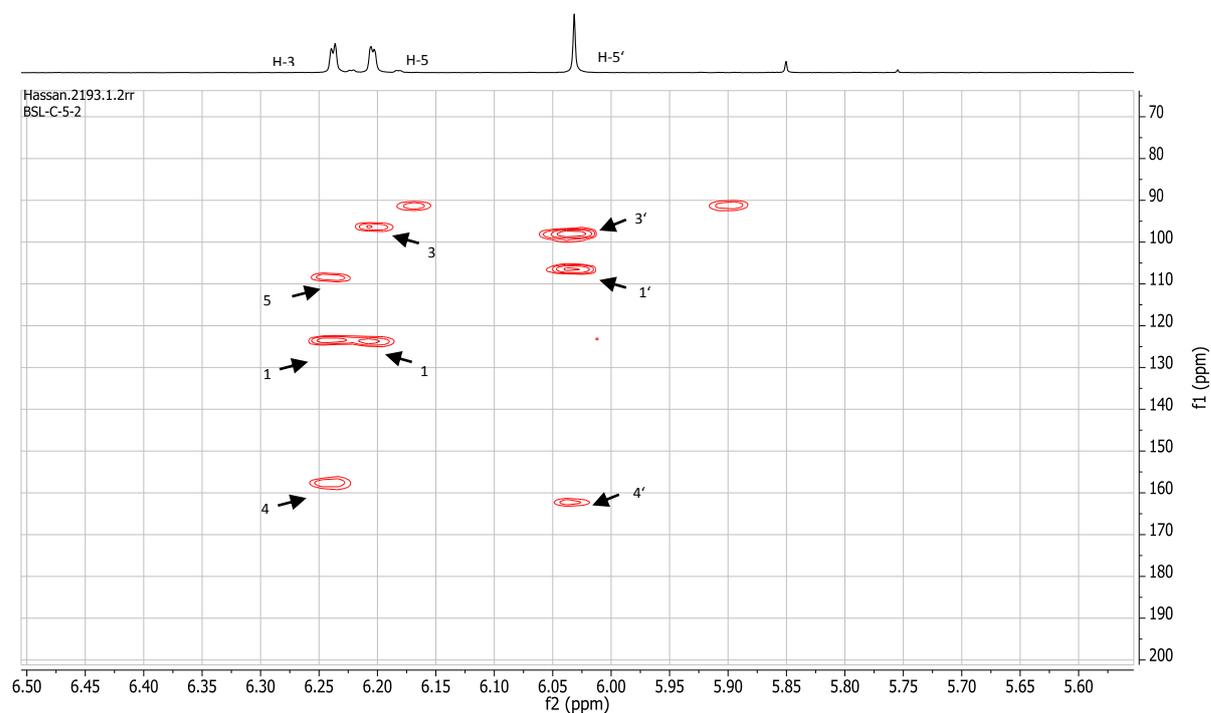
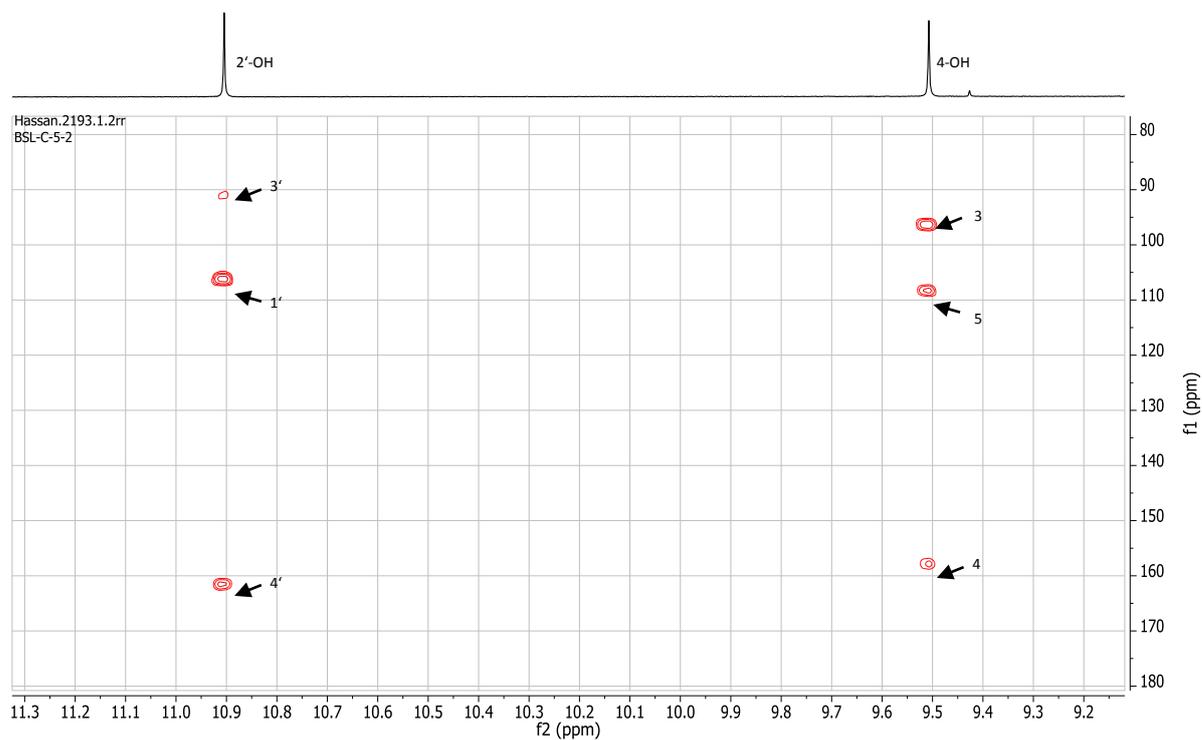
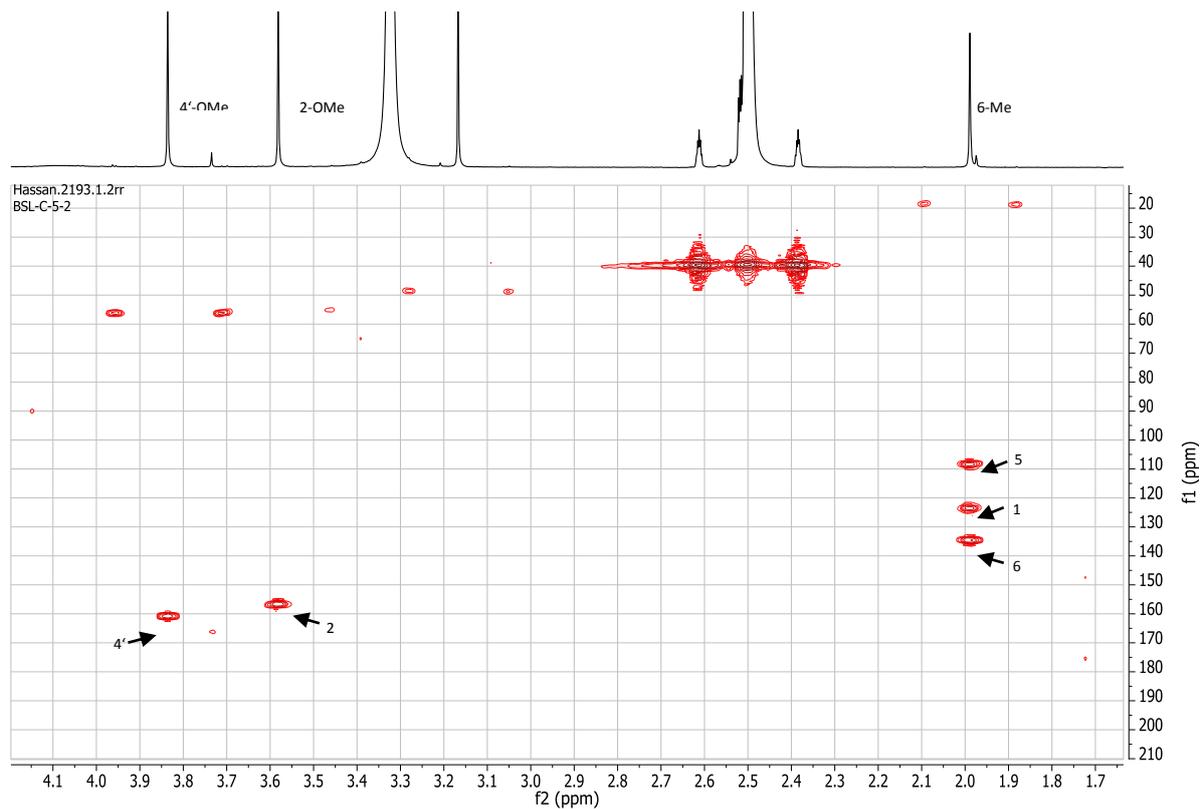


Abb.3.20a: HMBC Spektrum von Griseophenon B in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.



**Abb.3.20b:** HMBC Spektrum von Griseophenon B in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

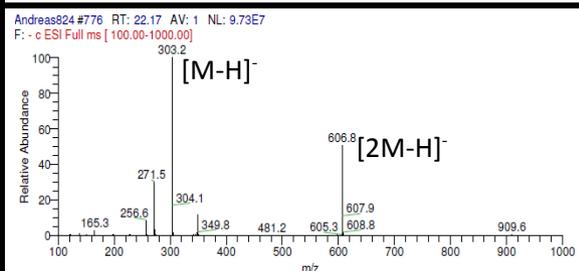
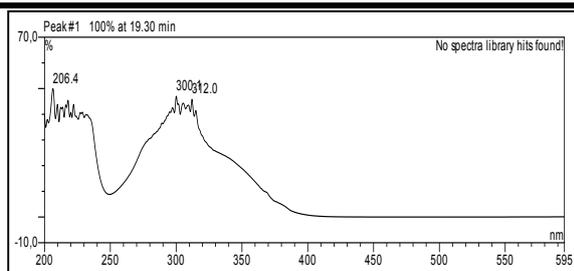
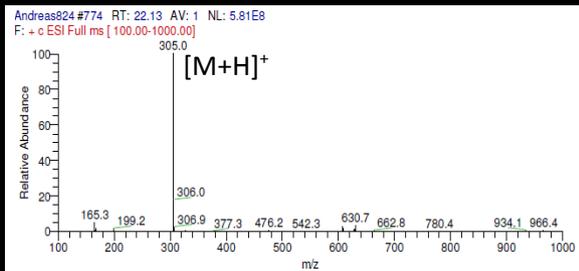
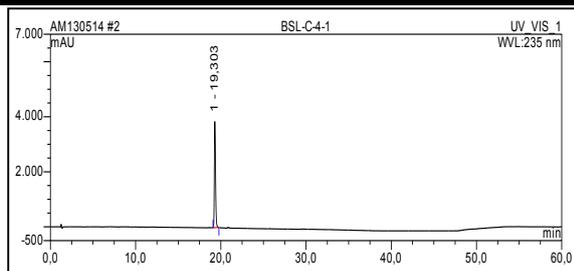
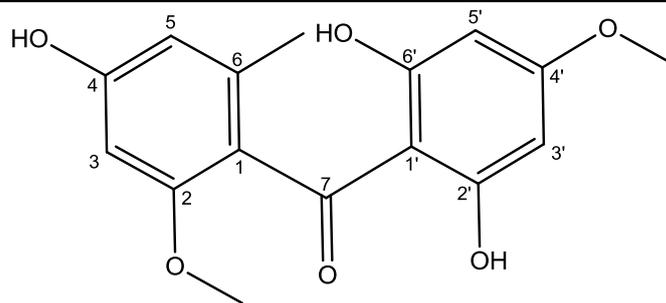
Tab. 3.48: NMR Daten von Griesophenon B. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 300 MHz/75 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) <sup>a)</sup>		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1		123,8			121,6	
2		156,7			157,9	
3	6,24 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	96,4	1, 4, 5	6,36 (1H, br s)	97,6	1, 2, 4, 5
4		157,8			159,5	
5	6,20 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	108,3	1, 3, 4	6,36 (1H, br s)	110,1	1, 3, 4, 6-Me
6		134,5			137,7	
7		199,2			198,3	
1'		106,2			106,4	
2'		160,8			n.d.	
3'		98,0			100,9	
4'		162,4			162,1	
5'	6,03 (1H, s)	91,2	1', 3', 4'	6,14 (1H, br s)	93,1	1', 3', 4', 6'
6'		161,7			163,8	
2-OMe	3,58 (3H, s)	55,1	2	3,71 (3H, s)	56,1	2
6-Me	1,99 (3H, s)	18,6	1, 5, 6	2,16 (3H, s)	19,1	1, 5, 6
4'-OMe	3,84 (3H, s)	56,0	4'	3,93 (3H, s)	56,6	4'
4-OH	9,50 (1H, s)		3, 4, 5			
6'-OH	10,90 (1H, s)		1', 5', 6'			
2'-OH	13,73 (1H, s)					

a) (刘涛, *et al.*, 2012)

## Griseophenon C

<b>Synonyme</b>	4,2',6'-Trihydroxy-2,4'-dimethoxy-6-methyl-benzophenon
<b>Probencode</b>	BSL-C-5-1
<b>Quelle</b>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
<b>Menge</b>	1,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Weißes Pulver
<b>Summenformel</b>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	304 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	19,3 min



Griseophenon C konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Nigrospora sphaerica* durch eine Aufreinigung mittels einer Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte zwei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  206 nm und 300 nm. Beobachtet werden konnten im ESI Massenchromatogramm die Basispeaks  $m/z$  305,0  $[M+H]^+$  und  $m/z$  303,2  $[M-H]^-$ . Zusätzlich konnte ein pseudomolekularer Peak bei  $m/z$  606,8  $[2M-H]^-$  festgestellt werden, welches eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 304

g/mol zuließ. Im Vergleich zum Griseophenon B zeigte das Griseophenon C kein Chlorisotopencluster und ein um 34 amu verringertes Molekulargewicht, welches, in Kombination mit der hohen Ähnlichkeit der UV Spektren vermuten ließ, dass es sich um ein nicht chloriertes Griseophenon B Derivat handelte.

Die Struktur des Griseophenon C wurde anhand von massenspektrometrischen, wie auch ein- und zweidimensionalen NMR Experimenten und Literaturvergleich aufgeklärt.

Die Untersuchung des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.49), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt sechzehn Protonen, welche durch ihre chemische Verschiebung drei Hydroxylgruppen, vier aromatischen Protonen, einer Methylgruppe und zwei Methoxygruppen zugeordnet werden konnten. Insgesamt ähnelte das Spektrum dem des Griseophenon B. Zwei der Hydroxylgruppen resonierten bei  $\delta_{\text{H}}$  11,94 ppm und wurden daher den symmetrischen phenolischen Hydroxylgruppen 2'-OH und 6'-OH zugeschrieben. Das verbleibende weiter hochfeldverschobene Signal zeichnete sich als Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  9,42 ppm ab und wurde daher als 4-OH identifiziert. Die vier aromatischen Protonen resonierten bei  $\delta_{\text{H}}$  6,22 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6,18 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  5,85 ppm, wobei das Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  5,85 ppm eine Integration von zwei Protonen aufwies. Die Signale wurden den Protonen H-3, H-5 und H-3'/H-5' zugeordnet. Die beiden Protonen H-3 und H-5 koppelten mit 2,0 Hz zueinander, wodurch sie in *meta*-Position zueinander angeordnet werden konnten. Die Überlagerung der Signale bei  $\delta_{\text{H}}$  5,85 ppm deutete auf eine chemische Äquivalenz hin, welche durch ein symmetrisch substituiertes System zu erklären war. Die Methylgruppe 6-Me resonierte bei  $\delta_{\text{H}}$  1,98 ppm, was auf die Positionierung an einem Aromaten hindeutete. Schließlich konnten die Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  3,74 ppm den Positionen 2-OMe und 4'-OMe zugeordnet werden. Die so identifizierten Substrukturen wurden durch die Untersuchung des HMBC Spektrums (s. Abb. 3.21a & b) zusammengefügt. Die  $^3J$  Korrelationen von H-3 zu C-1 und C-5, H-5 zu C-1 und C-3 und H-5' zu C-1' und C-3' und H-3' zu C-1' und C-5' bestätigten die Grundstrukturen der aromatischen Ringsysteme. Die Positionierung von 4-OH erfolgte durch die Korrelationen zu C-3, sowie die  $^2J$  Korrelationen von H-3 und H-5 zu C-4. 6-Me konnte durch seine Korrelationen zu C-1, C-5 und C-6 und die  $^3J$  Korrelation von H-5 zu C-6Me positioniert werden. Ebenso konnte 6'-OH durch die Korrelationen zu C-1', wie auch 4'-OMe durch die Korrelationen zu C-4' im Zusammenspiel mit der  $^2J$  Korrelation von H-5' zu C-4' und C-6' eingeordnet werden. 2'-OH konnte ebenfalls durch die Korrelation zu C-1', sowie die  $^2J$  Korrelation von H-3' zu C-2' eindeutig positioniert werden. Die Verknüpfung der beiden Ringsysteme konnte wie auch beim Griseophenon B durch die Tatsache, dass C-1 und C-1' quarternäre Kohlenstoffe waren, das Fehlen von 28 amu zum Molekulargewicht, sowie die  $\omega$  Korrelationen von H-3'/5' zur Ketogruppe in Position 7, erklärt werden.

Bisher wurde Griseophenon C aus *Penicillium* sp. (Cacho, *et al.*, 2013, Harris, *et al.*, 1976, Sato, *et al.*, 1978, 刘涛, *et al.*, 2012) und *Nigrospora* sp. (Shang, *et al.*, 2012) isoliert.

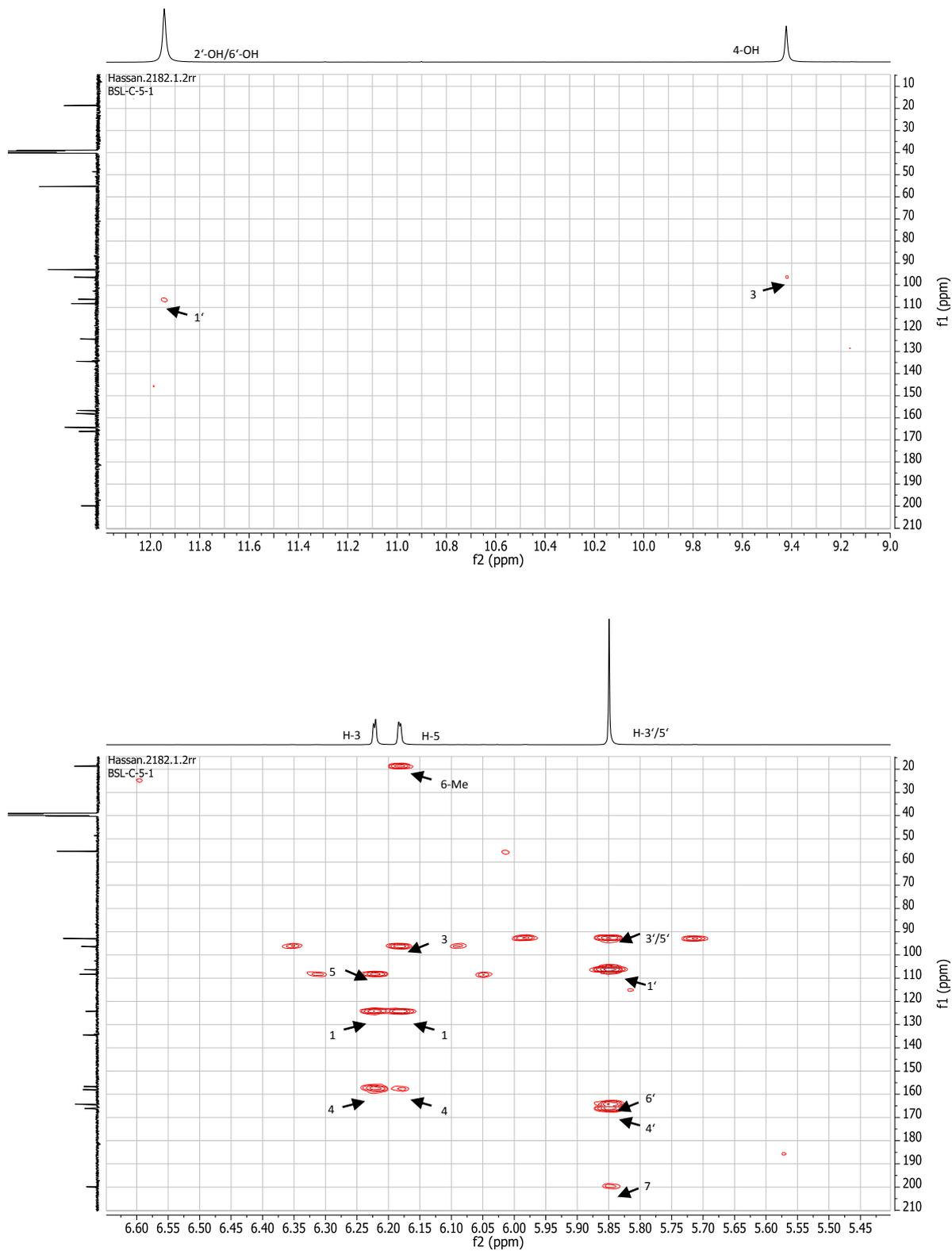
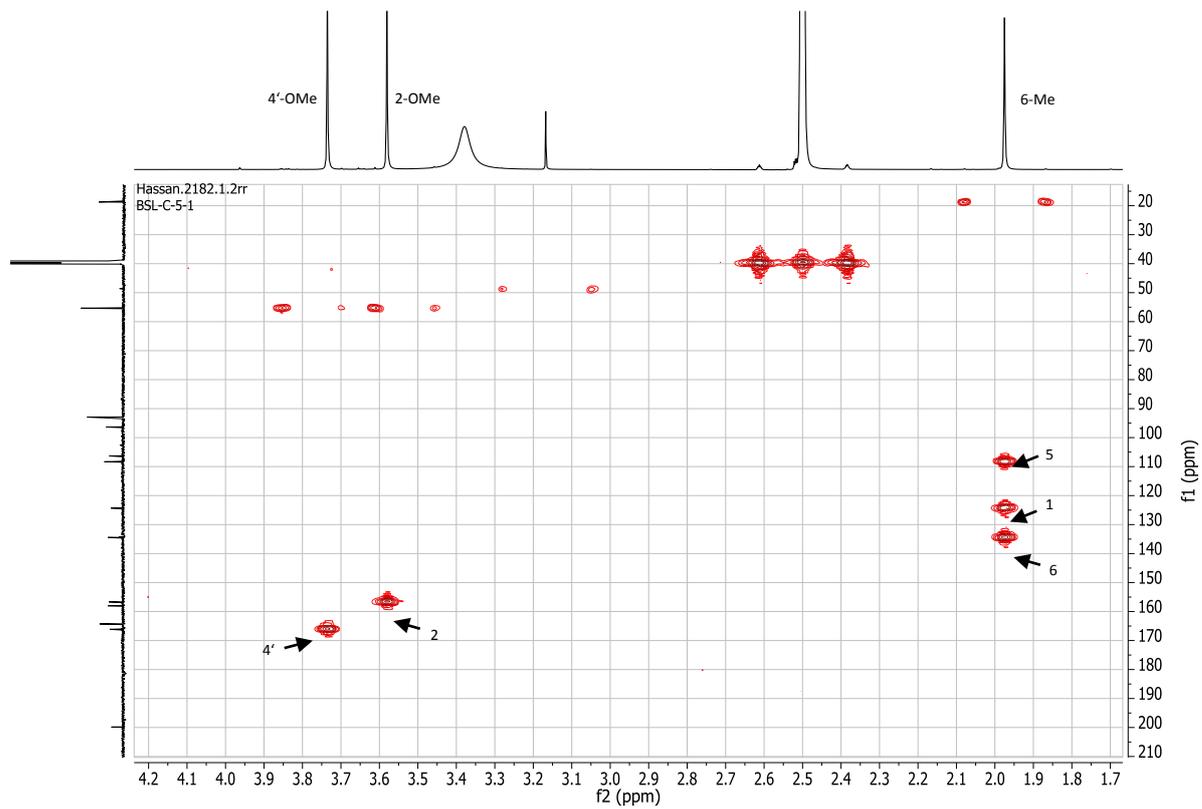


Abb.3.21a: HMBC Spektrum von Griseopheon C in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.



**Abb.3.21b:** HMBC Spektrum von Griseopheon C in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

**Tab. 3.49:** NMR Daten von Griseophenon C. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

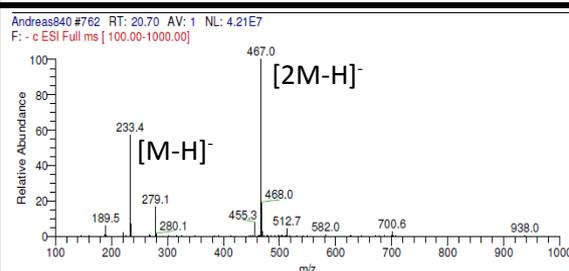
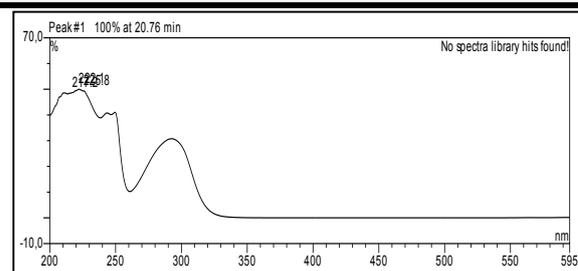
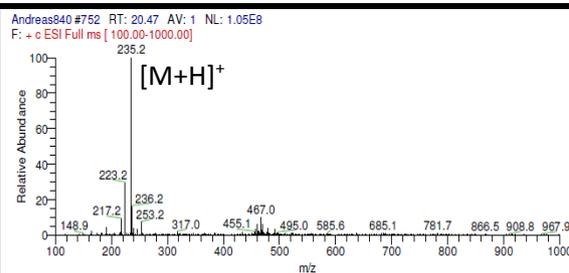
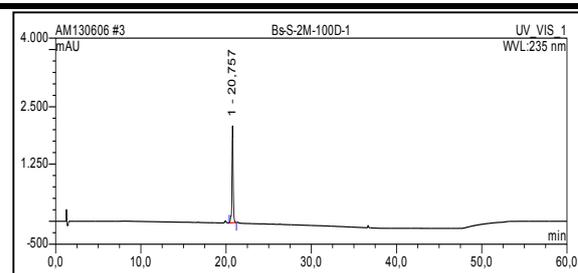
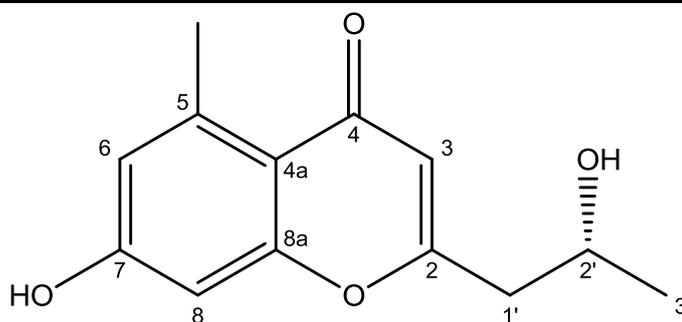
Position	Isolierte Substanz 600 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			Lit. 300 MHz CDCl <sub>3</sub> <sup>a)</sup>		
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1		124,3			120,4	
2		156,7			158,1	
3	6,22 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	96,3	1, 4, 5	6,38 (1H, br s)	98,0	1, 2, 4, 5
4		158,0			159,4	
5	6,18 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	108,3	1, 3, 4, 6-Me	6,38 (1H, br s)	110,5	1, 3, 4, 6-Me
6		134,4			138,3	
7		199,9			196,6	
1'		106,3			106,1	
2'		164,3			n.d.	
3'	5,85 (1H, s)	92,9	7, 1', 4', 5'	5,98 (1H, br s)	94,7	
4'		166,1			167,6	
5'	5,85 (1H, s)	92,9	7, 1', 3', 4', 6'	5,98 (1H, br s)	94,7	
6'		164,3			n.d.	
2-OMe	3,58 (3H, s)	55,4	2	3,73, s	56,2	2
6-Me	1,98 (3H, s)	18,7	1, 5, 6	2,17, s	19,1	1, 5, 6
4'-OMe	3,74 (3H, s)	55,4	4'	3,81, s	55,7	4'
4-OH	9,42 (1H, s)		3			
2'-OH	11,94 (1H, s)		1'			
6'-OH	11,94 (1H, s)		1'			

a) (刘涛, *et al.*, 2012)

3.1.5 Isolierte Verbindungen aus *Fusarium lateritium*

## 7-Hydroxy-2-[(2S)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4H-1-benzopyran-4-on

<b>Probencode</b>	Bs-S-2M-100D-1
<b>Quelle</b>	<i>Fusarium lateritium</i>
<b>Menge</b>	1,6 mg
<b>Physikalische Beschreibung</b>	Gelblich amorph
<b>Summenformel</b>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
<b>Molekulargewicht</b>	234 g/mol
<b>HPLC-Retentionszeit</b>	20,8 min
<b>Drehwert</b>	+23° (c = 0,10; MeOH)



7-Hydroxy-2-[(2S)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4H-1-benzopyran-4-on konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Fusarium lateritium* durch eine Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie, gefolgt von einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  217, 252 und 290 nm. Beobachtet werden konnten im ESI Massenchromatogramm die Basispeaks  $m/z$  235,2 [M+H]<sup>+</sup>

und  $m/z$  233,4  $[M-H]^-$  sowie der pseudomolekulare Peak  $m/z$  467,0  $[2M-H]^-$ , was eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 234 g/mol zuließ.

Die Struktur wurde anhand von  $^1H$  NMR Experimenten und dem Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Literaturwerten aufgeklärt.

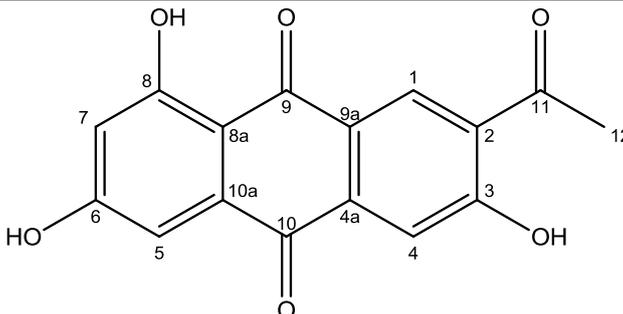
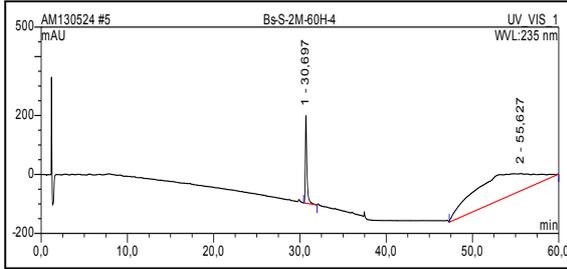
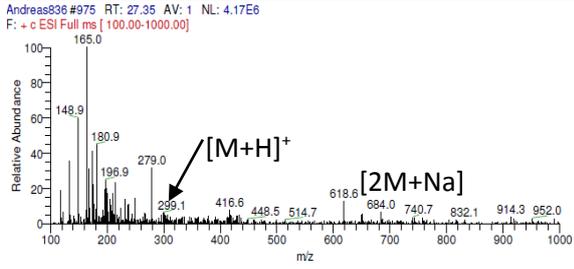
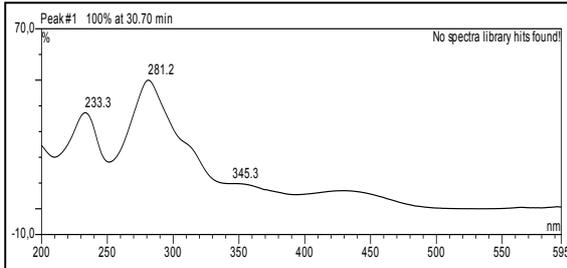
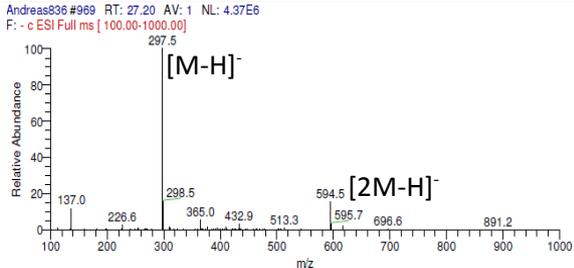
Die Untersuchung des  $^1H$  Spektrums (s. Tab. 3.50), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte die Anwesenheit von *meta*-positionierten aromatischen Protonen, welche bei  $\delta_H$  6,60 ppm und  $\delta_H$  6,62 ppm resonierten und H-6 und H-8 zugeordnet wurde. Bei  $\delta_H$  2,66 ppm konnte ein scharfes Singulett mit der Integration von drei Protonen beobachtet werden, welches der aromatischen Methylgruppe 5-Me zugeordnet wurde. Neben den aromatischen Signalen ließ sich ein weiteres tieffeldverschobenes Singulett bei  $\delta_H$  5,96 ppm beobachten, welches als das olefinische H-3 festgelegt wurde. Komplexer aufgespalten lagen die Signale der aliphatischen Seitenkette wie folgt vor: Die endständige Methylgruppe konnte als Dublett bei  $\delta_H$  1,14 ppm, die Methylengruppe  $CH_2-1'$  bei  $\delta_H$  2,65 ppm und die benachbarte CH-Gruppe H-2' aufgrund des entschirmenden Effektes des benachbarten Sauerstoffatoms bei  $\delta_H$  4,02 ppm beobachtet werden. H-2' lag zum Quartett aufgespalten vor und koppelte mit 6,5 und 6,5 Hz zu den Protonen der Methylengruppe  $CH_2-1'$  und der Hydroxylgruppe 2'-OH ( $\delta_H$  4,83 ppm) und mit 6,2 Hz mit der endständigen Methylgruppe H-3'. Das NMR Signalmuster war nahezu identisch mit dem bereits zuvor beschriebenen des Aloesol. Der Drehwert wurde jedoch bei gleichen Messbedingungen ( $c = 0,1$ ; MeOH) mit  $+23^\circ$  statt  $-15^\circ$  bestimmt und die HPLC Retentionszeit wich unter Verwendung desselben Gradienten und Gerätes um 0,8 min ab. Hieraus ließ sich ableiten, dass die räumliche Orientierung am chiralen Kohlenstoffatom C-2' umgekehrt vorliegen musste.

Bisher wurde 7-Hydroxy-2-[(2*S*)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4*H*-1-benzopyran-4-on aus *Pestalotiopsis* sp. (Xu, *et al.*, 2009, Yang, *et al.*, 2013b), *Rhei rhizoma* (Kashiwada, *et al.*, 1984), *Penicillium griseofulvum* (Zhan, *et al.*, 2013), *Trichoderma aureoviride* (Khamthong, *et al.*, 2012) und den Samen von *Cassia fistula* (Kuo, *et al.*, 2002) isoliert.

**Tab. 3.50:** NMR Daten von 7-Hydroxy-2-[(2*S*)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4*H*-1-benzopyran-4-on. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 500 MHz	Lit. 100 MHz/25 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2			73,2
3	5,96 (1H, s)	5,97 (1H, s)	44,6
4			191,2
5			139,5
6	6,60 (1H, d, <i>J</i> =2,3Hz)	6,62 (1H, s)	114,0
7			164,0
8	6,62 (1H, d, <i>J</i> =2,3Hz)	6,62 (1H, s)	101,6
9			162,6
10			111,9
1'	2,65 (2H, d, <i>J</i> =6,5Hz)	2,67 (2H, d, <i>J</i> =6Hz)	40,5
2'	4,02 (1H, q, <i>J</i> =6,5, 6,5, 6,2Hz)	4,02 (1H, m)	172,1
3'	1,14 (3H, d, <i>J</i> =6,2Hz)	1,14 (3H, d, <i>J</i> =6Hz)	20,4
7-OH	10,52 (1H, s)	10,48 (1H, s)	
5-Me	2,66 (3H, s)	2,65 (3H, s)	22,2
2'-OH	4,83 (1H, s)		

a) (Kashiwada, *et al.*, 1984)

Acylmacrosporin	
Probencode	Bs-S-2M-60H-4
Quelle	<i>Fusarium lateritium</i>
Menge	1,2 mg
Physikalische Beschreibung	Gelbe Kristalle
Summenformel	$C_{16}H_{10}O_6$
Molekulargewicht	298 g/mol
HPLC-Retentionszeit	30,8 min
	
	
	

Acylmacrosporin konnte aus der Ethylacetatfraktion des Pilzes *Fusarium lateritium* durch eine Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie und einer semipräparativen HPLC gewonnen werden. Das UV Spektrum der Substanz zeigte drei Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 233, 281 und 345 nm. Beobachtet werden konnte im Massenchromatogramm der Basispeak bei  $m/z$  297,5  $[M-H]^-$ . Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen  $m/z$  299,1  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  618,6  $[2M+Na]^+$  und  $m/z$  594,5  $[2M-H]^-$  beobachtet werden, welche eine Bestimmung des Molekulargewichtes auf 298 g/mol zuließen. In dem hochauflösenden ESI

Massenspektrum konnte ein Basispeak bei  $m/z$  299,0548  $[M+H]^+$  detektiert werden und somit die Summenformel auf  $C_{16}H_{10}O_6$  berechnet werden.

Die Untersuchung des  $^1H$  NMR Spektrums (s. Tab. 3.51), aufgenommen in deuteriertem DMSO, zeigte insgesamt sechs Signale, unter welchen sich eine wasserstoffbrückenausbildende Hydroxylgruppe bei  $\delta_H$  12,06 ppm befand. Die Signale  $\delta_H$  7,11 ppm und  $\delta_H$  6,61 ppm wurden aufgrund ihrer Kopplungskonstante von 2,4 Hz in *meta*-Position zueinander angeordnet, sowie die Signale, auftretend bei  $\delta_H$  8,43 ppm und  $\delta_H$  7,54 ppm, in *para*-Position zueinander. Zusätzlich war eine Methylgruppe bei  $\delta_H$  2,68 ppm zu beobachten. Die Teilstrukturen konnten mithilfe von HMBC Korrelationen (s. Abb. 3.22) zusammengefügt werden. So ließen sich die Partialstruktur des *meta*-protonierten Aromaten durch die  $^2J$  Korrelationen von H-5 als auch von H-7 zu C-6 ( $\delta_C$  164,9 ppm), die  $^2J$  Korrelation von H-7 zu C-8 ( $\delta_C$  164,7 ppm) sowie die  $^3J$  Korrelation zu C-8a bestätigen. Das Bild konnte durch die Korrelationen von 8-OH zu C-7 ( $\delta_C$  107,9 ppm), C-8 ( $\delta_C$  164,7 ppm) und C-8a ( $\delta_C$  109,0 ppm) vervollständigt werden. Ein Vergleich mit der von Brauers (Brauers, *et al.*, 2000) isolierten Substanz (s. Abb. 3.23), zeigte eine weitgehende Deckung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in den Positionen 5 bis 8a sowie 10 und 10a und erhöhte somit die Evidenz für die Konstitution der Teilstruktur. Die weitergehende Analyse des HMBC Spektrums bestätigte durch die  $^3J$  Korrelation von H-1 zu C-3 ( $\delta_C$  164,8 ppm), C-4a ( $\delta_C$  137,2 ppm), C-9 ( $\delta_C$  184,4 ppm) und C-11 ( $\delta_C$  200,2 ppm), sowie die  $^2J$  Korrelationen von H-4 zu C-4a, bzw.  $^3J$  Korrelationen zu C-2 ( $\delta_C$  127,9 ppm), C-9a ( $\delta_C$  122,6 ppm) und C-10 ( $\delta_C$  181,7 ppm) die Konstitution des *para*-protonierten aromatischen Systems. Die Methylgruppe  $CH_3$ -12 bei  $\delta_H$  2,68 ppm konnte mittels der  $^2J$  und  $^3J$  Korrelationen zu C-11 ( $\delta_C$  200,2 ppm) und C-2 ( $\delta_C$  127,9 ppm) mit dem aromatischen System verknüpft werden. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der *para*-protonierten Partialstruktur mit denen des Macrosporins zeigte eine große Übereinstimmung in den Positionen 1 bis 4a, mit Ausnahme der Verschiebung in Position 2, hervorgerufen durch den stark entschirmenden Effekt des Carbonylkohlenstoffes in  $\alpha$ -Position. Die Verknüpfung der beiden aromatischen Systeme erfolgte mittels der Korrelation von H-4 und H-5 zu C-10, sowie von H-1 zu C-9.

Acylmacrosporin ist ein neuer Naturstoff.

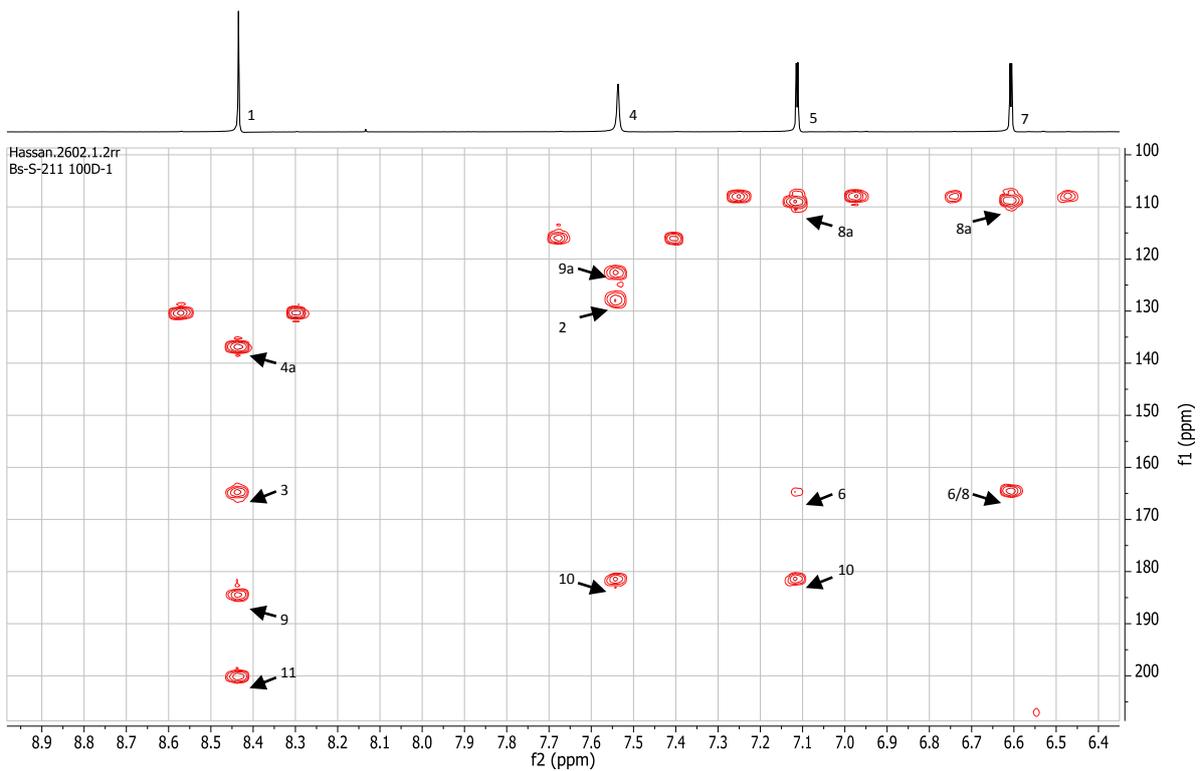
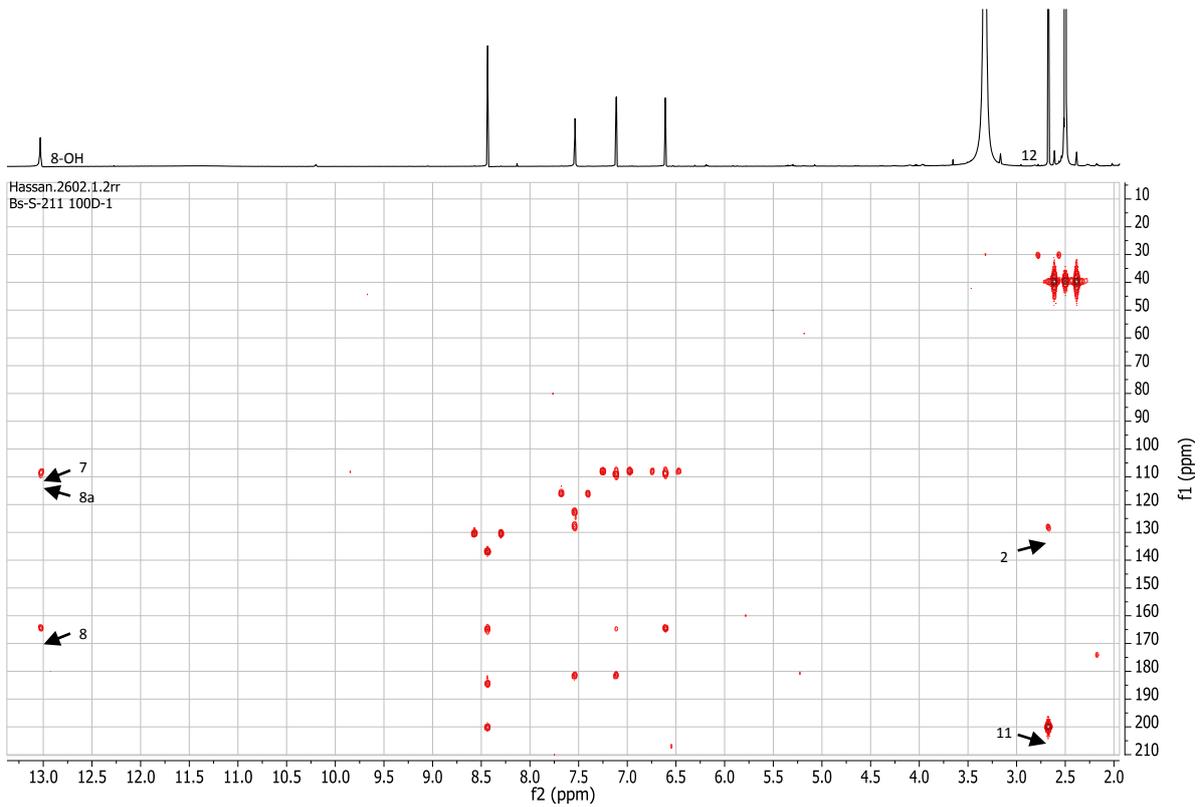
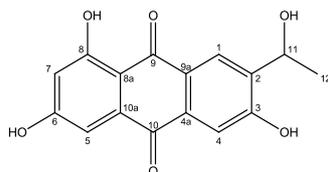


Abb.3.22: HMBC Spektrum von Acylmacroporin in DMSO- $d_6$  bei 600 MHz.

Tab. 3.51: NMR Daten von Acylmacroporin. Alle chemischen Verschiebungen in ppm.

Position	Isolierte Substanz 600 MHz/150 MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )			1,3,6,8-Tetrahydroxy-2-[(1 <i>R</i> )-1- hydroxyethyl]-9,10-anthracendion ? MHz (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>a)</sup>		Macroporin 300 MHz/75 MHz (DMF- <i>d</i> <sub>7</sub> ) <sup>b)</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	8,43 (1H, s)	130,4	3, 4a, 9, 11		160,6	7,95 (1H, s)	130,8
2		127,9			122,8		133,0
3		164,8			63,3		162,5
4	7,54 (1H, s)	116,1	2, 4a, 9a, 10	7,07 (1H, s)	109,4	7,67 (1H, s)	111,8
4a		137,2			132,9		134,1
5	7,11 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	107,9	6, 8a, 10	7,09 (1H, d, <i>J</i> =2,3Hz)	108,6		165,8
6		164,7			165,0	6,80 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	106,0
7	6,61 (1H, d, <i>J</i> =2,4Hz)	107,9	6, 8, 8a	6,57 (1H, d, <i>J</i> =2,3Hz)	108,0		167,0
8		164,7			164,1	7,19 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)	107,8
8a		109,0			108,8		136,0
9		184,4			188,6		187,6
9a		122,6			107,9		111,1
10		181,7			181,2		181,2
10a		n.d.			134,9		126,0
11		200,2		5,29 (1H, q, <i>J</i> =6,5Hz)	63,2		16,4
12	2,68 (3H, s)	30,4	2, 11	1,44 (3H, d, <i>J</i> =6,6Hz)	22,2		
8-OH	12,06 (1H, s)		7, 8, 8a	12,10 (1H, s)			
11-OH				12,70 (1H, s)			

a) (Brauers, *et al.*, 2000) b) (Hassan, 2007)Abb. 3.23: Struktur von Brauers *et al.* Anthrachinon

### 3.2 Bioaktivitäten der isolierten Substanzen

Alle isolierten Substanzen wurden entsprechend ihrer Ausbeute auf ihr zytotoxisches und antibakterielles Potential untersucht. Hierzu wurden die murine Zelllinie L5178Y und die

## Ergebnisse

humanen Zelllinien K562, A2780sens, A2780CisR und HCT116 verwendet. Die antibakteriellen Testungen mit den klinisch relevanten Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, inklusive Methicillin-resistentem *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecalis* und den Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt. Zusätzlich wurden einige der Verbindungen auf eine Inhibierung von HSP90 im Progesteron Rezeptor Rekonstitutions Assay untersucht. Die Ergebnisse sind tabellarisch aufgelistet. Für L5178Y verstehen sich die Prozentangaben als Wachstumsinhibierung bei einer fixen Konzentration von 10 µg/mL. Bei K562, A2780sens und A2780CisR wurden die IC<sub>50</sub> Werte in µM ausgedrückt. Detektierte MHKs gegenüber den aufgelisteten Mikroorganismen sind in µg/mL angegeben. Felder, die mit „n.a.“ gekennzeichnet sind, zeigen an, dass die betreffende Substanz getestet wurde, jedoch bei der entsprechenden Maximalkonzentration inaktiv war, die mit „-“ gekennzeichneten, dass die entsprechende Substanz nicht getestet wurde (Grenzwerte s. 2.2.10).

### 3.2.1 Bioaktivitäten der aus *Rhizoctonia sp.* isolierten Substanzen

Tab. 3.52: Bioaktivitäten isolierter Verbindungen aus *Rhizoctonia sp.*

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> <sup>2</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>
Indol-3-carbonsäure	0%	n.a.	n.a.	n.a.
Indol-3-aldehyd	-1,2%	n.a.	n.a.	n.a.
Indol-3-amin	0%	n.a.	n.a.	n.a.
<i>N</i> -[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid	0%	n.a.	n.a.	n.a.
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	-6,2%	n.a.	n.a.	n.a.
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	-25,2%	n.a.	n.a.	n.a.
Phenyllessigsäure	99,3%	32 µg/mL	n.a.	n.a.
5-Methyl-4-hexensäure	-4,2%	n.a.	n.a.	n.a.
<i>t</i> -Ferulasäure	-	n.a.	n.a.	n.a.
Protocatechualdehyd	-17,1%	32 µg/mL	n.a.	n.a.

<sup>1</sup> Wachstumsinhibierung bei 10 µg/mL bestimmt durch MTT-Assay

<sup>2</sup> MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

Lediglich die Phenyllessigsäure zeigte eine zytotoxische Aktivität gegenüber der Zelllinie L5178Y. Zusätzlich zeigte sie moderate antibakterielle Eigenschaften gegen *S. aureus* mit einer MHK von 32 µg/mL. Diesen antibakteriellen Effekt gegen *S. aureus* zeigte auch Protocatechualdehyd, ebenfalls mit einer MHK von 32 µg/mL, jedoch keine zytotoxischen Eigenschaften.

3.2.2 Bioaktivitäten der aus *Pleospora sp.* isolierten SubstanzenTab. 3.53: Zytotoxizitäten und HSP90 Inhibierung isolierter Verbindungen aus *Pleospora sp.*

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	A2780sens <sup>2</sup>	A2780CisR <sup>2</sup>	K562 <sup>2</sup>	HCT116 <sup>2</sup>	HSP90 <sup>3</sup>
Altersolanol A	100%	1,45µM	4,00µM	3,64µM	1,37µM	n.a.
Altersolanol A Acetonid	89,4%	-	-	-	-	-
Altersolanol B	-	-	-	-	-	-
Altersolanol C	96,6%	3,90µM	5,01µM	6,71µM	3,74µM	n.a.
Altersolanol C Acetonid	90,3%	-	-	-	-	-
Altersolanol L	38,2%	-	-	-	-	-
Tetrahydroaltersolanol B	18,8%	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
Tetrahydroaltersolanol F	51%	-	-	-	-	n.a.
Macrosporin	48,1%	-	-	-	-	-
Methylalertanin	-8,8%	-	-	-	-	-
Alterporriol A/B	82,4%	-	-	-	-	n.a.
Alterporriol D	8,3%	-	-	-	-	n.a.
Alterporriol E	99,2	-	-	-	-	-
Alterporriol N	27,7%	-	-	-	-	n.a.
Alterporriol P	91,2%	-	-	-	-	-
Isoscleron	27,7%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4-Hydroxyscylaton	21,6%	-	-	-	-	-
Stemphyperlenol	64,6%	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.
Altertoxin I	36,4%	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.
Stemphylltoxin II	44,8%	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.
Xanalteric Acid I	8,4%	-	-	-	-	n.a.
(+) Aloesol	11,1%	-	-	-	-	-
Orthosporin	17,7%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

## Ergebnisse

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	A2780sens <sup>2</sup>	A2780CisR <sup>2</sup>	K562 <sup>2</sup>	HCT116 <sup>2</sup>	HSP90 <sup>3</sup>
<b>Infectopyron</b>	3,0%	-	-	-	-	n.a.
<b>4Z-Infectopyron</b>	8,5%	-	-	-	-	-
<b>2Z-Infectopyron</b>	0,3%	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Wachstumshemmung bei 10 µg/mL bestimmt durch MTT-Assay

<sup>2</sup>Zytotoxizität bestimmt mittels MTT Assay mit einer maximalen Konzentration von 100 µM

<sup>3</sup>Progesteronrezeptor Rekonstitutions Assay mit einer maximalen Konzentration von 50 µM

**Tab. 3.54:** Antibiotische Eigenschaften isolierter Verbindungen aus *Pleospora* sp.

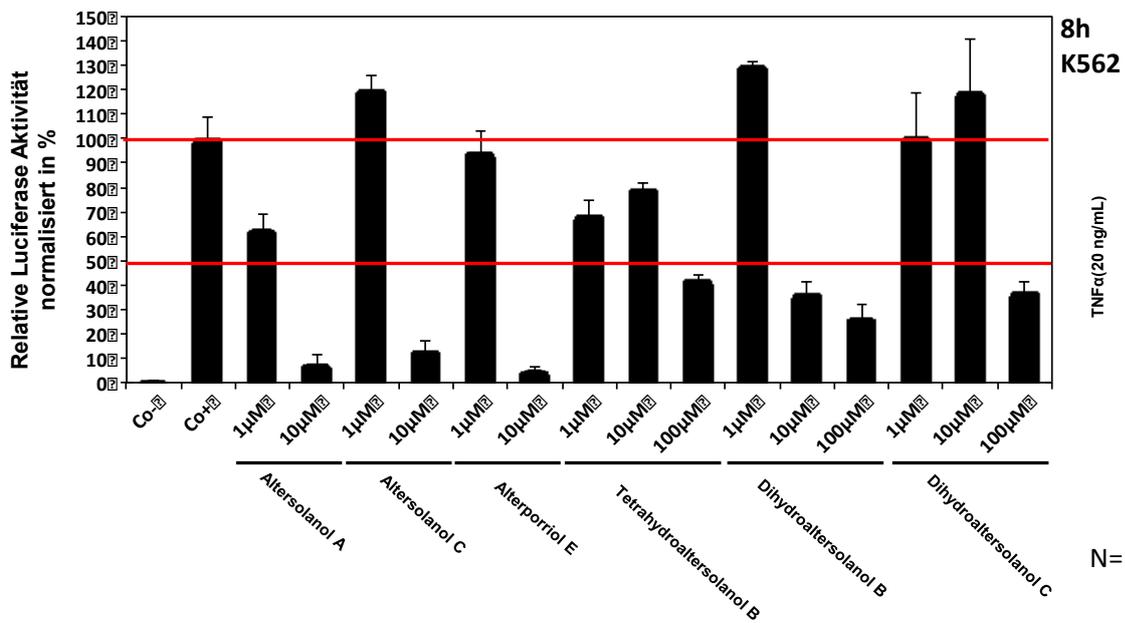
Substanz	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>	MRSA <sup>2</sup>	<i>S. pneumoniae</i> <sup>2</sup>	<i>E. faecalis</i> <sup>2</sup>
<b>Altersolanol A</b>	64µg/ml	n.a.	n.a.	3,91 µg/ml	3,91 µg/ml	15,63 µg/ml
<b>Altersolanol A Acetonid</b>	64µg/ml	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Altersolanol B</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Altersolanol C</b>	64µg/ml	n.a.	n.a.	1,95 µg/ml	1,95 µg/ml	15,63 µg/ml
<b>Altersolanol C Acetonid</b>	32µg/ml	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Altersolanol L</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Tetrahydroaltersolanol B</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Tetrahydroaltersolanol F</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Macrosporin</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Methylalertanin</b>	64µg/ml	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Alterporriol A/B</b>	64µg/ml	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Alterporriol D</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Alterporriol E</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Alterporriol N</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Alterporriol P</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
<b>Isoscleron</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>4-Hydroxyscyclaton</b>	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-

Substanz	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>	MRSA <sup>2</sup>	<i>S. pneumoniae</i> <sup>2</sup>	<i>E. faecalis</i> <sup>2</sup>
Stemphyperylenol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Altertoxin I	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Stemphytoxin II	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Xanalteric Acid I	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
(+) Aloesol	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
Orthosporin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Infectopyron	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
4Z-Infectopyron	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
2Z-Infectopyron	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-

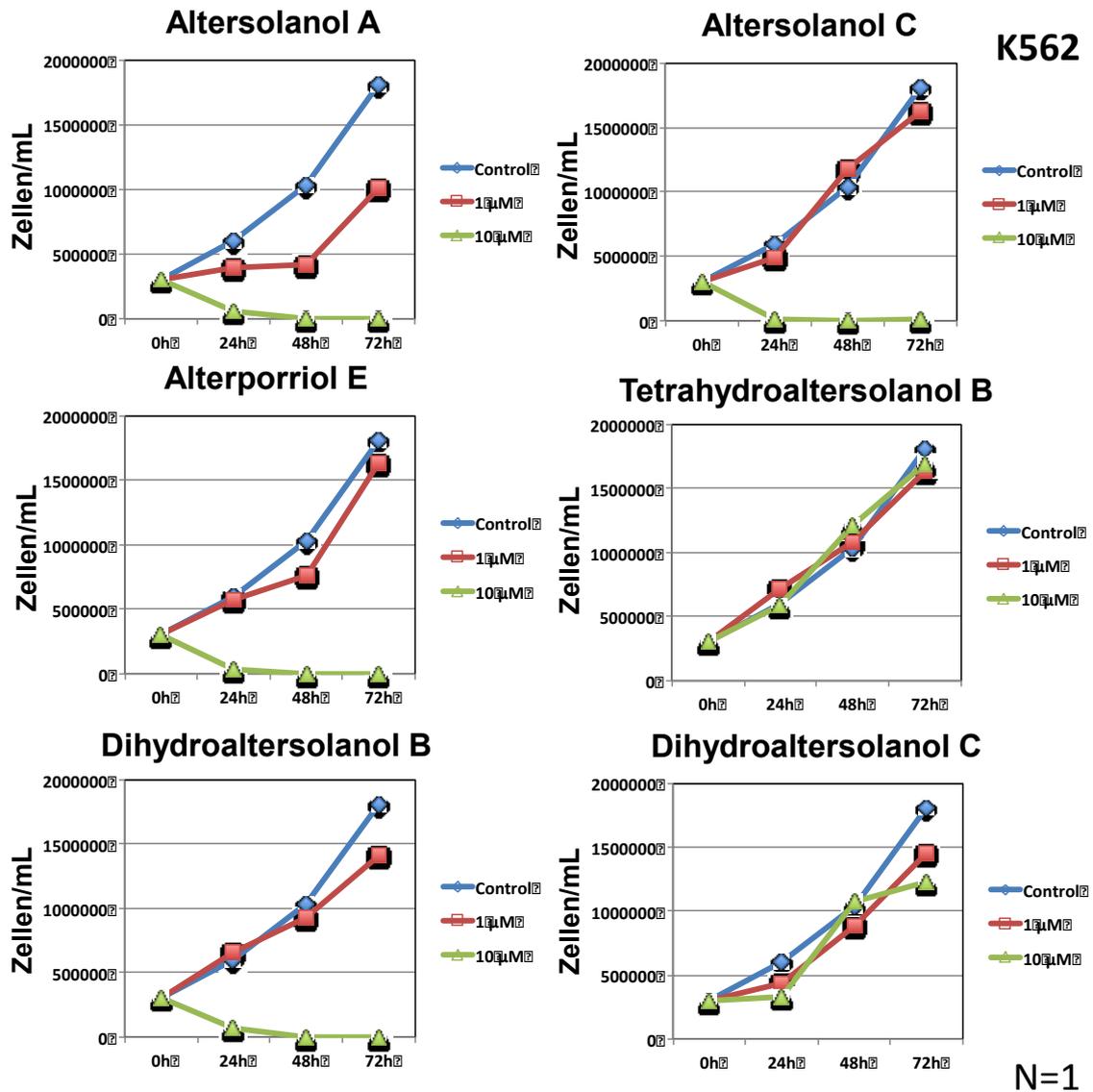
<sup>1</sup> MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

<sup>2</sup> MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

Neben den oben tabellarisch aufgeführten Assays wurde außerdem die Hemmung der TNF $\alpha$  induzierten Hemmung von NF $\kappa$ B untersucht und dieses im Verhältnis zur Viabilität von K562 Zellen betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die Verbindungen Altersolanol A, Altersolanol B, Alterporriol E und Tetrahydroaltersolanol B einen stark inhibierenden Effekt auf die TNF $\alpha$  vermittelte Inhibierung von NF $\kappa$ B haben (s. Abb. 3.24). Dihydroaltersolanol B und C zeigten ebenfalls einen solchen Effekt, welcher jedoch schwächer ausgeprägt war. Altersolanol A, Altersolanol C und Alterporriol E zeigten zusätzlich einen stark zytotoxischen Effekt auf K562 Zellen, bei einer Konzentration von 10 µM, wohingegen Tetrahydroaltersolanol B diesen Effekt nicht aufwies. Trotz des gleichen inhibierenden Effektes auf NF $\kappa$ B konnte zwischen zwei resultierenden Effekten unterschieden werden: einem zytotoxischen und einem nicht zytotoxischen (s. Abb 3.25). Diese Effekte korrespondierten mit den Ergebnissen auf L5178Y, K562, A2780sens und A2780CisR Zellen. Keine der untersuchten Verbindungen zeigte eine Inhibierung der HSP90.



**Abb. 3.24:** Effekte von Altersolanol A, Altersolanol C, Alterporriol E, Tetrahydroaltersolanol B, Dihydroaltersolanol B und Dihydroaltersolanol C auf die NF $\kappa$ B Aktivität nach 8 h in der Zelllinie K562. Als Negativkontrolle wurde Medium mit 1% DMSO und als Positivkontrolle 20ng/mL TNF $\alpha$  verwendet.



**Abb. 3.25:** Zytotoxischer Effekt von Altersolanol A, Altersolanol C, Alterporriol E, Tetrahydroaltersolanol B, Dihydroaltersolanol B und Dihydroaltersolanol C über 72 h bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  gegenüber K562. Als Kontrolle diente 1% DMSO.

3.2.3 Bioaktivitäten der aus *Penicillium glabrum* isolierten Substanzen

Tab. 3.55: Zytotoxizitäten und HSP90 Inhibitorien isolierter Verbindungen aus *Penicillium glabrum*.

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	A2780sens <sup>2</sup>	A2780CisR <sup>2</sup>	K562 <sup>2</sup>	HCT116 <sup>2</sup>	HSP90 <sup>2</sup>
Desmethoxyyangonin	22,6%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Asterricacid	0%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-
Methylasterricacid	27,9%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sulochrin	99,9%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Questin	28,4%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Questinol	37,1%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>1</sup> Wachstumsinhibierung bei 10 µg/mL bestimmt durch MTT-Assay

<sup>2</sup> Zytotoxizität bestimmt mittels MTT Assay mit einer maximalen Konzentration von 100 µM

<sup>3</sup> Progesteronrezeptor Rekonstitutions Assay mit einer maximalen Konzentration von 50µM

Tab. 3.56: Antibiotische Eigenschaften isolierter Verbindungen aus *Penicillium glabrum*.

Substanz	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>	MRSA <sup>2</sup>	<i>S. pneumoniae</i> <sup>2</sup>	<i>E. faecalis</i> <sup>2</sup>
Desmethoxyyangonin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Asterricacid	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
Methylasterricacid	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sulochrin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Questin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Questinol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>1</sup> MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

<sup>2</sup> MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 125 µg/mL

Lediglich Sulochrin zeigte einen signifikanten Effekt auf L5178Y. Darauf aufbauende Untersuchungen auf BAEC Zellen zeigten keinen Effekt, so dass der zytotoxische Effekt auf L5178Y begrenzt zu sein scheint. Keine der Verbindungen zeigte in den gewählten Testsystemen weder ein antibiotisches Potential, noch eine Inhibierung der HSP90.

### 3.2.4 Bioaktivitäten der aus *Nigrospora sphaerica* isolierten Substanzen

Tab. 3.57: Bioaktivitäten isolierter Verbindungen aus *Nigrospora sphaerica*.

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> <sup>2</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>
Griseofulvin	82,3%	n.a.	n.a.	n.a.
Dechlorgriseofulvin	15,9%	n.a.	n.a.	n.a.
Griseophenon B	-4,0%	n.a.	n.a.	n.a.
Griseophenon C	-14,0%	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>1</sup>Wachstumsinhibierung bei 10 µg/mL bestimmt durch MTT-Assay

<sup>2</sup>MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

Lediglich Griseofulvin zeigte einen signifikanten Effekt auf die Zelllinie L5178Y. Keine der Verbindungen zeigte in den gewählten Testsystemen ein antibiotisches Potential.

### 3.2.5 Bioaktivitäten der aus *Fusarium lateritium* isolierten Substanzen

Tab. 3.58: Bioaktivitäten isolierter Verbindungen aus *Fusarium lateritium*.

Substanz	L5178Y <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> <sup>2</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>
(-) Aloesol	4,2%	n.a.	n.a.	n.a.
Acylmacrosporin	0%	32-64µg/ml	n.a.	n.a.

<sup>1</sup>Wachstumsinhibierung bei 10 µg/mL bestimmt durch MTT-Assay

<sup>2</sup>MHK in µg/mL, bestimmt durch 1:2 Verdünnungsreihen ausgehend von 64 µg/mL

Nur Acylmacrosporin zeigte eine Wirkung gegen *S. aureus* mit einem MHK von 32-64 µg/mL, jedoch kein zytotoxisches Potential. (-)-Aloesol war in allen gewählten Testsystemen inaktiv.

### 4. Diskussion

#### 4.1 Isolierte Naturstoffe aus *Rhizoctonia* sp.

*Rhizoctonia* sp. wurde aus den Wurzeln von *Mentha asiatica* isoliert, welche in Taschkent in Usbekistan gesammelt wurde. *Mentha asiatica* gehört zur großen Gattung der Minzen, welche auch heute noch weltweit pharmazeutisch für unterschiedliche Erkrankungen wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Erkältungskrankheiten und Fieber, sowie allgemeines Unwohlsein eingesetzt werden (Kunnumakkara, *et al.*, 2009). *Rhizoctonia* sp., die anamorphen Formen von *Thanatephorus cucumeris*, sind als phytopathogene Pilze bekannt, welche unter anderem wichtige Nutzpflanzen wie Rüben, Kartoffeln und Reis befallen und dort Erkrankungen der Wurzeln hervorrufen können (Baker, 1970). Neben diesem Auftreten als Phytopathoge sind *Rhizoctonia* sp. allerdings auch als Endophyten bekannt (de Barros, *et al.*, 2011, Marlida, *et al.*, 2010). Die Umstände der Krankheitsauslösung sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist der Pilz weltweit großflächig verbreitet (Yuen, *et al.*, 1994), führt aber nicht immer zu Infektionen. Dies kann zum einen auf die Produktion von Phytoalexinen (Smith, *et al.*, 1975) wie auch die Umweltbedingungen Feuchtigkeit und Temperatur (Dorrance, *et al.*, 2003) zurückgeführt werden.

Bisher wurden aus *Rhizoctonia* sp. die beiden toxischen Indolizidinalkaloide Swainosin und Salframin (Harris, *et al.*, 1988), Phenylelessigsäure, *m*-Hydroxyphenylelessigsäure,  $\beta$ -Furoicsäure (Aoki, *et al.*, 1963) sowie *trans*-Zimtsäure, *p*-Coumarsäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd, *p*-Hydroxybenzoesäure und L-Phenylalanin (Sutherland, *et al.*, 1992) isoliert. In dieser Arbeit konnten insgesamt zehn Verbindungen aus dieser Art isoliert werden, welche in drei große Klassen unterteilt werden können: die Indolderivate Indol-3-carbonsäure (**1**), Indol-3-aldehyd (**2**), Indol-3-amin (**3**), *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid (**4**), die Benzoessäurederivate *p*-Hydroxybenzoesäure (**5**), *p*-Hydroxybenzaldehyd (**6**), Phenylelessigsäure (**7**), Protocatechualdehyd (**10**), sowie die Säuren, 5-Methyl-4-hexensäure (**8**) und *trans*-Ferulasäure (**9**). Insgesamt betrachtet zeigt sich damit eine große Übereinstimmung zwischen bereits bekannten und in dieser Arbeit isolierten Substanzen.

Betrachtet man die bereits publizierten Bioaktivitäten dieser Verbindungen, zeigt sich folgendes Bild: Bei dem Derivat des Phytohormons Indolelessigsäure, Indol-3-carbonsäure, konnte ein antifungaler Effekt (Kavitha, *et al.*, 2010) beobachtet werden, für die übrigen Indolverbindungen wurden bisher noch keine Bioaktivitäten publiziert, welches ihre Inaktivität vermuten lässt. Der Phenylelessigsäure konnte neben schwachen antibiotischen Eigenschaften (Burkhead, *et al.*, 1998, Hwang, *et al.*, 2001) auch keimungshemmende Wirkungen bei Tomaten- und Bohnensamen (Iacobellis and DeVay, 1987), sowie phytohormon-ähnliche Effekte (Muir, *et al.*, 1967, Wightman and Lighty, 1982) nachgewiesen werden. Den übrigen phenolischen Verbindungen *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd und *trans*-Ferulasäure konnte ebenfalls eine keimungshemmende Wirkung auf Weizensamen nachgewiesen werden (Börner, 1960). Das

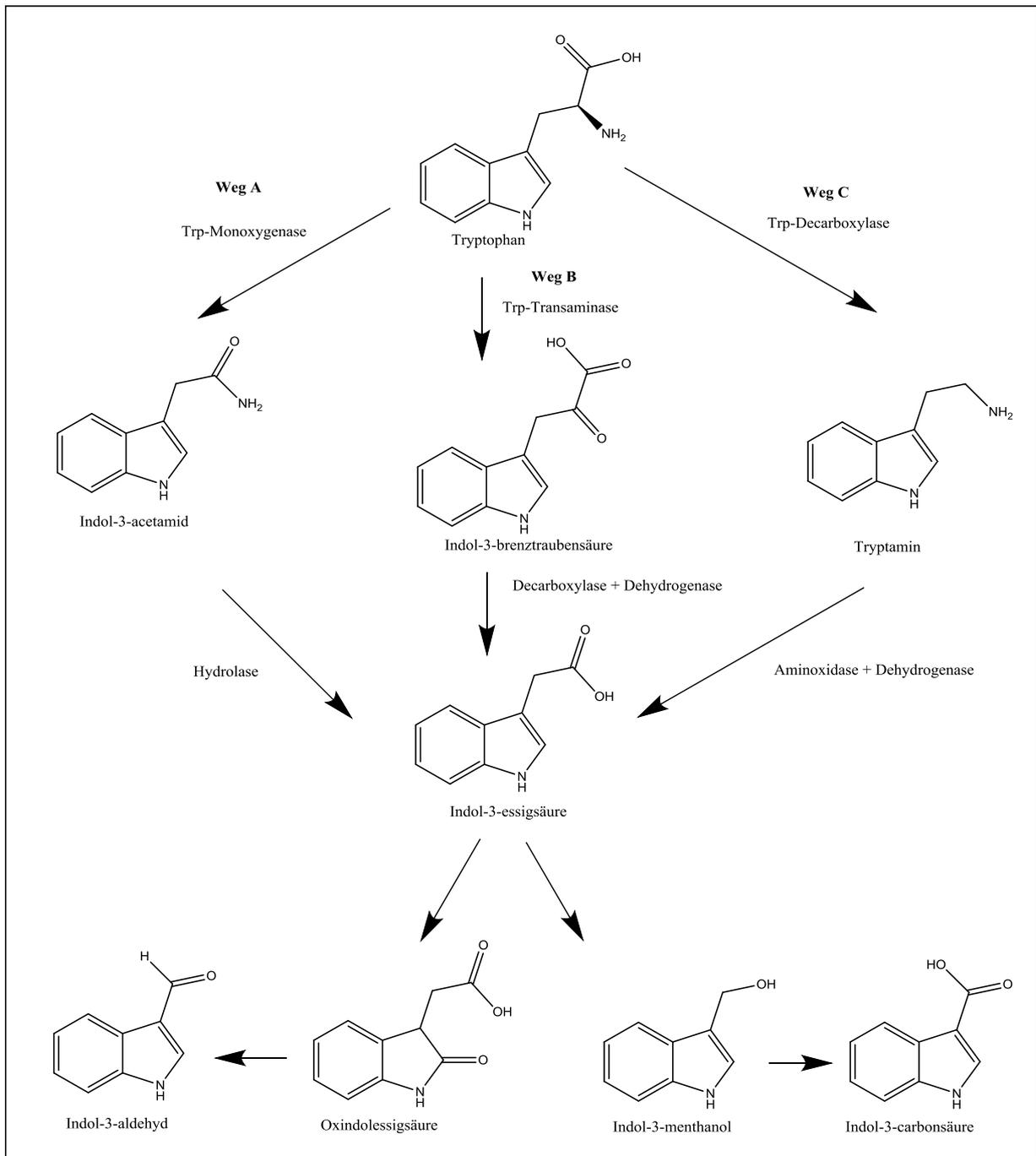
Auftreten dieser einfachen Verbindungen konnte bereits mit Degradationsprozessen von Lignin in Verbindung gebracht werden (Bbauns, 1952). Die Isolierung der Indolderivate, welche als biosynthetische Modifizierung der Indolessigsäure gesehen werden können (Bartel, 1997), zeigt die massive Produktion des Phytohormons Indolessigsäure auf. Dies kann ähnlich wie bei *Agrobacterium tumefaciens* oder anderen Pilzen (Hodges, 1960) als Induktor des Pflanzenwachstums insbesondere des Wurzelwachstums dienen (Hirata, 1960). Die Kombination dieser beschriebenen Effekte zeigt, dass durch die Kultivierung der Pilzkultur auf Reis und Bohnen Degradationsprozesse und in natürlichem Umfeld Wachstumsprozesse der Wirtspflanze ausgelöst werden können. Die Kombination aus Wachstum und Degradation zeigt die Destruktion des Wirtsgewebes auf. Die phytopathogene Wirkung von *Rhizoctonia* sp. wird somit unterstrichen.

Die im Rahmen dieser Arbeit systematisch durchgeführten Bioaktivitätstudien zur Überprüfung des antibiotischen, antifungalen und zytotoxischen Potentials zeigten, dass mit Ausnahme der moderaten antibakteriellen Eigenschaften der Phenylelessigsäure und des Protocatechualdehyds, sowie der zytotoxischen Eigenschaft der Phenylelessigsäure gegen L5178Y-Zellen, alle anderen Verbindungen inaktiv in den gewählten Bioassays waren. Daher kann auf eine selektive Wirkung der oben beschriebenen Verbindungen auf pflanzliche Gewebe vermutet werden.

### **Biosynthese von Indolderivaten**

Die biosynthetischen Möglichkeiten (s. Abb. 4.1) zur Darstellung von Indolderivaten sind vielfältig, wobei alle Biosynthesewege Tryptophan als Ursprung gemeinsam haben (Bartel, 1997). Der hier dargestellte „Weg A“ verläuft zunächst über eine Oxygenierung mittels einer Monooxygenase zu Indol-3-acetamid, welches in einem zweiten Schritt durch eine Hydrolase zur Indol-3-essigsäure umgesetzt wird. „Weg B“ beginnt mit einer Transaminierung zur Indol-3-brenztraubensäure, gefolgt von einer Umsetzung durch eine Decarboxylase zu Indol-3-brenzaldehyd. Dieses wird in einem weiteren Schritt durch eine Dehydrogenase ebenfalls zur Indol-3-essigsäure umgesetzt. Auch „Weg C“ resultiert in Indol-3-essigsäure, gebildet über eine Decarboxylierung von Tryptophan zu Tryptamin mit anschließender Aminooxidierung zum Indol-3-brenzaldehyd, gefolgt von einer Dehydrierung (Bartel, 1997). Die Synthese von Indol-3-carbonsäure wie auch Indol-3-aldehyd erfolgt durch den Abbau der Indol-3-essigsäure (Sagee, *et al.*, 1990). Eine Möglichkeit hierfür besteht in der oxidativen Decarboxylierung der Indol-3-essigsäure, eine andere in einer nicht oxidativen Decarboxylierung, welche beide zur Bildung der Oxindol-3-essigsäure führen (Bandurski and Schulze, 1977, Sembdner, *et al.*, 1980). Im Rahmen der oxidativen Decarboxylierung entstehen durch Peroxidasen Indol-3-Aldehyd aus Oxindol-3-essigsäure (Sembdner, *et al.*, 1980), wohingegen die Indol-3-carbonsäure aus der Vorstufe Indol-3-methanol hervorzugehen scheint (Langenbeck-Schwich and Grainbow, 1984). *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid könnte durch eine Umsetzung von Tryptamin mittels einer

Hydratase und einer Dehydrogenase zunächst zum Oxo-Tryptamin und anschließend durch Laccasen zu *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid umgesetzt werden.



**Abb. 4.1:** Biosyntheseweg von Indolderivaten

## Biosynthese der Benzoesäurederivate

Benzoessäurederivate können sich in einem fünfstufigen Prozess (s. Abb. 4.2) über die enzymatische Desaminierung durch die Phenylalaninammoniaklyase (PAL) bzw. durch die Tyrosinammoniaklyase (TAL) bilden. Anschließend findet eine Kopplung mit Acetyl-CoA mittels einer Ligase statt. Das intermediäre Produkt wird über eine Hydratase an der Seitenkette hydriert und eine zusätzliche Hydroxyfunktion eingeführt. Dieses Zwischenprodukt kann über zwei unterschiedliche Wege zu Benzoesäure umgewandelt werden. Die erste Möglichkeit (Weg A) besteht in der Degradation zu Benzaldehyd über eine Retro-Aldolase gefolgt von einer Oxidation zu Benzoesäure. Die zweite Möglichkeit (Weg B) führt über eine Oxidation der Hydroxylgruppe und anschließender Umsetzung mittels einer  $\beta$ -Ketothiolase zu Benzoesäure (Jarvis, *et al.*, 2000, Lee, *et al.*, 1995, Ribnicky, *et al.*, 1998). Die Umsetzung des Cinnamomyl-CoA zu Benzaldehyd, bzw. zu Benzoesäure entspricht damit der aus dem Fettstoffwechsel bekannten  $\beta$ -Oxidation (Hertweck, *et al.*, 2001). Die daran beteiligte Enoyl-CoA-Hydratase mit ihrem katalytischen Zentrum Gly<sup>116</sup>, Glu<sup>119</sup> und Glu<sup>139</sup> ist ein stark konserviertes Enzym, welches in vielen Organismen mit hoher Homologie zu finden ist (Gasson, *et al.*, 1998, He and Yang, 1997, Preisig-Müller, *et al.*, 1994, Yang, *et al.*, 1991). Die Umwandlung von Coumaryl-CoA mittels einer Coumaryl-CoA Hydratase/Lyase erfolgt über den bereits beschriebenen „Weg A“ (Gasson, *et al.*, 1998).

Weitere Möglichkeiten für die Biosynthese von einfachen Phenolsäuren bestehen im Shikimsäureweg, dem Acetat-Mevalonatweg und dem Isoprenoidweg (Hänsel, *et al.*, 1999). *Para*-substituierte phenolische Verbindungen werden oftmals über den Shikimisäureweg dargestellt (Hänsel, *et al.*, 1999). Dies kann über eine Degradation der Propanseitenkette in der Art einer  $\beta$ -Oxidation (Dingermann and Schneider, 2004), oder über die Chorismatlyase aus der Chorisminsäure (Barker and Frost, 2001) erfolgen.

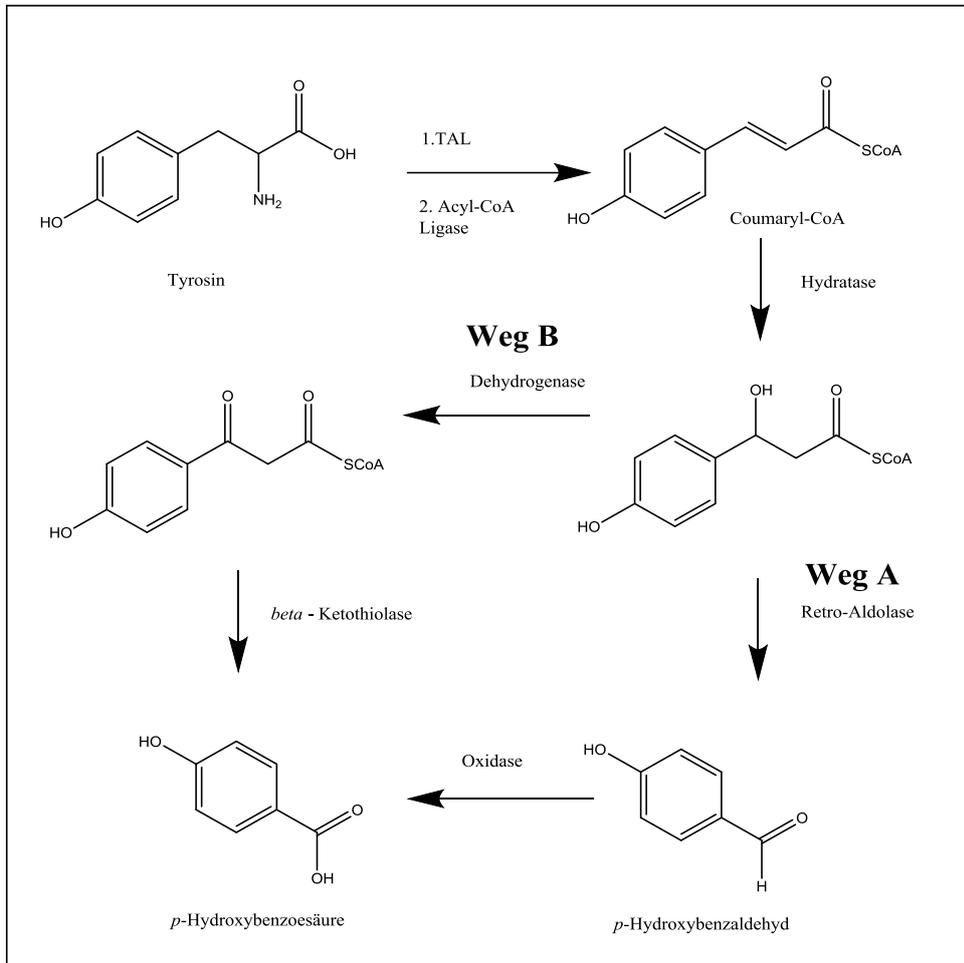
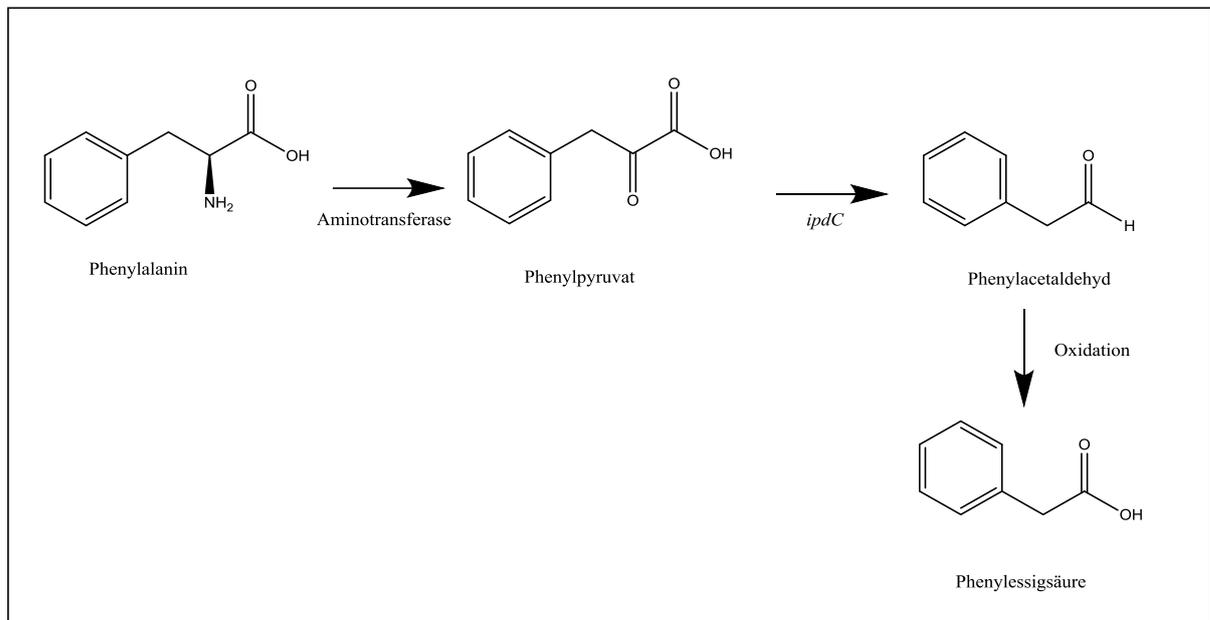


Abb. 4.2: Biosyntheseweg von Benzoesäurederivaten

### Biosynthese der Phenyllessigsäure

Der Biosyntheseweg der Phenyllessigsäure (s. Abb. 4.3) wird über eine Transformation des Phenylalanins postuliert (Krings, *et al.*, 1996). Durch eine Aminotransferase, wie sie auch aus anderen Organismen wie z.B. *E. coli* und *P. aeruginosa* bekannt ist (Mavrides and Orr, 1975, Whitaker, *et al.*, 1982), wird Phenylalanin zunächst in Phenylpyruvat umgesetzt. Die Bedeutung des Enzyms in der Biosynthese von Indol-3-essigsäure und Phenyllessigsäure konnte bereits bei mehreren Pilzen und Bakterien nachgewiesen werden (Gummalla and Broadbent, 2001, Kishore, *et al.*, 1976, Kittell, *et al.*, 1989, Schneider, *et al.*, 1997). Die Indol-3-pyruvat-Decarboxylase (IpdC) konnte als ein mögliches Enzym für die Decarboxylierung von Phenylpyruvat zu Phenylacetaldehyd identifiziert werden. Die biosynthetische Modifizierung zu Phenyllessigsäure wird über eine Oxidase angenommen (Somers, *et al.*, 2005).



**Abb. 4.3:** Biosyntheseweg der Phenylelessigsäure

### Biosynthese der Ferulasäure

Die Ferulasäure wird wie auch alle anderen Zimtsäurederivate aus den Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin nach Desaminierung dargestellt (Back, 2001, Rice-Evans, *et al.*, 1996) (s. Abb. 4.4). Die beiden aromatischen Aminosäuren werden wiederum aus Erytrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat, welche aus dem Pentosephosphatweg, bzw. der Glykolyse und Gluconeogenese hervorgehen, über einen mehrschrittigen, enzymatisch katalysierten Biosyntheseweg mit den Intermediärprodukten Shikimisäure und Chorisminsäure gewonnen (Herrmann and Weaver, 1999). Die initial aus Phenylalanin dargestellte Zimtsäure, wie auch die aus Tyrosin dargestellte *p*-Coumarsäure, stellen ein Zwischenprodukt dar, welches in weiteren Biosyntheseschritten in Chalkone, Flavonoide, Anthocyanidine, Lignine, Coumarine, Lignane und Stilbene überführt werden kann (El-Seedi, *et al.*, 2012, Kroon and Williamson, 1999). Neben der Synthese von *p*-Coumarsäure aus Tyrosin, ist auch der Syntheseweg über Phenylalanin durch eine Hydroxylierung der resultierenden Zimtsäure möglich. Ausgehend von *p*-Coumarsäure kann die Ferulasäure durch eine Hydroxylierung zur Kaffeesäure und anschließender Methylierung der Hydroxylgruppe gewonnen werden (Boudet, 1998).

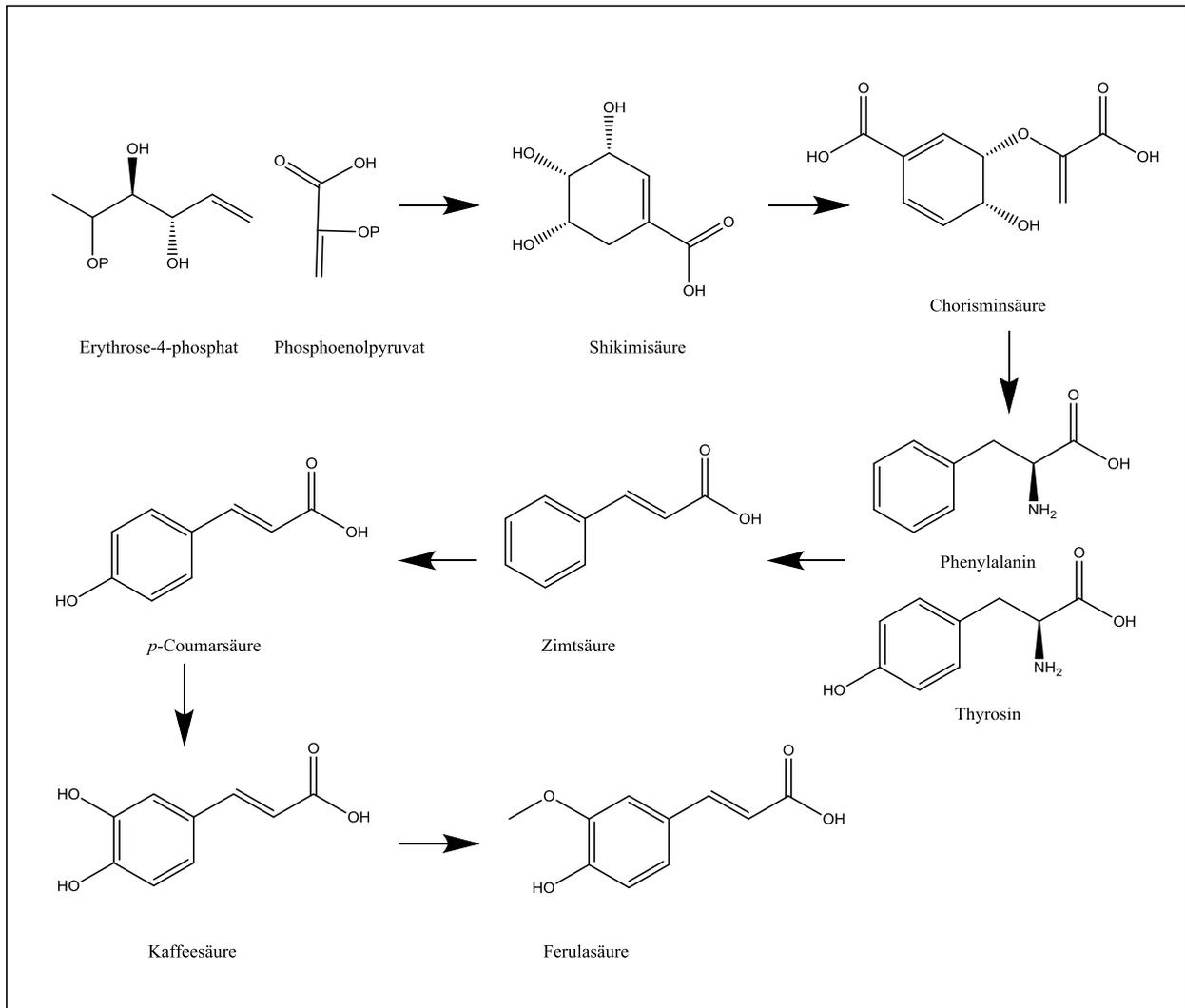


Abb. 4.4: Biosyntheseweg der Ferulasäure

## 4.2 Isolierte Naturstoffe aus *Pleospora* sp.

*Pleospora* sp. wurde aus den Blättern von *Thymelaea lythroides*, welche in Rabat in Marokko gesammelt wurden, isoliert. *Thymelaea* ist einem Genus angehörend, welches sich in 31 Spezies aufteilt. Alle haben eine xeromorphe Gestalt gemein (Galicia-Herbada, 2006). Volksmedizinisch wird die Pflanze zur Behandlung von Diabetes, rheumatischen Erkrankungen, Mittelohrentzündungen, Gebärmutterkrebs und Entzündungen der Prostata eingesetzt (Gmira, *et al.*, 2007). In Tiermodellen an Ratten konnte bereits ein antidiabetischer und blutdrucksenkender Effekt von *Thymelaea*-Extrakten bewiesen werden (Bnouham, *et al.*, 2010, Bnouham, *et al.*, 2012). Bisher wurde aus *Thymelaea lythroides* Bassiatin, Daphneon, Daphnelon, Daphnoretin,  $\delta$ -Sesamin, Wikstromol, *trans*-Tilirosid und Rutarensin isoliert (Kabbaj, *et al.*, 2013).

*Pleospora* sp. stellen die teleomorphen Formen von *Stemphylium* sp. dar (Inderbitzin, *et al.*, 2009). Sie wurden bereits sowohl als Pflanzenpathogene (Farr, *et al.*, 2000, Köhl, *et al.*, 2009, Leach, 1960), als auch als Endophyten beschrieben (Aly, *et al.*, 2010, Krohn, *et al.*, 1999). Eine Vielzahl der bereits aus *Pleospora* sp., bzw. *Stemphylium* sp. isolierten Sekundärmetaboliten gehören den Klassen der Anthrachinone, Isocoumarine und prenylierten Chinone an. So wurden bereits 7-Methoxy-2-methyl-3,4,5-trihydroxyanthrachinon, Physcion, Macrosporin, Deoxybostrycin, Altersolanol B, Dactylariol, Pleospdione (Ge, *et al.*, 2005), Herbarulid (Krohn, *et al.*, 1999), Stemphol (Marumo, *et al.*, 1985), Altersolanol A (Teiten, *et al.*, 2013), Alterporriol C-E, Alterporriol G, Alterporriol N, Altersolanol N (Debbab, *et al.*, 2012), Alterporriol A, Alterporriol B, Alterporriol H, Altersolanol J, Altersolanol K, Altersolanol L, Stemphyron, 6-*O*-Methylalaternin (Debbab, *et al.*, 2009), Infectopyron (Ostenfeld Larsen, *et al.*, 2003), Stemphytoxin I & II (Arnone, *et al.*, 1986), Stemphytoxin III (Stack and Mazzola, 1989), Stemphon (Huber, *et al.*, 1974), Pyrenophorol, Dehydrocurvularin, 2-Hydroxy-2,4-dimethyl-5-*trans*-propenyl-3(2*H*)-furanon (Grove, 1971) und Radicinin (Clarke, 1955) isoliert. Ein Vergleich der bereits aus *Thymelaea lythroides* und *Pleospora* sp. isolierten Verbindungen zeigt, dass bisher keine der Verbindungen aus dem jeweils anderen Organismus bekannt sind.

Obwohl viele der genannten Verbindungen wie z.B. das Altersolanol A auch aus *Alternaria* sp. isoliert wurden, konnte keine direkte Verwandtschaft von *Alternaria* sp. und den anamorphen Formen *Stemphylium* sp. nachgewiesen werden (Pryor, *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 28 Verbindungen isoliert werden, darunter die Anthrachinonderivate Altersolanol A (**11**), Altersolanol B (**12**), Altersolanol C (**13**), Altersolanol L (**14**), Dihydroaltersolanol A (**15**), Dihydroaltersolanol B (**16**), Dihydroaltersolanol C (**17**), Tetrahydroaltersolanol B (**18**), Tetrahydroaltersolanol F (**19**), Macrosporin (**20**), Methylalaternin (**21**), die dimeren Anthrachinonderivate Alterporriol A + B (**22/23**), Alterporriol D (**24**), Alterporriol E (**25**), Alterporriol N (**26**) und Alterporriol P (**27**), die Naphtalenonderivate Isolscleron (**28**), 4-Hydroxysclaton (**29**), Stemphyperyleneol (**30**), Altertoxin I (**31**), Stemphytoxin II (**32**) und Xanalteric Acid I (**33**), die Pyronderivate Infectopyron (**36**), 4Z-

Infectopyron (**37**) und 2Z-Infectopyron (**38**), sowie das Coumarin und Isocoumarin Aloesol (**35**) und Orthosporin (**34**). Außerdem wurden die Derivate Altersolanol A und Altersolanol C semisynthetisch in die korrespondierenden Acetonide und in die vollständig *O*-methylierten Acetonide überführt (**39 - 42**).

Betrachtet man die bereits untersuchten biologischen Wirkungen der isolierten Verbindungen, so zeigt sich folgendes Bild: Altersolanol A zeigte sowohl eine NF- $\kappa$ B Inhibierung (Teiten, *et al.*, 2013), Zytotoxizität (Debbab, *et al.*, 2009), Inhibierung von Proteinkinasen (Debbab, *et al.*, 2009), und Phytotoxizität (Holenstein and Stoessl, 1983, Suemitsu, *et al.*, 1984), als auch eine antibiotische Wirkung (Suemitsu, *et al.*, 1984, Yagi, *et al.*, 1993). Altersolanol B und C zeigten ebenfalls eine antibiotische Wirkung (Suemitsu, *et al.*, 1984, Yagi, *et al.*, 1993) und zytotoxische Wirkungen gegen K562 und SW1116 und HCT-116, MCF-7/ADR, PC-3, HepG2 und Hep3B-Zellen (Ge, *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte eine antiprotozoische Aktivität von Altersolanol B gegenüber *Leishmania braziliensis* und *Entamoeba invadens* detektiert werden (Becker, *et al.*, 1978). Altersolanol L zeigte bisher lediglich eine schwach zytotoxische Wirkung gegenüber L5178Y-Zellen (Debbab, *et al.*, 2009). Zu den Tetrahydroaltersolanolen B und F wurden bisher keine Bioaktivitäten publiziert. Das im Vergleich zu den Altersolanolen weiter dehydrierte Anthrachinonderivat Macrosporin kann in Pflanzen UV-induziert zu Nekrosen führen (Trigos, *et al.*, 2011) und ist zytotoxisch gegenüber L5178Y-Zellen (Aly, *et al.*, 2008, Debbab, *et al.*, 2009), wohingegen für das oxidierte Macrosporinderivat Methylalaternin keine biologischen Daten vorliegen. Dies ist ebenfalls für die Alterporriol Derivate A, B und N der Fall, wohingegen für Alterporriol P eine zytotoxische Aktivität gegenüber HCT-116, MCF-7/ADR, PC-3, HepG2 und Hep3B-Zellen beschrieben ist (Zheng, *et al.*, 2012). Für die Atropisomere Alterporriol D und E sind antibiotische Aktivitäten gegenüber klinisch relevanten Problemkeimen wie MRSA, sowie eine schwach zytotoxische Wirkungen gegenüber L5178Y-Zellen (Aly, *et al.*, 2008, Debbab, *et al.*, 2012) beschrieben, wobei das Alterporriol E eine stärkere Aktivität zeigte. Das Pentaketid Isoscleron wurde bereits als phytotoxisch (Bruno, *et al.*, 2006, Evidente, 2000) beschrieben, für das zusätzlich hydroxylierte Derivat 4-Hydroxyscylaton wurden bisher jedoch keine biologischen Aktivitäten publiziert. Im Vergleich dazu zeigten die dimeren Pentaketide Stemphyperylenol, Altertoxin I und Stemphytoxin II eine ausgeprägte Phytotoxizität (Hradil, *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu Stemphyperylenol (Gao, *et al.*, 2009) zeigte Xanalteri Acid I sowohl gegenüber MRSA, wie auch gegen L5178Y (Kjer, *et al.*, 2009), KB und KBv200-Zellen (Liu, *et al.*, 2010) eine schwache Aktivität. Orthosporin zeigte wie auch die anderen vinylogenen Carbonsäuren eine phytotoxische Aktivität (Gremaud and Tabacchi, 1994, Hallock, *et al.*, 1988), wohingegen für das Chromonderivat Aloesol keine biologischen Aktivitäten beschrieben sind. Betrachtet man die isolierten Pyrone, so ist lediglich für ein Pyronderivat, das *all-trans*-Infectopyron, eine Untersuchung der biologischen Aktivität durchgeführt worden. In dieser wurde festgestellt, dass faulende Tomaten eine hohe Konzentration von *all-trans*-Infectopyron enthalten, was somit als

Marker von Degradationsprozessen interpretiert werden kann (Ostenfeld Larsen, *et al.*, 2003). *All-trans*-Infectopyron zeigte kein zytotoxisches Potential (Ivanova, *et al.*, 2010). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass einige biologische Aktivitäten entdeckt wurden, jedoch Wirkungsmechanismen und Strukturwirkungsbeziehungen nicht oder nur rudimentär aufgeklärt wurden.

Durch die Vielzahl an isolierten strukturverwandten Metaboliten im Rahmen dieser Arbeit konnte durch primär durchgeführte Screenings auf Zytotoxizität, Antibiose und HSP90 Inhibition folgendes Gesamtbild gewonnen werden:

Bezogen auf die Zytotoxizität gegenüber L5178Y-Zellen zeigten die Anthrachinonderivate, welche über einen hydrierten C-Ring verfügen und eine intakte Chinonstruktur besitzen, die höchste Aktivität, welche mit einer Verringerung des Hydroxylierungsgrades abnimmt, bis sie schließlich im Fall des Tetrahydroaltersolanols B und Methylalertanins völlig verschwindet. Interessanterweise zeigten die dimeren Anthrachinonderivate keine Aktivität, mit Ausnahme der Alterporriolderivat A/B und E. Dies ist umso erstaunlicher, da Alterporriol D, im Gegensatz zu seinem Atropisomer Alterporriol E keine Aktivität zeigte, obwohl beide Strukturen mit Ausnahme der Orientierung der Biarylachse identisch sind. Dies ist denkungsgleich mit den publizierten Ergebnissen von Debbab *et al.* (Debbab, *et al.*, 2009). Ähnliche Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität von Atropisomeren wurden auch für die Alterporriole G und H beschrieben, welche aus den Untereinheiten Altersolanol A und Macrosporin aufgebaut sind. In diesem Fall, zeigte das Alterporriol G eine deutlich stärkere zytotoxische Wirkung gegenüber der Zelllinie L5178Y (Debbab, *et al.*, 2012, Debbab, *et al.*, 2009).

Die Pentaketide Isoscleron und 4-Hydroxyscyclaton zeigten keine zytotoxische Aktivität, jedoch nahm die Wirkung durch die Dimerisierung zu Stemphyperylenol, Altertoxin I und Stemphytoxin II zu, wobei Stemphyperylenol die höchste und Altertoxin I die geringste Aktivität zeigte. Diese Wirkung kann durch das Entstehen von zwei vinylogenen Carbonsäuren bzw. durch die zusätzliche Bildung eines Epoxids erklärt werden, welche durch Licht induziert reaktive Sauerstoffspezies bilden können. Fehlt eines dieser Strukturmerkmale, wie z.B. bei Xanalteric Acid I, so entfällt die Wirkung völlig. Hieraus konnte abgeleitet werden, dass nicht allein die Größe der Struktur, sondern auch das simultane Vorliegen von mindestens zwei vinylogenen Carbonsäuren für die Wirkung essentiell sind.

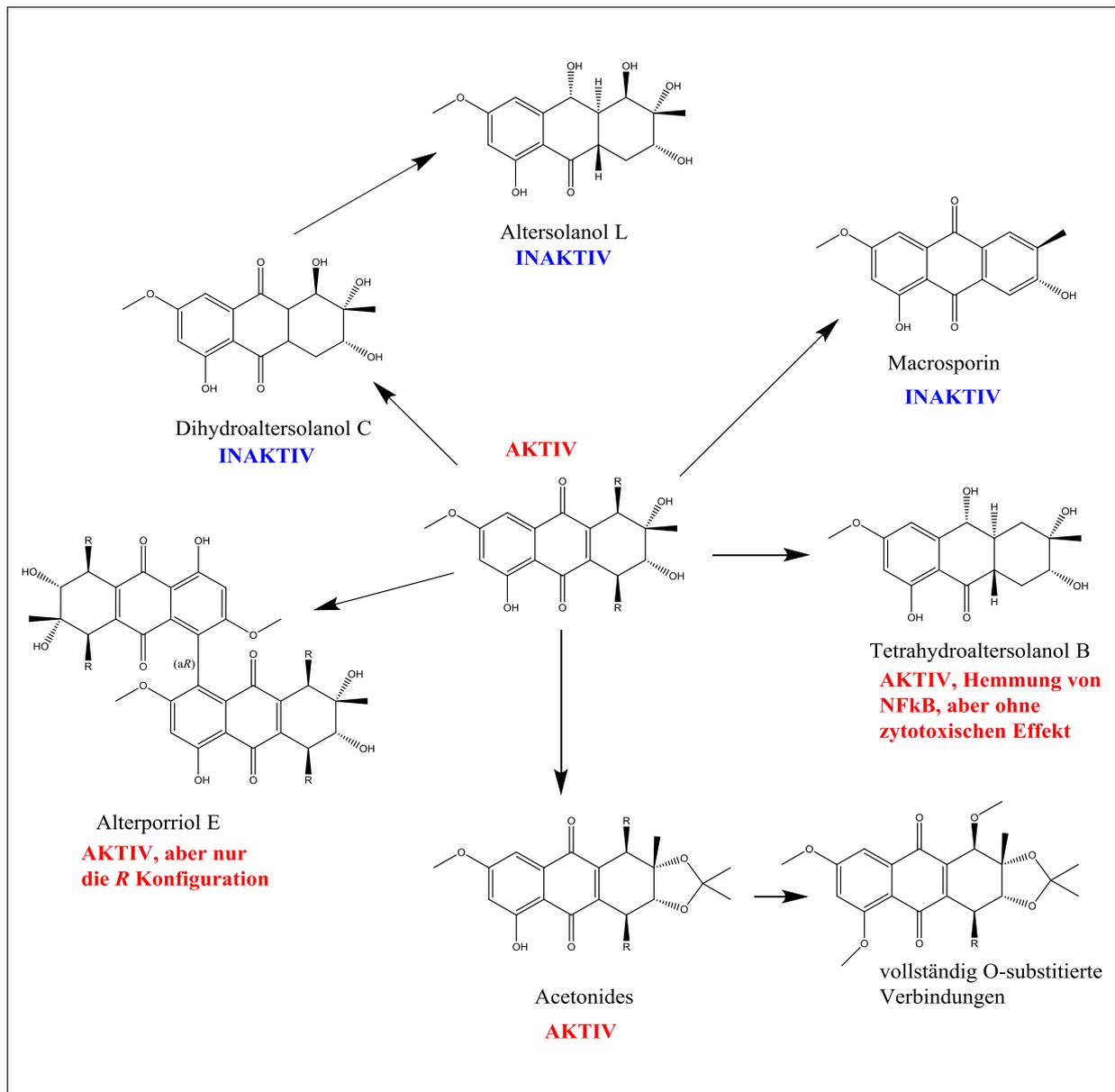
Im Rahmen dieser Arbeit konnten in Kooperation mit der AG von Dr. Marc Diederich diese elementaren Beobachtungen bezüglich der Bioaktivitäten von Altersolanolderivaten in einen klaren Zusammenhang gestellt werden, Wirkungsmechanismen aufgeklärt und eine Hypothese zur Strukturwirkungsbeziehung aufgestellt werden (s. Abb. 4.5). Die TNF $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B Inhibierung in K562-Zellen und die dadurch vermittelte Zytotoxizität konnte als Wirkmechanismus identifiziert werden und scheint wie auch bei der murinen Lymphomzelllinie,

L5178Y, von drei Faktoren abhängig zu sein: Zum einen zeigen die Verbindungen Altersolanol A und C eine höhere Aktivität als die hydrierten Derivate Dihydroaltersolanol B und C, was auf die Notwendigkeit der Chinonstruktur hinweist. Dies konnte durch den völligen Aktivitätsverlust von Tetrahydroaltersolanol B, welches über eine zweifach hydrierte Chinonstruktur verfügt, untermauert werden. Zum anderen scheint gleichzeitig der Cyclohexanring von entscheidender Bedeutung zu sein, da mit der Dehydrierung zum Macrosporin die Aktivität verloren geht. Vergleicht man die Aktivitäten von Altersolanol A und C untereinander, so kann hier als dritte Hypothese abgeleitet werden, dass der Hydroxylierungsgrad der Cyclohexanstruktur ebenfalls die Wirkung beeinflusst: Je höher der Hydroxylierungsgrad, desto größer die Aktivität. Altersolanol C zeigte im Vergleich zu Altersolanol A eine um ca. 40% verminderte Aktivität. Auch bezüglich der dimeren Verbindungen der Klasse der Alterporriole konnte eine Strukturwirkungsbeziehung gefunden werden. Aus der Gruppe Alterporriol A, B, D, E, N und P zeigte lediglich Alterporriol E eine TNF $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B Inhibierung, obgleich alle der genannten Verbindungen über mindestens eine Altersolanol A Untereinheit verfügen. Dies ließ in Kombination mit den Ergebnissen des primären Screenings an der Zelllinie L5178Y den Schluss zu, dass neben den oben genannten strukturellen Voraussetzungen auch die Konfiguration der Dimere eine essentielle Rolle spielt.

Um die Strukturwirkungsbeziehung zu festigen, wurden partialsynthetische Modifikationen von Altersolanol A und C zum Altersolanol A Acetonid und Altersolanol C Acetonid durchgeführt. Diese wurden weiter zu den vollständig *O*-methylierten Verbindungen umgesetzt, um den Einfluss der Hydroxylgruppen auf die Bioaktivität zu beweisen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die alkoholischen Hydroxylgruppen in Position 2 und 3 offensichtlich nicht von entscheidender Bedeutung sind, da eine Wachstumshemmung von rund 90% der L5178Y-Zellen bei 10  $\mu$ g/ml für beide Verbindungen detektiert wurde. Zieht man die Bioaktivitäten des Questins und Questinols hinzu, welche beide nicht über alkoholische, jedoch über phenolische Hydroxylgruppen verfügen, kann festgehalten werden, dass die alkoholische Hydroxylgruppe der Altersolanole in Position 1 essentiell für die Wirkung ist.

Betrachtet man im Vergleich die antibiotischen Wirkungen, so kann festgestellt werden, dass mit Ausnahme von Altersolanol A und C keine der Substanzen eine signifikante Wirkung auf die getesteten Mikroorganismen zeigte, wobei auch hier ausschließlich eine Wirkung gegen die Gram-positiven Bakterien *S. aureus* (inklusive MRSA), *S. pneumoniae* und *E. faecalis* zu beobachten war. Das verminderte Wirkspektrum gegenüber Gram-negativen Bakterien lässt sich durch die hohe Polarität der Substanzen begründen, welche vermutlich zu einer verminderten oder fehlenden Aufnahme in die Zellen führt. Die Acetonide des Altersolanol A und C zeigten trotz erhöhter Lipophilie keine veränderte Wirkung, was die Polarität als einzigen Grund für die fehlende Wirkung ausschließt. Denkbar wäre auch, dass ähnlich zum Budesonid eine Abspaltung der Acetonidgruppe durch CYP3A4 Enzyme erfolgt. Die dimeren Alterporriole, welche

zumindest aus einer Untereinheit der beiden Altersolanolderivate A und C aufgebaut sind, zeigten interessanterweise weder eine antibiotische, noch eine zytotoxische Wirkung. Berücksichtigt man jedoch die Lipinski „Rule of Five“, so ist festzuhalten, dass die Alterporriolderivate alle mehr als fünf Wasserstoffdonatoren besitzen und mehr als 500 g/mol wiegen, was sie als Arzneistoffe potentiell unbrauchbar macht.



**Abb.4.5:** Schema zu Strukturwirkungsbeziehungen von Altersolanolderivaten, bezogen auf die Kombination von Zytotoxizität und NFκB Inhibierung

### Biosynthese von Anthrachinonderivaten

Anthrachinone entstehen durch die Kopf-Schwanz-Reaktion der Einheiten Actelyl-CoA und Manoyl-CoA. Aus insgesamt sieben Einheiten Manoyl-CoA und einer Einheit Acetyl-CoA entsteht zunächst ein Oktaketid, an welchem die terminale Säurefunktion abgespalten wird (Dewick, 2011, Stoessl, *et al.*, 1983, Suemitsu, *et al.*, 1989a) (s. Abb. 4.6). In einem weiteren Schritt wird der Ringschluss durch Enolisierung und damit verbundene Wasserabspaltung vollzogen. Die zusätzliche *O*-Methylierung wird durch eine Methyltransferase eingeführt (Dewick, 2011, Threlfall, *et al.*, 1968).

Das so zunächst initial gebildete Altersolanol A wird vermutlich über unterschiedliche Biosynthesewege in die Derivate Altersolanol B, Altersolanol C und Macrosporin durch enzymatische Dehydrierung überführt (Stoessl and Unwin, 1979). Methylalaternin kann auf Basis dieser Beobachtungen als ein Zwischenprodukt in der biosynthetischen Modifizierung des Altersolanol A zum Macrosporin verstanden werden. Die Frage nach der Biogenese sechsfach hydrierter Verbindungen, wie beispielsweise Tetrahydroalterolanol B, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Sowohl die Möglichkeit, dass es sich hierbei um ein Zwischenprodukt auf dem Biosyntheseweg von Altersolanol B handelt, als auch, dass es sich um ein Produkt der biosynthetischen Modifizierung von diesem handelt, wird diskutiert (Stoessl and Stothers, 1983). Ähnlich kann die biosynthetische Verflechtung von Altersolanol C und Altersolanol L betrachtet werden. Die erstmals isolierten Verbindungen Dihydroalterolanol A – C könnten eine biosynthetische Schlüsselrolle darstellen: hier liegen die Kohlenstoffatome C-9 und C-10 zur Ketofunktion oxidiert vor, jedoch ist die Chinonpartialstruktur zwischen den Kohlenstoffen C-1a und C-4a hydriert. Zieht man die Biosynthese der Norsolorinsäure heran, welche aus *Aspergillus parasiticus* isoliert wurde, ist zu erkennen, dass der Ringschluss bei Polyketiden zunächst über die Ausbildung einer einfachen C-C Bindung, gefolgt von einer Dehydrierung zur Doppelbindung verlaufen kann (Crawford, *et al.*, 2009). Diese Beobachtung legt nahe, dass Tetrahydroalterolanol B, gefolgt vom Dihydroalterolanol B als Vorstufe des Altersolanol B zu fungiert. Die Acetylierung von Tetrahydroalterolanol B zum Tetrahydroalterolanol F stellt eine weitere biosynthetische Abwandlung dar. Eine Dimerisierung von Altersolanol A zu den Homodimeren Alterporriol D und E wird durch eine oxidative Kopplung zwischen den beiden Kohlenstoffen C-8 der Altersolanol A Untereinheiten vollzogen (Ohnishi, *et al.*, 1991). Die gleiche Beobachtung konnte auch bereits für Alterporriol A gemacht werden: hier kommt es zu einer oxidativen Kupplung der Untereinheiten Macrosporin und Altersolanol A zwischen den Kohlenstoffen C-4 und C-8 (Ohnishi, *et al.*, 1992). Dieser beschriebene Mechanismus kann auch auf das ebenfalls isolierte Heterodimer Alterporriol B übertragen werden, da es sich hierbei um das Atropisomer des Alterporriol A handelt (Debbab, *et al.*, 2009). Auf der Basis dieser Beobachtungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sowohl Alterporriol N als auch

Alterporriol P, aufgebaut aus den Untereinheiten Macrosporin und Altersolanol A, bzw. Altersolanol C, durch einen vergleichbaren Biosyntheseweg gebildet werden.

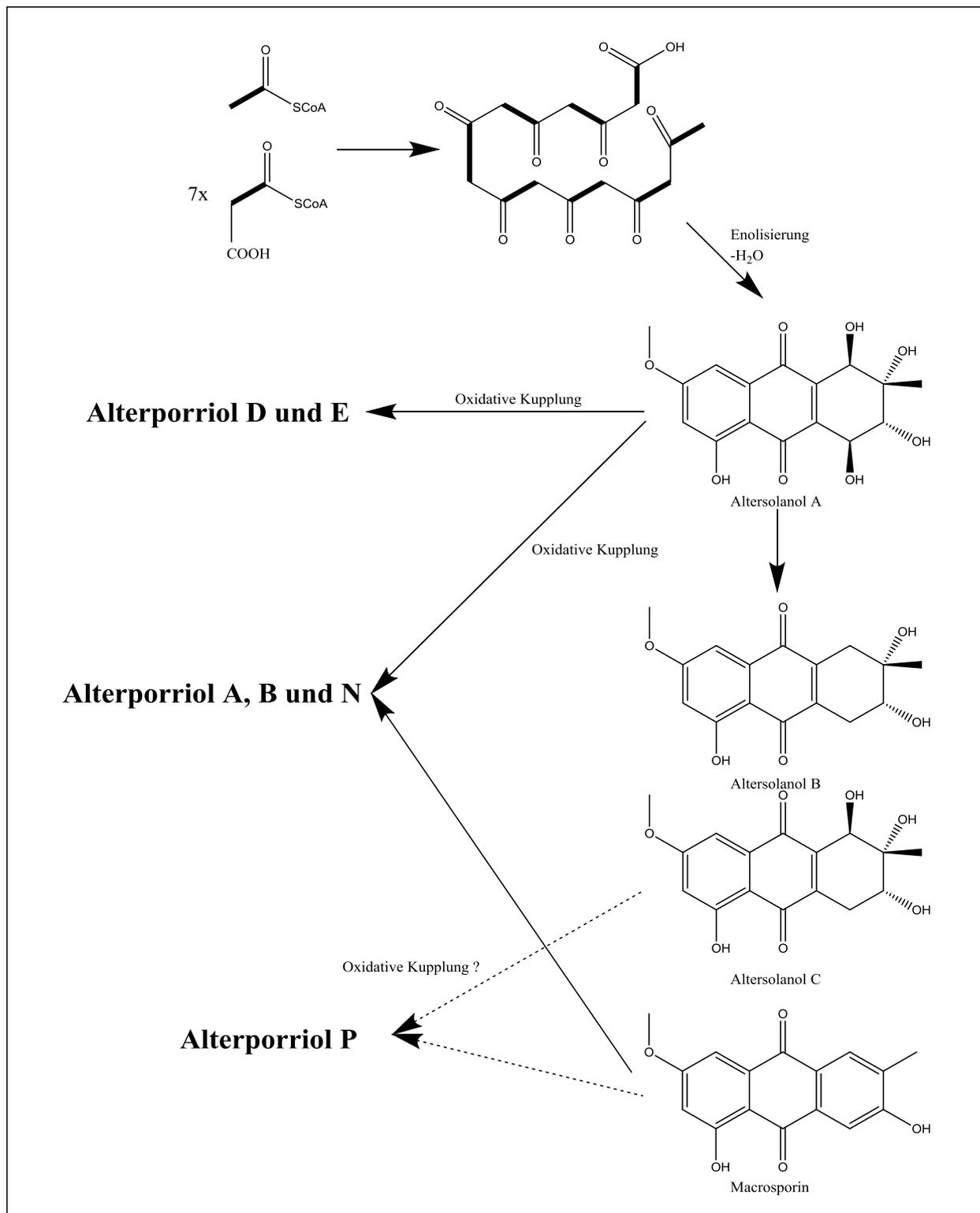
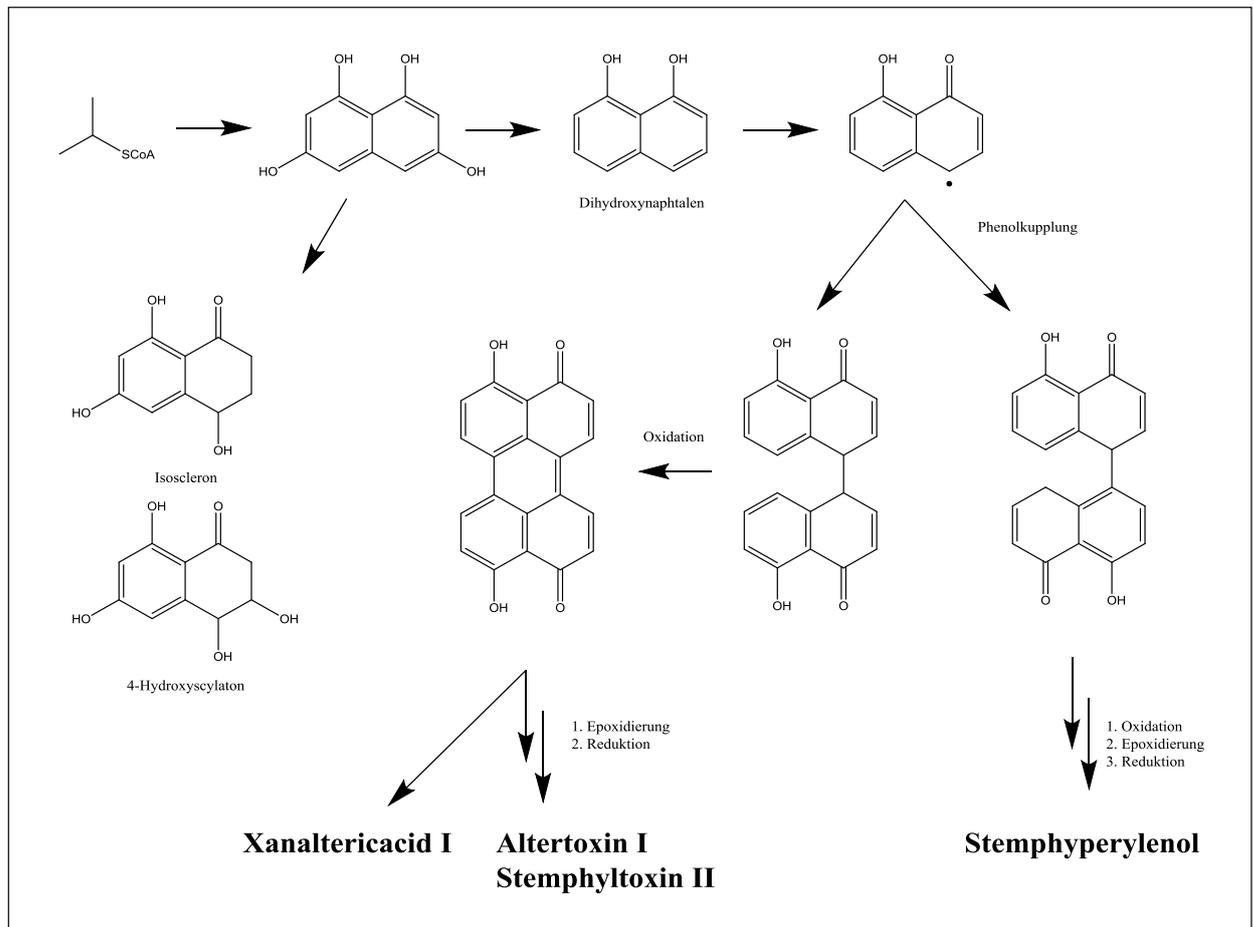


Abb. 4.5: Biosyntheseweg von Anthrachinonderivaten.

### **Biosynthese der reduzierten prenylierten Chinone**

Prenylierte Chinone, eine Substanzklasse, die häufig in *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp. und *Pleospora* sp. gefunden wird, werden aus einem aus Acetyl-CoA Einheiten aufgebauten Pentaketid gebildet, welches zunächst zu Tetralon zyklisiert (Okuno, *et al.*, 1983) (s. Abb. 4.6). Als weitere aus diesem Biosyntheseweg entstammende Verbindungen konnten Isoscleron und 4-Hydroxysclaton durch die Inkorporierung von radioaktiv markiertem Natriumacetat identifiziert werden (Sankawa, *et al.*, 1981). Durch ein intermediär entstehendes 1,8-Dihydroxynaphtalen kommt es zu einer oxidativen Phenolkopplung, welche in einer Kopf-Schwanz, oder Schwanz-Schwanz Reaktion ablaufen kann. Aus ersterem, der selteneren Variante, entsteht über weitere Epoxidierungs- und Reduktionsprozesse das Stemphyperyleneol. Aus der zweiten Reaktionsvariante, der Schwanz-Schwanz Reaktion, gehen die Stemphytoxine hervor, die ebenfalls weiter durch Epoxidierungs- und Reduktionsprozesse modifiziert werden (Arnone, *et al.*, 1986). 1,8-Dihydroxynaphtalen stellt neben dem Ausgangsprodukt zur Biosynthese der Stemphytoxine auch ein Zwischenprodukt zur Synthese von Melanin dar (Wheeler and Stipanovic, 1979). Eine mögliche biosynthetische Modifizierung des intermediär entstandenen Kopf-Kopf-Kondensationsproduktes ist die Bildung der Xanalteric Acid I, welche über eine Epoxidierung und Hydrierung, gefolgt von einer Ringöffnung, der Abspaltung von Methanol, erneutem Ringschluss und Hydrierung erfolgt. Dies wurde bereits von Kjer 2010 hypothetisch dargelegt (Kjer, 2010).



### Biosynthese von Orthosporin

Orthosporin, das zur Klasse der Isocoumarine gehört, wird im Gegensatz zu den Coumarinen nicht aus der Vorstufe Zimtsäure, sondern aus Acetyl-CoA Einheiten aufgebaut. Hierbei kommt es zum Schluss des Lactonringes durch eine Reaktion des endständigen Thioesters mit der Hydroxylgruppe der Startergruppe (Dewick, 2011). Die dort postulierte Biosynthese für 6-Hydroxymellein kann auf die Biosynthese von Orthosporin, unter der Annahme von sieben statt fünf Acetyl-CoA Einheiten und einer Oxidation durch NADPH an mehreren Positionen, übertragen werden (Kurosaki, 1995).

### **Biosynthese von Aloesol**

Die Biosynthese von Aloesol ist noch unbekannt, jedoch gibt es für andere Chromonderivate, wie das 5,7-Dihydroxy-2-methylchromon, 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon und Lathodoratin bestätigte Biosynthesewege. Daher sind zwei Biosynthesewege hypothetisch denkbar (s. Abb. 4.7). Die erste Möglichkeit besteht in der Umsetzung von fünf Malonyl-CoA Einheiten zu einem Pentaketid, welches in einem zweistufigen Prozess zyklisiert. Der zweite Schritt des Zyklisierungsprozesses wird durch eine Reaktion, welche der Michael-Addition ähnelt, über einen nukleophilen Angriff einer Hydroxylgruppe auf das Enol-Tautomer in Form einer Enolisierung durchgeführt. Das entstandene Produkt wird durch Dehydrierung in das Chromon überführt (Dewick, 2011, Sarkar, *et al.*, 1975). Dieses konnte durch die Inkorporierung von radioaktiven Acetat Einheiten bereits mehrfach bestätigt werden (Al-Douri and Dewick, 1988, Sarkar, *et al.*, 1975). Durch eine mögliche Modifizierung des Biosyntheseweges, ausgehend von sechs Malonyl-CoA Einheiten wäre durch den gleichen Zyklisierungsprozess, verbunden mit einer terminalen Decarboxylierung und Oxidierung der aliphatischen Ketogruppe, eine Darstellung des Aloesols denkbar.

Die zweite Möglichkeit zur Darstellung von Chromonen konnte in *Rheum palmatum* beobachtet werden. Chromone entstehen hier durch die Zusammenfügung einer Acetyl-CoA Einheit und sechs Einheiten Malonyl-CoA, was durch die Aleosonsynthese katalysiert wird (Abe, *et al.*, 2004). Dieses Enzym, eine Polyketidsynthase (PKS) der Klasse III, konnte in Pilzen selbst noch nicht identifiziert werden, jedoch sind zahlreiche PKS der gleichen Klassifizierung bekannt (Austin and Noel, 2003, Funa, *et al.*, 2007). Dies lässt die Hypothese zu, dass Aloesol auch über ein ähnliches pilzliches Enzym gebildet werden könnte, wobei es zu einer anschließenden Oxidation des Aloesons zu Aloesol kommen könnte.

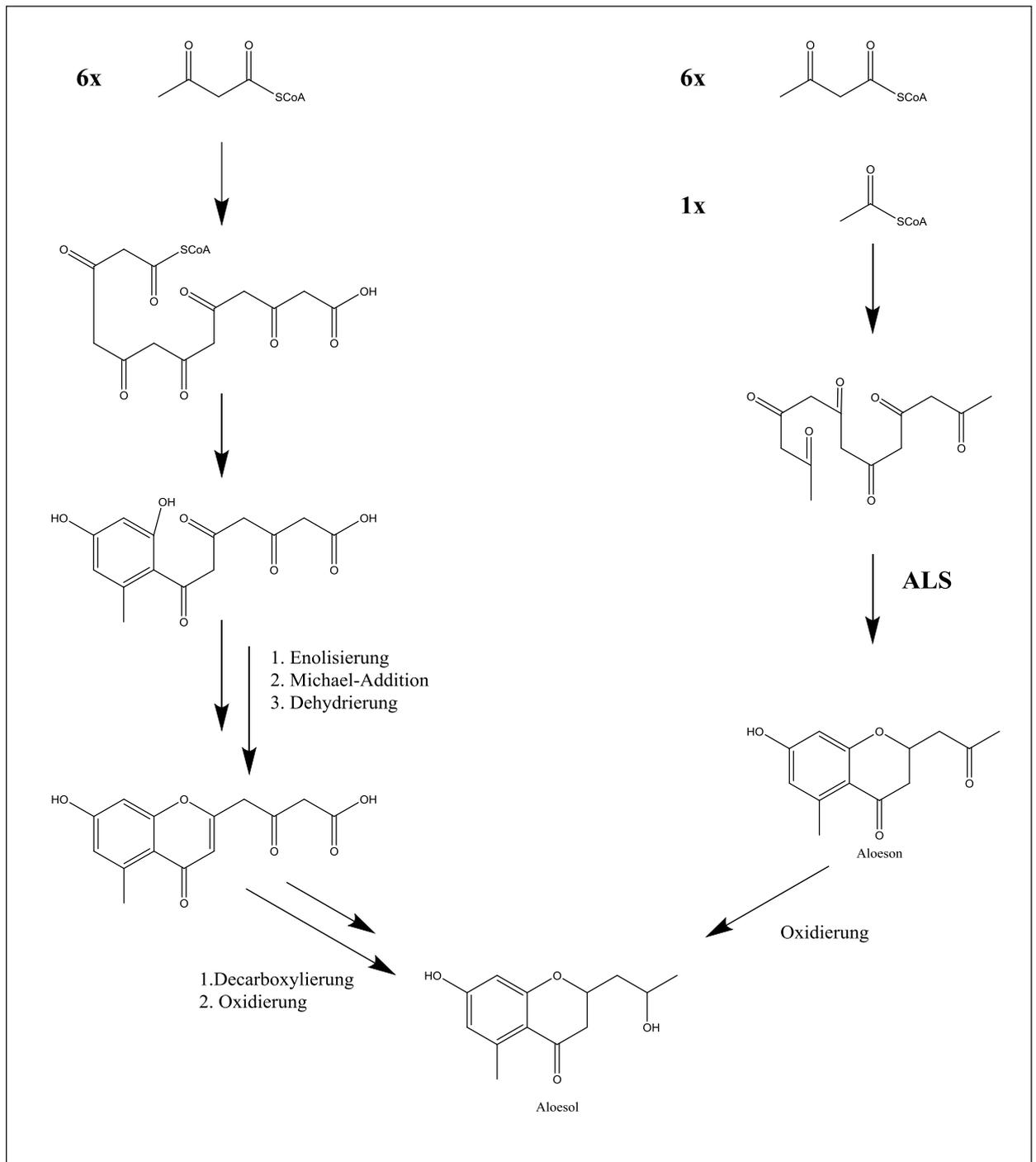
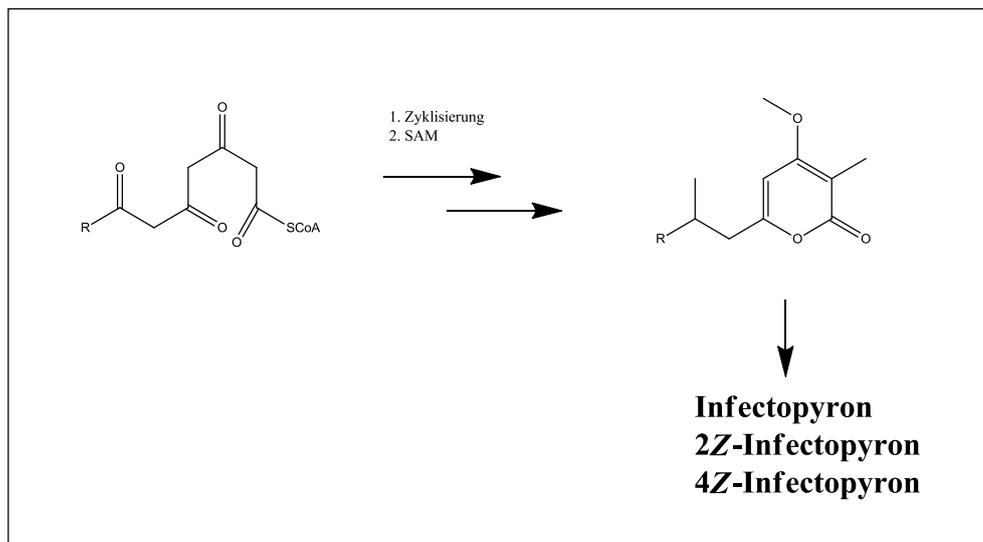


Abb. 4.7: Biosyntheseweg von Aloesol.

## Biosynthese von Pyronen

Pyrone werden wie auch andere Polyketide aus der Vorstufe  $\beta$ -Polyketosäure gebildet. Hierbei kommt es zum Schluss des Lactonrings durch die terminale Carboxylfunktion (s. Abb. 4.8). Diese Zyklisierungsreaktion steht neben den bereits beschriebenen Zyklisierungsmechanismen von Polyketosäuren vermutlich simultan zur Verfügung (Douglas and Money, 1967). Der Aufbau aus Acetateinheiten konnte durch Studien mit radioaktiv markierten Vorstufen bestätigt werden (Avent, *et al.*, 1992a, Avent, *et al.*, 1992b, Pedras and Chumala, 2005). Die Methylierung der aliphatischen Seitenkette, sowie die Methoxylierung der freien Hydroxylgruppe des Lactonringes erfolgt durch eine Methyltransferase aus SAM (Pedras and Chumala, 2005).



**Abb. 4.8:** Biosyntheseweg von Pyronen.

### 4.3 Isolierte Naturstoffe aus *Penicillium glabrum*

*Penicillium glabrum* wurde aus den Blüten von *Carpobrotus rossii* isoliert. Die Pflanze wurde am Wegesrand in Rabat, Marokko, nahe der *Bab el Oudaia* (alte Festungsanlage) gesammelt. Die Pflanze, welche auch als „pig face“ bekannt ist, hat ihren Verbreitungsschwerpunkt im afrikanischen und australischen Raum, wo deren Säfte seit Jahrhunderten als Heilmittel gegen gastrointestinale Beschwerden, Insektenstiche, Ekzeme, Quallenstiche, Spinnenbisse und offene Wunden genutzt werden (Martins, *et al.*, 2005, Springfield, *et al.*, 2003). Daneben wird die Pflanze als Nahrungsmittel verwendet, wodurch die Annahme entstand, dass die Pflanze ein großes antioxidatives Potential besitzt (Cane, *et al.*, 1979, Watson, 2007). Bisher wurden ausschließlich Flavonoidderivate der Pflanze, nach Verabreichen eines Pflanzenextraktes an Ratten, im Blut der Tiere detektiert (Lean, *et al.*, 2010).

Die Gattung *Penicillium* umfasst insgesamt rund 800 verschiedene Spezies und Subspezies mit einer großen Bandbreite an Sekundärmetaboliten. Hierunter fallen auch die pharmazeutisch relevanten Arzneistoffe Penicillin G (Morikawa, *et al.*, 1979) und Griseofulvin (Oxford, *et al.*, 1948). Neben den pharmazeutischen Anwendungsgebieten kommen Pilze der Gattung *Penicillium* auch in der Nahrungsmittelindustrie, beispielsweise in der Herstellung von Wurst (Díaz, *et al.*, 2002) und Käse (Kinsella, *et al.*, 1976) zum Einsatz. Insgesamt ist das Inhaltsstoffmuster von *Penicillium* sp. sehr vielfältig, jedoch wurden bisher aus der Gattung *Penicillium*, noch aus einer anderen Gattung, Flavonoidderivate isoliert. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Wirtspflanze *Carpobrotus rossii* eventuell dazu in der Lage ist, die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen zu produzieren, zumal das isolierte Desmethoxyyangonin eine große Ähnlichkeit zu den Kavalactonen aus *Piper methysticum* (Dharmaratne, *et al.*, 2002) zeigt. Insgesamt wurden sechs Verbindungen aus *Penicillium glabrum* isoliert: Das Styrylpyron Desmethoxyyangonin (**43**), die Biphenylether Asterricacid (**44**), Methylasterricacid (**45**), das Secoanthrachinon Sulochrin (**46**) und die Anthrachinone Questin (**47**) und Questinol (**48**).

Bisher wurde insbesondere Desmethoxyyangonin eingehend untersucht. So zeigte die Verabreichung von 30 mg/kg/d bei Küken einen stark ausgeprägten anxiolytischen Effekt, ähnlich dem des Chlorpromazins (Smith, *et al.*, 2001). Außerdem konnte eine Hemmung der Freisetzung von TNF $\alpha$  aus BALB/3T3-Zellen mit einem IC<sub>50</sub> Wert von 17  $\mu$ M beobachtet werden (Hashimoto, *et al.*, 2003). Neben dieser Inhibierung konnte im Rattenlebermodell eine signifikante Induktion von Cyp3A23 (Cytochrom P450 3A23) (Ma, *et al.*, 2004), ferner eine Inhibierung von P-Glykoprotein (P-gp) (Weiss, *et al.*, 2005) sowie ein Einfluss auf Entzündungsreaktionen (Chou, *et al.*, 2013) beobachtet werden. Jedoch konnten weder zytotoxische Effekte gegen HepG2-Zellen beobachtet werden (Nerurkar, *et al.*, 2004), noch eine Inhibierung der Alkoholdehydrogenase (ADH) (Anke, *et al.*, 2006). Asterricacid ist sowohl als Endothelin (ET-1) Inhibitor bekannt (Ohashi, *et al.*, 1992) als auch als Inhibitor über VEGF induzierten Gefäßbildung bei HUVEC-Zellen (Lee, *et al.*, 2002). Ebenfalls wurde ein schwach zytotoxischer Effekt gegen MCF-7-Zellen

beobachtet (Nicoletti, *et al.*, 2008). Auch für Methylastericacid wurde eine Inhibierung der VEGF induzierten Gefäßbildung beobachtet (Lee, *et al.*, 2002), sowie zytotoxische Effekte auf HepG2, HL-60 und MOLT-3-Zellen (Chomcheon, *et al.*, 2009). Sulochrin, das ein intermediäres Produkt in der Biosynthese zu Biphenylethern darstellt, zeigte ebenfalls eine Inhibition der VEGF induzierten Gefäßbildung (Lee, *et al.*, 2002) und ein breiteres zytotoxisches Potential gegenüber MCF-7 (Nicoletti, *et al.*, 2008), MD1-MB231, HL-60 und MOLT-3-Zellen (Chomcheon, *et al.*, 2009). Zudem konnte eine Hemmung der Degranulation von eosinophilen Granulozyten mit einem  $IC_{50}$  von 0,1  $\mu$ M detektiert werden (Ohashi, *et al.*, 1997). Mit Sulochrin behandelte Zellen zeigten außerdem eine Zunahme in der Expression von HSP70 (Hitze-Schock-Protein 70) (Smetanina, *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass Sulochrin die Einwanderung des Hepatitis C-Virus (HCV) in Leberzellen verhindern kann (Nakajima, *et al.*, 2013). Die beiden Anthrachinonderivate Questin und Questinol sind unterschiedlich gut untersucht. Für Questin sind schwach zytotoxische Effekte gegen HepG2, HL-60 und MOLT-3-Zellen (Chomcheon, *et al.*, 2009), schwache Radikalfängereigenschaften (Li, *et al.*, 2009) und eine fehlende Hemmung des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) beschrieben (Hyun, *et al.*, 2009). Eine Konzentration von 10  $\mu$ M führte *in vitro* an mesangialen Zellen zu einer Inhibition der Bildung von Kollagen IV und Fibronectin, sowie einer verminderten Bildung von IL-6 (Yang, *et al.*, 2013c). Für Questinol hingegen liegen keine Literaturwerte bezüglich Bioaktivitäten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die zytotoxischen Eigenschaften von Sulochrin gegenüber L5178Y Zellen mit einem  $IC_{50}$  Wert 17,2  $\mu$ M beobachtet werden. Jedoch konnten gegen die bovine BAEC Zelllinie keine apoptotischen Effekte nachgewiesen werden, obwohl für BAEC Zellen eine Signaltransduktion via VEGF beschrieben ist (Takahashi, *et al.*, 2001). Dieses steht in klarem Widerspruch zu dem in der Literatur genannten Effekt der VEGF Inhibierung. Eine mögliche Begründung für diesen Effekt könnte darin liegen, dass sowohl Sulochrin, als auch Asterricacid und Methylastericacid zu polar sind, um von den Zellen aufgenommen zu werden, wohingegen die Literaturwerte von einem zellfreien Assay ausgehen. Questin und Questinol zeigten beide eine schwache zytotoxische Aktivität gegenüber L5178Y Zellen, wobei die Wirkung von Questin stärker ausfiel. Dies deutet daraufhin, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe einen aktivitätssteigernden Effekt ausübt. Die Wirkung von Questinol wurde im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben.

### Biosynthese von Desmethoxyyangonin

Durch Fütterungsstudien mit  $^{14}\text{C}$  Acetat und  $^{14}\text{C}$  L-Phenylalanin konnte gezeigt werden, dass der biosynthetische Ursprung des Pyronteils auf zwei Acetateinheiten zurückzuführen ist und jener der Styryleinheit auf ein Phenylpropanoid (s. Abb. 4.9). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Substitution des Phenylrings des Styrylteils auf unterschiedliche Edukte wie Zimtsäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure und Tyrosin zurückgeführt werden (Perrin and Towers, 1973).

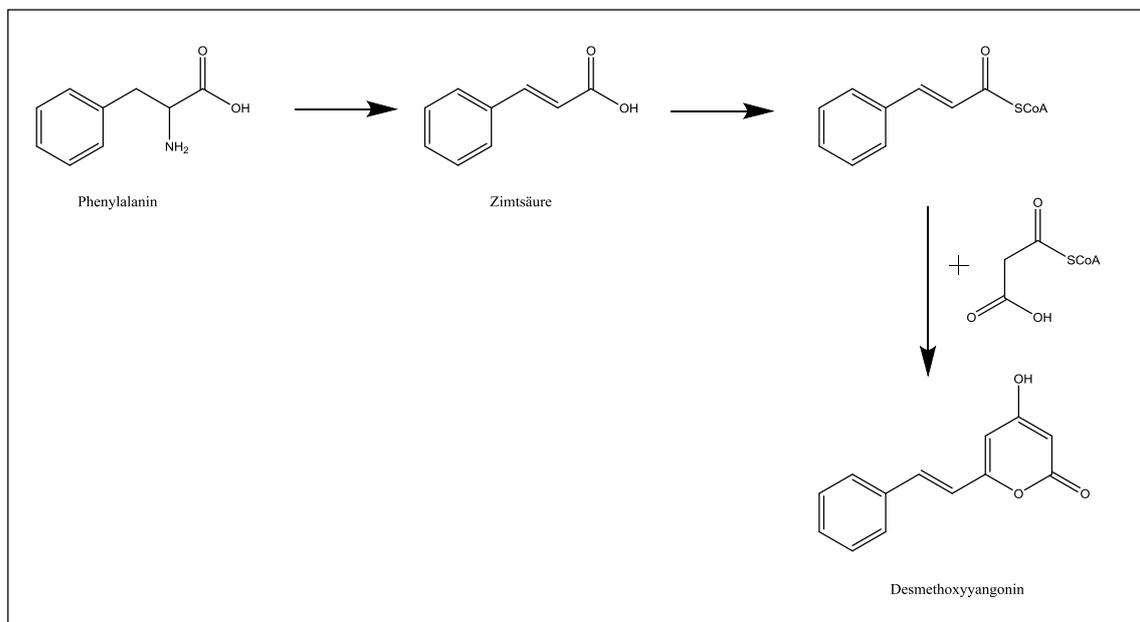


Abb. 4.9: Biosynthese von Styrylpyronen (Lee and Yun, 2011)

### Biosynthese von Diphenylethern und Secoanthrachinonen

Wie die Anthrachinone leiten sich auch die Biphenylether und die Secoanthrachinone nicht nur aus dem Polyketidstoffwechsel ab, sondern stellen vielmehr eine biosynthetische Modifizierung der Anthrachinone dar (s. Abb. 4.10). So kann ausgehend vom Emodin durch eine *O*-Methyltransferase das Questin dargestellt werden. In einem zweiten Schritt kommt es zunächst zur Ringöffnung, welche durch die Questin Oxygenase katalysiert wird. Es folgt eine Methylierung durch die Desmethylsulochrin *O*-Methyltransferase, wodurch Sulochrin entsteht. Über eine Oxidase kommt es zur Bildung der Spiroverbindung Geodin (Chen, *et al.*, 1995, Huang, *et al.*, 1995), das in Asterricacid und Methylasterricacid umgelagert werden kann (Park, *et al.*, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen stellen damit die meisten der biosynthetischen Zwischenstufen dar. Lediglich die Spiroverbindung konnte nicht isoliert werden.

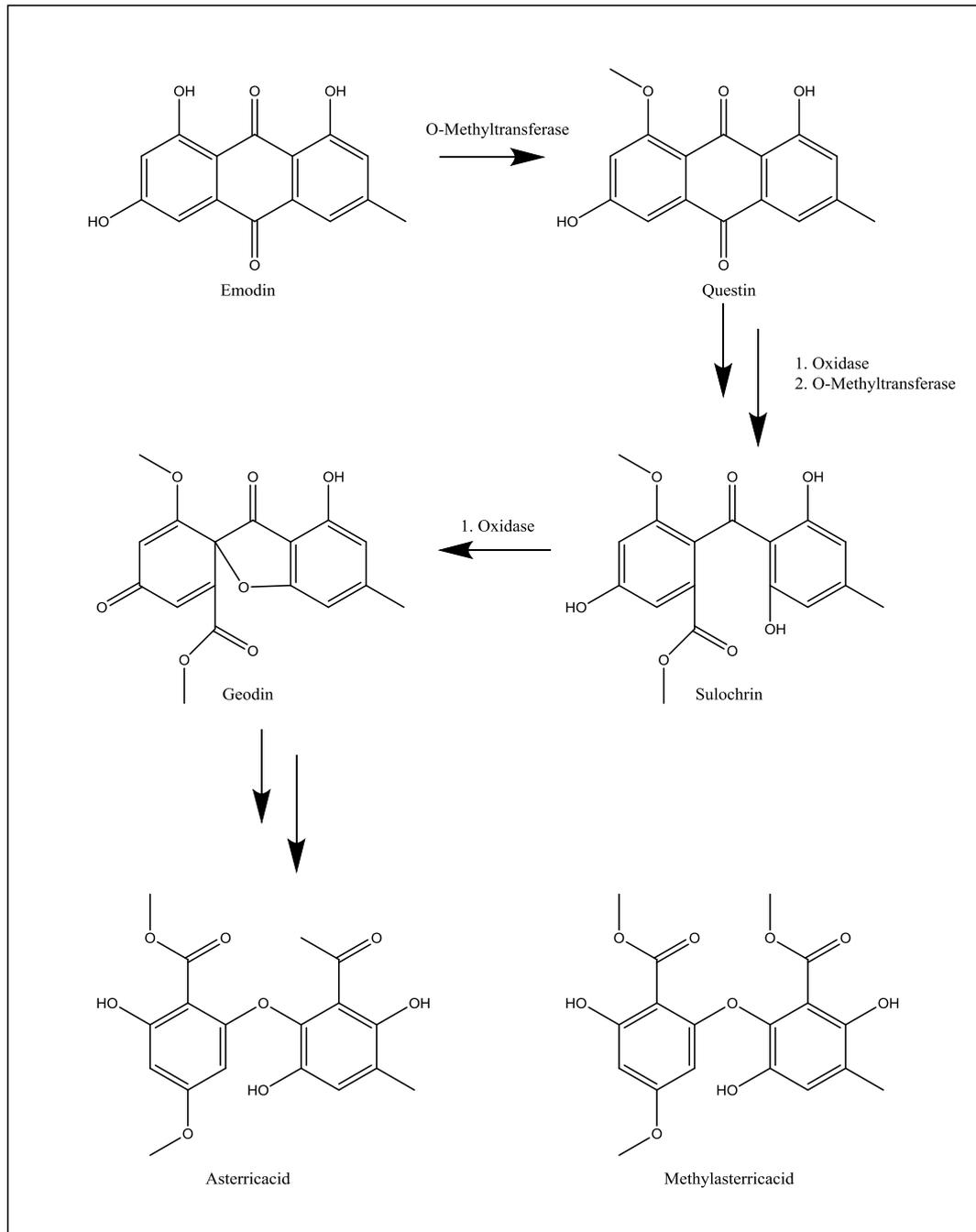


Abb.4.10: Biosyntheseweg von Biphenylethern und Secoanthrachinonen.

#### 4.4 Isolierte Naturstoffe aus *Nigrospora sphaerica*

*Nigrospora sphaerica* wurde aus *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* isoliert. Die Rinde der Mangrovenpflanze, welche in Hainan in China gesammelt wurde, wurde ursprünglich volksmedizinisch zur Behandlung von Tumorerkrankungen verwendet (Loder, *et al.*, 1966). Bisher wurden aus der Pflanze Verbindungen wie Sexangulasäure (Li, *et al.*, 2010), Rhynco-side A-F (Bao, *et al.*, 2007), Lupeol, Lupeon, Taraxeron,  $\beta$ -Amyrilpalmitat, Squalen,  $\beta$ -Sitosterol, Daucosterol,  $7\alpha$ -Hydroxysitosterol (Bao and Lin, 2006), 17-Hydroxy-16-oxobeyeran-19-al, 16,17-Dihydroxy-ent-kaur-9(11)-en-19-al, Methyl-16,17-dihydroxy-ent-kaur-9(11)-en-19-oat, Methyl-(16*R*)-13,17-epoxy-16-hydroxy-ent-kaur-9(11)-en-19-oat, Ceriopsin F, (1 *$\beta$* ,15*R*)-ent-pimar-8(14)-en-1,15,16-Triol, Brugierol, Isobrugierol, 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon (Bao, *et al.*, 2005) und Tropin-1,2-dithiolan-3-carboxylat (Loder, *et al.*, 1966) isoliert. Die volksmedizinische Anwendung konnte durch die *in vitro* Aktivität des Tropinalkaloids Tropin-1,2-dithiolan-3-carboxylat gegen Lungenzellkarzinomzellen bestätigt werden (Loder, *et al.*, 1966).

Aus dem Pilz *Nigrospora sphaerica* wurden bisher die Verbindungen (+)-(2*S*,3*S*,4*aS*)-Altenuen, (-)-(2*S*,3*S*,4*aR*)-Isoaltenuen, (-)-(2*R*,3*R*,4*aR*)-Altenuen, (+)-(2*R*,3*R*,4*aS*)-Isoaltenuen, 5'-Methoxy-6-methyl-biphenyl-3,4,3'-triol, Alternariol, Alternariol-9-methylether, 4-Hydroxyalternariol-9-methylether (He, *et al.*, 2012), Griseofulvin, Dechlorgriseofulvin, 8-Dihydramulosin, Mellein (Zhao, *et al.*, 2012), Aphidicolin (Lopes, *et al.*, 2011), 1-(5-Oxotetrahydrofuran-2-yl)-ethyl-2-phenylacetate, 3-Hydroxybutan-2-yl-2-hydroxy-3-phenylpropanoat (Zhang, *et al.*, 2009c), Phomalacton (Kim, *et al.*, 2001), Nigrosporolid (Harwooda, *et al.*, 1995) und Epoxyexserohilon (Cutler, *et al.*, 1991) isoliert. Es zeigt sich, dass es keine Überschneidung von pflanzlichen und pilzlichen Metaboliten gibt.

Während dieser Arbeit konnten vier Verbindungen, welche aus dem Polyketidstoffwechsel stammen, isoliert werden. Hierbei handelte es sich um Griseofulvin (**49**), Dechlorgriseofulvin (**50**), Griseophenon B (**51**) und Griseophenon C (**52**).

Griseofulvin, welches erstmal aus *Penicillium griseofulvum* isoliert wurde, wurde in der Literatur bereits als zytotoxisch beschrieben. So wurde gezeigt, dass Griseofulvin über eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B zu einem Zellzyklusarrest und Apoptose in HL-60 Zellen führen kann (Uen, *et al.*, 2007), sowie zu einer Hemmung des Zentromer Clusterings in entarteten Zellen führt, jedoch nicht in gesunden Zellen mit normalem Zentromergehalt (Rebacz, *et al.*, 2007). Dechlorgriseofulvin zeigte bisher nur schwache antifungale Eigenschaften (Zhao, *et al.*, 2012), wohin gegen es einen stärkeren keimungshemmenden Effekt auf Kopfsalat besitzt als Griseofulvin (Kimura, *et al.*, 1992). Für die beiden intermediären Stoffwechselprodukte Griseophenon B und C sind bisher noch keine biologischen Wirkungen publiziert.

Keine der isolierten Verbindungen zeigte antibiotische Eigenschaften, jedoch zeigte das Griseofulvin einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt gegen L5178Y Zellen. Die drei übrigen Verbindungen zeigten diesen Effekt nicht. Dies ist umso erstaunlicher, da das Dechlorogriseofulvin sich nur durch das Fehlen des Chloratoms vom Griseofulvin unterscheidet.

### **Biosynthese der Griseofulvinderivate**

Alle Griseofulvinderivate entstammen dem Polyketidstoffwechsel. Als Substrat dient die Heptaessigsäure, welche durch eine Aldol-Zyklisierung, Methylierung, Dehydrierung und eine Claisen Zyklisierung zunächst in Griseophenon C umgesetzt wird (s. Abb. 4.11). Darauf aufbauend kommt es zunächst zu einer weiteren Methylierung, gefolgt von einer oxidativen Kopplung der Phenylstrukturen, so dass es zur Ausbildung des Grisankörpers kommt. Das gebildete Dehydrodechlorogriseofulvin wird schließlich in einem letzten Schritt zum Dechlorogriseofulvin hydriert (Harris, *et al.*, 1976). Durch Halogenasen wird Griseophenon C zu Griseophenon B umgesetzt und unter gleicher biosynthetischer Modifikation wie Griseophenon C zum Griseofulvin umgelagert (Cacho, *et al.*, 2013). Für die quantitative Umsetzung von Griseophenon C zu B scheint die Konzentration an Chloridionen im Nährmedium der limitierende Faktor zu sein (Yu, *et al.*, 2002).

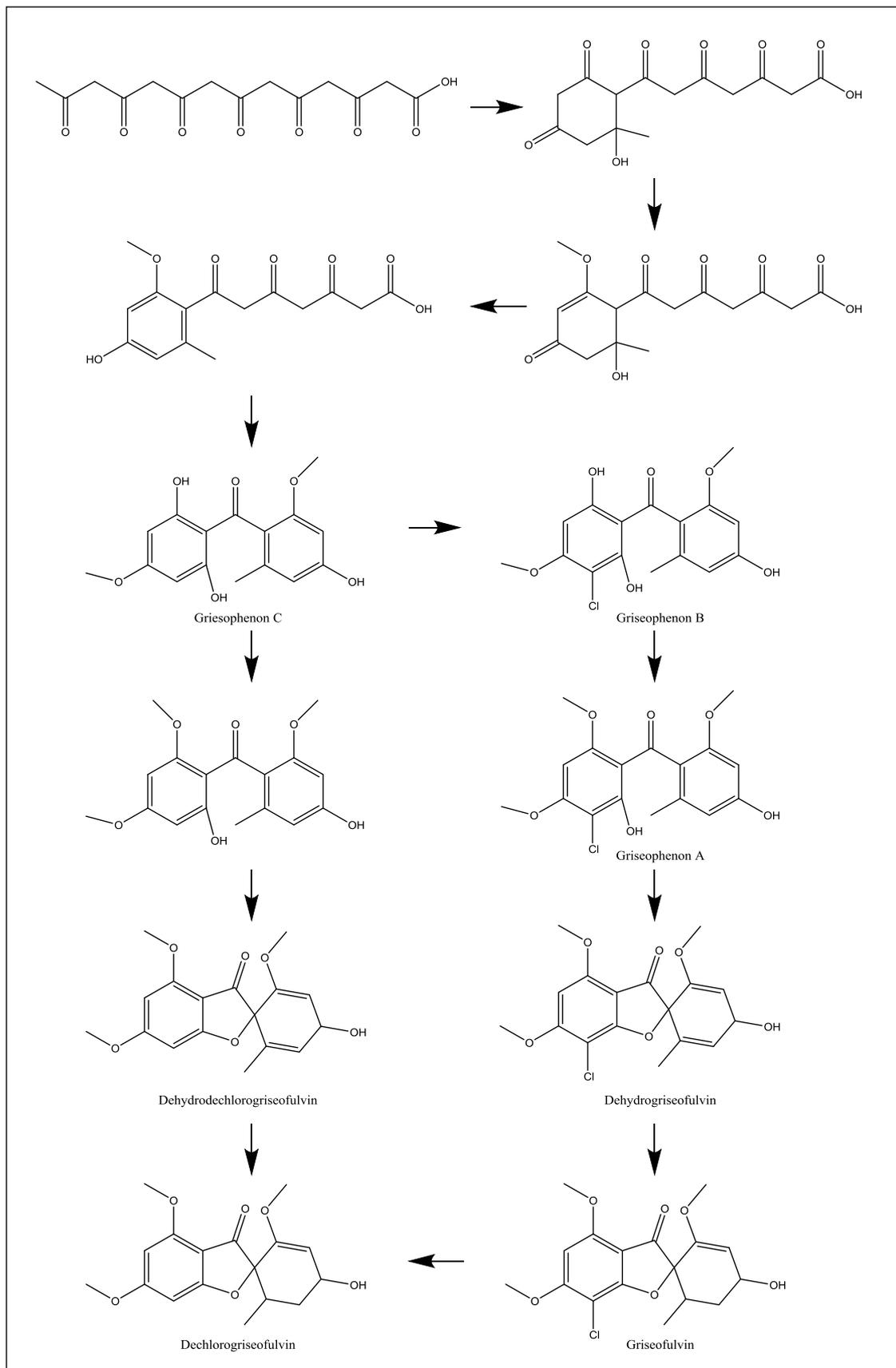


Abb. 4.11: Biosyntheseweg von Griseofulvinderivaten.

### 4.5 Isolierte Naturstoffe aus *Fusarium lateritium*

Wie auch *Nigrospora sphaerica*, wurde *Fusarium lateritium* aus *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala* isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde ebenfalls in Hainan in China gesammelt.

Aus *Fusarium lateritium* wurden bisher Lateropyron (Bushnell, *et al.*, 1984), 2-(1-hydroxyethyl)-4(3N)-Quinazolinon, 2-Acetyl-4(3H)-quinazolinon und die Enniatine B, B<sub>1</sub> und A<sub>1</sub> (Tsantrizos, *et al.*, 1994) isoliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Verbindungen aus *Fusarium lateritium* isoliert werden: das Chromonderivat 7-Hydroxy-2-[(2*S*)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4*H*-1-benzopyran-4-on ((-)-Aloesol) (**53**), und das Anthrachinon Acylmacrosporin (**54**).

Acylmacrosporin zeigte gegenüber dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus* einen MHK von 32 µg/mL, jedoch keinen zytotoxischen Effekt gegenüber L5178Y-Zellen. Dieser selektive Effekt ist dem des Macrosporins genau entgegengesetzt und zeigt, dass eine kleine Änderung des Moleküls, zu einer großen Änderung in der Wirkung führen kann.

### Biosynthese von Acylmacrosporin

Die Biosynthese von Acylmacrosporin wurde bisher noch nicht untersucht, jedoch kann auf der Basis des Polyketidstoffwechsels, welcher zur Bildung von Endocrocin und Macrosporin führt, die Hypothese aufgestellt werden, dass als biosynthetische Vorstufe ein Octaketid dienen könnte. Durch eine Aldolkondensation könnte es auch hier zum Ringschluss kommen. Die Vergrößerung des Grundkörpers um eine C1-Einheit kann, wie auch bei anderen pilzlichen Polyketiden durch eine Methyltransferase aus SAM erklärt werden. Die Alternative des Einbaus von einer Einheit Propionyl-CoA, anstelle von Acetyl-CoA, erscheint unwahrscheinlicher, da Propionyl-CoA einen inhibierenden Effekt auf den Polyketidstoffwechsel hat (Zhang, *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite wird über Entgiftungsreaktionen von Propionyl-CoA durch die Übertragung von SCoA auf eine Acetateinheit diskutiert (Brock and Buckel, 2004). Die Einbindung in die Biosynthese würde ebenfalls zu einem Abbau der Propionyl-CoA Einheiten und somit zu einer Entgiftung führen. Betrachtet man zusätzlich die Biosynthese von Anthrazyklinen und Derivaten, so zeigt sich auch hier, dass aliphatische Seitenketten durch Propionyl-CoA oder langkettige Verbindungen gebildet werden können (Dewick, 2011). Die Produktion von Anthrazyklinen ist zwar weitverbreitet unter Streptomyceten (Grein, 1987), jedoch gibt es auch Beispiele für anthrazyklinproduzierende Pilze (Shigemori, *et al.*, 1999). Daher kann der biosynthetische Ursprung ohne eine Isotopenanalyse nicht eindeutig geklärt werden.

## **5. Schlussfolgerung**

Endophyten haben in der Vergangenheit bereits eindrucksvoll präsentiert, dass sie ein großes Potential als Produzenten von chemisch heterogenen und bioaktiven Naturstoffen besitzen. Auch in dieser Studie konnte dieses Potential erneut gezeigt werden. Insgesamt konnten fünfzig sekundäre Stoffwechselmetabolite aus fünf endophytischen Pilzen isoliert werden. Strukturell betrachtet, zeichneten sich diese Strukturen durch eine hohe chemische Diversität aus. Der Literaturvergleich mit bereits isolierten Naturstoffen aus der jeweiligen Wirtspflanze zeigte, dass die in dieser Studie gewählten Endophyten ein von ihrer Wirtspflanze abgesetztes und diverses Inhaltstoffmuster produzieren. Durch die systematische Untersuchung der Bioaktivitäten, unter Berücksichtigung des zytotoxischen und antibiotischen Potentials, konnten insgesamt elf aktive Naturstoffe identifiziert werden. Vier von diesen, Alterporriol P, Stemphyperylenol, Sulochrin und Griesofulvin zeigten einen selektiven zytotoxischen Effekt, drei weitere, das Methylalaternin, Protocatechualdehyd und Acylmacrosporin einen selektiven antibakteriellen Effekt. Hinzu kamen die vier Verbindungen Phenyllessigsäure, Altersolanol A, Altersolanol C und Alterporriol A/B, die beide Effekte zeigten. Dieses ließ sich auch auf die semisynthetischen Produkte Altersolanol A- und C-Acetonid übertragen. Die Hypothese, dass endophytische Sekundärmetabolite der Wirtspflanze als Abwehrstoffe dienen, konnte somit bekräftigt werden. Auf der anderen Seite darf nicht aus den Augen verloren werden, dass einige der Stoffe, insbesondere aus der Gruppe der Altersolanole, eine hohe Toxizität aufweisen, welche sie zu potentiellen Mediatoren der pilzlichen Pathogenität macht. Auch die isolierten dimeren vinylogenen Carbonsäuren Stemphyperylenol, Altertoxin I und Stemphytoxin II können aufgrund ihrer Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies zu bilden als solche gesehen werden. Aber auch hier muss das Gegenteilige in Erwägung gezogen werden, nämlich, dass reaktive Sauerstoffspezies mögliche Krankheitserreger der Pflanze abtöten können. Da für viele der Verbindungen noch keine Bioaktivitäten publiziert sind oder die Wirkungsmechanismen noch nicht aufgeklärt wurden, lässt sich diese Frage nicht eindeutig beantworten. Um dies zu klären, ist es in Zukunft wichtig, die hier isolierten Substanzen systematisch auch auf ihr phytotoxisches Potential hin zu untersuchen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Altersolanol C, Dihydroaltersolanol B, Dihydroaltersolanol C und Alterporriol E spezifisch über eine Inhibierung von NFκB ihre Zytotoxizität vermitteln. Darüber hinaus verdeutlichten die vorliegenden Ergebnisse, dass auch Substanzen wie das Tetrahydroaltersolanol B, die in zellulären Assays kein positives Resultat zeigen, nicht zwingend effektfrei sind. Dies verdeutlicht, dass bedingt durch die Wahl des Assays und der Gesamtausbeute der Substanz möglicherweise entscheidende Details nicht beobachtet werden können. Daher sollte auf Basis bekannter Bioaktivitätsdaten immer sorgfältig nach einem geeigneten Testsystem gesucht werden und mögliche Neuerung der Assaysysteme berücksichtigt werden.

## Schlussfolgerung

---

Ebenfalls konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass spezielle Verbindungsklassen in bestimmten Organismen zu finden sind; so konnten Indolderivate gehäuft aus *Rhizoctonia* sp. und Anthrachinonderivate vermehrt aus *Pleospora* sp. isoliert werden. Außerdem konnten durch die Isolierung von Intermediaten aus Extrakten von *Rhizoctonia*, *Pleospora* sp., *Penicillium glabrum* und *Nigrospora sphaerica* die Biosynthesewege der Hauptmetabolite klar dargestellt werden. Dies ermöglichte zudem im Fall der Altersolanolderivate, Zwischenprodukte hypothetisch in die Stoffwechselwege einzufügen.

Die hohe Redundanz der hier isolierten Verbindungen mit denen bereits in der Literatur beschriebenen Verbindungen zeigt, dass die Suche nach neuartigen Verbindungen einer Suche nach der Nadel im Heuhaufen gleicht. Um in Zukunft das biosynthetische Potential endophytischer Pilze und damit die Wahrscheinlichkeit neue bioaktive Substanzen zu entdecken, zu erhöhen, wäre es beispielsweise denkbar Fermentationsbedingung zu verändern. Eine der vielversprechendsten Möglichkeiten hierfür ist die Co-Kultivierung mehrerer Mikroorganismen oder eine chemisch vermittelte Stressinduktion. Die Simulation des natürlichen Habitats wäre dabei die hypothetisch denkbar beste Möglichkeit zur Aktivierung stiller Biosynthesewege. Eine vorherige molekularbiologische Untersuchung des Genoms zur Identifizierung möglicher biosynthetischer Enzyme könnte darüber hinaus eine Möglichkeit darstellen, vielversprechende Kandidaten vorzuselektieren. Alternativ wäre auch eine metabolomische Analyse des pilzlichen Extraktes und der damit verbundenen Identifizierung von Biosynthesewegen eine gute Möglichkeit der Vorselektion.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdou, R.; Scherlach, K.; Dahse, H. M.; Sattler, I.; Hertweck, C., Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* **2010**, *71* (1), 110-116.
2. Abe, I.; Utsumi, Y.; Oguro, S.; Noguchi, H., The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. *FEBS Lett.* **2004**, *562* (1), 171-176.
3. Abraham, E. P., The cephalosporins. *Pharmacol. Rev.* **1962**, *14* (4), 473-500.
4. Al-Douri, N. A.; Dewick, P. M., Biosynthesis of the 3-ethylchromone phytoalexin lathodoratin in *Lathyrus odoratus*. *Phytochemistry* **1988**, *27* (3), 775-783.
5. Alberts, A. W., Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American Journal of Cardiology* **1988**, *62* (15), 10J.
6. Aly, A.; Edrada Ebel, R.; Wray, V.; Müller, W. E. G.; Kozytska, S.; Hentschel, U.; Proksch, P.; Ebel, R., Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* **2008**, *69* (8), 1716-1725.
7. Aly, A.; Debbab, A.; Edrada-Ebel, R.; Müller, W. E. G.; Kubbutat, M. H. G.; Wray, V.; Ebel, R.; Proksch, P., Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. *Mycosphere* **2010**, *1* (2), 153-162.
8. Aly, A. H.; Debbab, A.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Müller, W. E. G.; Lin, W.; Ebel, R.; Proksch, P., A new tetrahydrofuran derivative from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. isolated from *Otanthus maritimus*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of biosciences* **2009**, *64* (5), 350-354.
9. Andersen, B.; Hollensted, M., Metabolite production by different *Ulocladium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126* (1-2), 172-179.
10. Andersen, B.; Solfrizzo, M.; Visconti, A., Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. *Micol. Res.* **1995**, *99* (6), 672-676.
11. Andersen, B.; Dongo, A.; Pryor, B. M., Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Micol. Res.* **2008**, *112* (2), 241-250.
12. Andersen, B.; Andersen, J. L.; Sørensen, K.; Nielsen, B.; van den Ende, S.; de Hoog, B., A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46* (9), 642-656.
13. Anke, J.; Fu, S.; Ramzan, I., Kavalactones fail to inhibit alcohol dehydrogenase in vitro. *Phytomedicine* **2006**, *13* (3), 192-195.
14. Aoki, H.; Sassa, T.; Tamura, T., Phytotoxic metabolites of *Rhizoctonia solani*. *Letters to Nature* **1963**, *200* (4906), 575-575.
15. Arai, K.; Aoki, Y.; Yamamoto, Y., Asperinines A and B, dimeric tetrahydroanthracene derivatives from *Aspergillus ruber*. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37* (3), 621-625.
16. Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kyllö, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E. A., Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (26), 15649-15654.
17. Arnone, A.; Nasini, G.; Merlini, L.; Assante, G., Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphytoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *lactucum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 525-530.
18. Assante, G.; Nasini, G., Identity of the phytotoxin stemphylin from *Stemphylium botryosum* with altersolanol A. *Phytochemistry* **1987**, *26* (3), 703-705.
19. Austin, M. B.; Noel, J. P., The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 79-110.
20. Avent, A.; Avent, J. R.; Hanson, A.; Truneh, A., The biosynthesis of nectriapyrone and vermopyrone. *Phytochemistry* **1992a**, *31* (10), 3447-3449.
21. Avent, A. G.; Hanson, J. R.; Truneh, A., Two pyrones from *Gliocladium vermoesenii*. *Phytochemistry* **1992b**, *31* (3), 1065-1066.
22. Ayer, W.; Ayer, L. S.; Trifonov, W., Phenolic and polyketide metabolites of the aspen blue stain fungus *Ophiostoma crassivaginata*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (2), 371-372.

23. Ayer, W.; Ayer, L. S.; Trifonov, L.; Hutchison, P.; Chakravarty, W., Metabolites from a wood-inhabiting cup fungus, *Urnula craterium*. *Nat. Prod. Lett.* **2000**, *14* (6), 405-410.
24. Ayer, W. A.; Trifonov, L. S., Aromatic compounds from liquid cultures of *Lactarius deliciosus*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (6), 839-841.
25. Back, K., Hydroxycinnamic acid amides and their possible utilization for enhancing agronomic traits. *The Plant Pathology Journal* **2001**, *17* (3), 123-127.
26. Bacon, C. W., Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agric., Ecosyst. Environ.* **1993**, *44* (1), 123-141.
27. Bailey, B. A.; Bae, H.; Strem, M. D.; Roberts, D. P.; Thomas, S. E.; Crozier, J.; Samuels, G. J.; Choi, I.-Y.; Holmes, K. A., Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* **2006**, *224* (6), 1449-1464.
28. Baker, K. F., Types of Rhizoctonia diseases and their occurrence. *Rhizoctonia solani* **1970**, 125-148.
29. Bandurski, R. S.; Schulze, A., Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol.* **1977**, *60* (2), 211-213.
30. Bao, S.; Lin, W., Compounds from marine mangrove plant *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala*. *中国中药杂志* **2006**, *31* (14), 1168-1171.
31. Bao, S.; Deng, Z.; Fu, H.; Proksch, P.; Lin, W., Diterpenes and disulfides from the marine mangrove plant *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala*. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88* (10), 2757-2763.
32. Bao, S.; Ding, Y.; Deng, Z.; Proksch, P.; Lin, W., Rhyncosides A—F, phenolic constituents from the Chinese mangrove plant *Bruguiera sexangula* var. *rhynchopetala*. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55* (8), 1175-1180.
33. Bara, R.; Zerfass, I.; Aly, A. H.; Goldbach-Gecke, H.; Raghavan, V.; Sass, P.; Mándi, A.; Wray, V.; Polavarapu, P. L.; Pretsch, A.; Lin, W.; Kurtán, T.; Brötz-Oesterhelt, H.; Proksch, P., Atropisomeric dihydroanthracenones as inhibitors of multiresistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (8), 3257-3272.
34. Barker, J. L.; Frost, J. W., Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *76* (4), 376-390.
35. Bartel, B., Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1997**, *48* (1), 51-66.
36. Barthe, P., Synthesis of indoles by *Taphrina cerasi* and *T. epiphylla* in the presence of tryptophan. *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles* **1968**, *267* (16), 1283.
37. Bartz, F. E.; Bartz, N. J.; Glassbrook, D. A.; Danehower, M. A.; Cubeta, F., Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3. *Mycologia* **2012**, *104* (4), 793-803.
38. Bashyal, B. P.; Wijeratne, E. M. K.; Faeth, S. H.; Gunatilaka, A. A. L., Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran Desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (5), 724-728.
39. Bbauns, F. E., *Chemistry of lignin*. Academic Press Inc.: New York, **1952**; p 808.
40. Becker, A. M.; Rickards, R. W.; Schmalzl, K. J.; Yick, H. C., Metabolites of *Dactylaria lutea*. The structures of dactylariol and the antiprotozoal antibiotic dactylarin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1978**, *31* (4), 324-329.
41. Bills, G. F.; Redlin, S. C.; Carris, L. M., Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution.* **1996**, 31-65.
42. Bizukojc, M.; Ledakowicz, S., Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. J.* **2009**, *4* (5), 647-664.
43. Bnouham, M.; Merhfour, F. Z.; Ziyyat, A.; Aziz, M.; Legssyer, A.; Mekhfi, H., Antidiabetic effect of some medicinal plants of oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **2010**, *29* (10), 865-871.
44. Bnouham, M.; Benalla, W.; Bellahcen, S.; Hakkou, Z.; Ziyyat, A.; Mekhfi, H.; Aziz, M.; Legssyer, A., Antidiabetic and antihypertensive effect of a polyphenol-rich fraction of *Thymelaea hirsuta* L. in a model of neonatal streptozotocin-diabetic and NG-nitro-L-arginine methyl ester-hypertensive rats. *Journal of Diabetes* **2012**, *4* (3), 307-313.

45. Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A., Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3* (7), 619-627.
46. Börner, H., Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. *Botan. Rev.* **1960**, *26*, 393-424.
47. Boudet, A.-M., A new view of lignification. *Trends Plant Sci.* **1998**, *3* (2), 67-71.
48. Brauers, G.; Edrada, R. A.; Ebel, R.; Proksch, P.; Wray, V.; Berg, A.; Gräfe, U.; Schächtele, C.; Totzke, F.; Finkenzeller, G.; Marme, D.; Kraus, J.; Münchbach, M.; Michel, M.; Bringmann, G.; Schaumann, K., Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: Novel inhibitors of protein kinases. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (6), 739-745.
49. Brock, M.; Buckel, W., On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271* (15), 3227-3241.
50. Bruno, G.; Bruno, L.; Sparapano, G.; Bruno, Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and molecular plant pathology* **2006**, *69* (4-6), 209-223.
51. Burkhead, K. D.; Slininger, P. J.; Schisler, D. A., Biological control bacterium *Enterobacter cloacae* S11: T: 07 (NRRL B-21050) produces the antifungal compound phenylacetic acid in Sabouraud maltose broth culture. *Soil Biol. Biochem.* **1998**, *30* (5), 665-667.
52. Bürki, N.; Michel, A.; Tabacchi, R., Naphthalenones and isocoumarins of the fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Phytopathologia Mediterranea* **2003**, *42* (2), 191-198.
53. Burton, H. S.; Abraham, E. P., Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochem. J.* **1951**, *50* (2), 168-174.
54. Bushnell, G. W.; Li, Y.-L.; Poulton, G. A., Pyrones. X. Lateropyrone, a new antibiotic from the fungus *Fusarium lateritium* Nees. *Can. J. Chem.* **1984**, *62* (11), 2101-2106.
55. Cacho, R. A.; Chooi, Y.-H.; Zhou, H.; Tang, Y., Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (10), 2322-2330.
56. Cafêu, M. C.; Silva, G. H.; Teles, H. L.; da SBolzani, V.; Araújo, A. R.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H., Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quim. Nova* **2005**, *28* (6), 991-995.
57. Campbell, W. C.; Fisher, M. H.; Stapley, E. O.; Albers-Schonberg, G.; Jacob, T. A., Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* **1983**, *221* (4613), 823-828.
58. Cane, S.; Stockton, J.; Vallance, A., A note on the diet of the Tasmanian Aborigines. *Australian Archaeology* **1979**, (9), 77-81.
59. Capon, R. J.; Ratnayake, R.; Stewart, M.; Lacey, E.; Tennant, S.; Gill, J., Aspergillazines A-E: novel heterocyclic dipeptides from an Australian strain of *Aspergillus unilateralis*. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (1), 123-129.
60. Carroll, G., Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **1988**, 2-9.
61. Chanway, C. P., Endophytes: they're not just fungi! *Can. J. Bot.* **1996**, *74* (3), 321-322.
62. Chen, Y.; Zeeck, A.; Chen, Z.; Zähler, H., Metabolic products of microorganisms. 2beta-Oxotryptamine derivatives isolated from *Streptomyces ramulosus*. *The Journal of Antibiotics* **1983**, *36* (7), 913-915.
63. Chen, Z.-G.; Fujii, I.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U., Purification and characterization of emodinanthrone oxygenase from *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (2), 299-305.
64. Cherrett, J.; Powell, R.; Stradling, D., The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. *Insect-fungus interactions* **1989**, 93-120.
65. Chomcheon, P.; Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P., Metabolites from the endophytic mitosporic *Dothideomycete* sp. LRUB20. *Phytochemistry* **2009**, *70* (1), 121-127.
66. Chou, T.-W.; Feng, J.-H.; Huang, C.-C.; Cheng, Y.-W.; Chien, S.-C.; Wang, S.-Y.; Shyur, L.-F.; Fang, D., A plant kavalactone desmethoxyyangonin prevents inflammation and fulminant hepatitis in mice. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e77626.

67. Christensen, K. B.; Van Klink, J. W.; Weavers, R. T.; Larsen, T. O.; Andersen, B.; Phipps, R. K., Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (24), 9431-9435.
68. Cichewicz, R. H., Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (1), 11-22.
69. Cimmino, A.; Andolfi, A.; Berestetskiy, A.; Evidente, A., Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (15), 6304-6309.
70. Clarke, D. D., Radicinin: a metabolite from *Stemphylium radicinum*. II. On the mechanism of its biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **1955**, *59* (1), 285-293.
71. Crawford, J. M.; Korman, T. P.; Labonte, J. W.; Vagstad, A. L.; Hill, E. A.; Kamari-Bidkorpheh, O.; Tsai, S.-C.; Townsend, C. A., Structural basis for biosynthetic programming of fungal aromatic polyketide cyclization. *Nature* **2009**, *461* (7267), 1139-1143.
72. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G., Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* **2000**, 1250-1318.
73. Cutler, H. G.; Hoogsteen, K.; Littrell, R. H.; Arison, B. H., Epoxyxserohilone, a Novel Metabolite from *Nigrospora sphaerica* *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55* (8), 2037-2042.
74. de Barros, B. S.; da Silva, J. P.; de Souza Ferro, J. N.; Agra, I. K. R.; de Almeida Brito, F.; Albuquerque, É. D.; Caetano, L. C.; Barreto, E., Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. *Natural Medicines* **2011**, *65* (3-4), 526-531.
75. Debbab, A.; Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Pretsch, A.; Pescitelli, G.; Kurtan, T.; Proksch, P., New anthracene derivatives—structure elucidation and antimicrobial activity. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (7), 1351-1359.
76. Debbab, A.; Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Müller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Mossadak, M.; Hakiki, A.; Proksch, P.; Ebel, R., Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (4), 626-631.
77. Degenkolb, T.; Heinze, S.; Schlegel, B.; Strobel, G.; Gräfe, U., Formation of new lipoaminopeptides, acremostatins A, B, and C, by co-cultivation of *Acremonium* sp. Tbp-5 and *Mycogone rosea* DSM 12973. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66* (4), 883-886.
78. Dewick, P. M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons: **2011**.
79. Dharmaratne, R. W.; Dhammika, N. N. P.; Khan, I. A., Kavalactones from *Piper methysticum*, and their <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry* **2002**, *59* (4), 429-433.
80. Díaz, L.; González, C.; Moreno, B.; Otero, A., Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiol.* **2002**, *19* (1), 1-7.
81. Diesel, A., Endophytische Pilze aus terrestrischen Pflanzen: molekularbiologische und naturstoffchemische Untersuchungen. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany, **2009**.
82. Dingermann, T.; Schneider, G., *Arzneidrogen*. Elsevier, Spektrum Akad. Verlag: **2004**.
83. Dong, J. Y.; Song, H. C.; Li, J. H.; Tang, Y. S.; Sun, R.; Wang, L.; Zhou, Y. P.; Wang, L. M.; Shen, K. Z.; Wang, C. R., Ymf 1029A– E, preussomerin analogues from the fresh-water-derived fungus YMF 1.01029. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (6), 952-956.
84. Dorrance, A. E.; Kleinhenz, M. D.; McClure, S. A.; Tuttle, N. T., Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. *Plant Dis.* **2003**, *87* (5), 533-538.
85. Douglas, J. L.; Money, T., Pyrone studies—II: Biogenetic-type synthesis of phenolic compounds. *Tetrahedron* **1967**, *23* (9), 3545-3555.
86. Doull, J. L.; Ayer, S. W.; Singh, A. K.; Thibault, P., Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *The Journal of Antibiotics* **1993**, *46* (5), 869-871.
87. Drew, S. W.; Demain, A. L., Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Reviews in Microbiology* **1977**, *31* (1), 343-356.

88. Dreyfuss, M.; Härrä, E.; Hofmann, H.; Kobel, H.; Pache, W.; Tschertter, H., Cyclosporin A and C. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **1976**, *3* (2), 125-133.
89. Du, L.; Zhu, T.; Liu, H.; Fang, Y.; Zhu, W.; Gu, Q., Cytotoxic polyketides from a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (11), 1837-1842.
90. dui al Banerjee, D., Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Research Journal of Microbiology* **2011**, *6* (1), 54-62.
91. Ebrahim, W. N. E. S., New natural products from endophytic fungi-structure elucidation and biological activity. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany, **2012**.
92. El-Seedi, H. R.; El-Said, A. M.; Khalifa, S. A.; Göransson, U.; Bohlin, L.; Borg-Karlson, A.-K.; Verpoorte, R., Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (44), 10877-10895.
93. El Alfy, T.; Ibrahim, T. A.; Saleem, A. A., Phytochemical and biological study of the essential oils and petroleum ether extract of the leaves and flowers of *Eugenia uniflora* L. grown in Egypt [Part I]. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* **2003**, *41* (2), 83-92.
94. Evidente, A., Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **2000**, *39* (1), 162-168.
95. Evidente, A., Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea* **2010**, *49* (1), 74-79.
96. Evidente, A.; Andolfi, A.; Maddau, L.; Franceschini, A.; Marras, F., Biscopopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (4), 568-571.
97. Evidente, A.; Rodeva, R.; Andolfi, A.; Stoyanova, Z.; Perrone, C.; Motta, A., Phytotoxic polyketides produced by *Phomopsis foeniculi*, a strain isolated from diseased Bulgarian fennel. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *130* (2), 173-182.
98. Eyberger, A. L.; Dondapati, R.; Porter, J. R., Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (8), 1121-1124.
99. Faeth, S. H.; Hammon, K. E., Fungal endophytes in oak trees: experimental analyses of interactions with leafminers. *Ecology* **1997a**, *78* (3), 820-827.
100. Faeth, S. H.; Hammon, K. E., Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* **1997b**, *78* (3), 810-819.
101. Fang, M. J.; Fang, H.; Li, W. J.; Huang, D. M.; Wu, Z.; Zhao, Y. F., A new diphenyl ether from *Phoma* sp. strain, SHZK-2. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26* (13), 1224-1228.
102. Farr, D. F.; O'Neill, N. R.; van Berkum, P. B., Morphological and molecular studies on *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, pathogens of *Papaver somniferum*. *Mycologia* **2000**, *92* (1), 145-153.
103. Fisch, K. M.; Gillaspay, A. F.; Gipson, M.; Henrikson, J. C.; Hoover, A. R.; Jackson, L.; Najar, F. Z.; Wägele, H.; Cichewicz, R. H., Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36* (9), 1199-1213.
104. Fleming, A., The discovery of penicillin. *Br. Med. Bull.* **1944**, *2* (1), 4-5.
105. Fujimoto, H.; Nagano, J.; Yamaguchi, K.; Yamazaki, M., Immunosuppressive components from an ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46* (3), 423-429.
106. Fujimoto, Y.; Yokoyama, E.; Takahashi, T.; Uzawa, J. U. N.; Morooka, N.; Tsunoda, H.; Tatsuno, T., Studies on the metabolites of *Penicillium diversum* var. *aureum*. I. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34* (4), 1497-1500.
107. Funä, N.; Awakawa, T.; Horinouchi, S., Pentaketide resorecylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (19), 14476-14481.
108. Galicia-Herbada, D., Origin and diversification of *Thymelaea* (Thymelaeaceae): inferences from a phylogenetic study based on ITS (rDNA) sequences. *Plant Syst. Evol.* **2006**, *257* (3-4), 159-187.

109. Gamboa Angulo, M. M.; García Sosa, K.; Alejos González, F.; Escalante Erosa, F.; Delgado Lamas, G.; Peña Rodríguez, L., Tagetolone and tagetenolone: Two phytotoxic polyketides from *Alternaria tagetica*. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (3), 1228-1232.
110. Gao, S.-S.; Li, X.-M.; Wang, B.-G., Perylene derivatives produced by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Laurencia* species. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4* (11), 1477.
111. Gasson, M. J.; Kitamura, Y.; McLauchlan, W. R.; Narbad, A.; Parr, A. J.; Parsons, E. L. H.; Payne, J.; Rhodes, M. J. C.; Walton, N. J., Metabolism of ferulic acid to vanillin A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (7), 4163-4170.
112. Ge, H. M.; Song, Y. C.; Shan, C. Y.; Ye, Y. H.; Tan, R. X., New and cytotoxic anthraquinones from *Pleospora* sp. IFB-E006, an endophytic fungus in *Imperata cylindrical*. *Planta Med.* **2005**, *71* (11), 1063-1065.
113. Geiseler, O.; Podlech, J., Total synthesis of infectopyrone, aplysiopsenes A–C, ent-aplysiopsene D, phomapyrones A and D, 8,9-dehydroxylarone, and nectriapyrone. *Tetrahedron* **2012**, *68* (36), 7280-7287.
114. Gmira, N.; Doumi, L.; Bsaibis, F.; Hmamouchi, S., *Thymelaea lythroides* (Barr. et Murb): Approche ethnobotanique et activité biologique *Rev. Microbiol. Ind. San.et Environn.* **2007**, *1*, 31-43.
115. Goswami, S.; Bhunia, B.; Mandal, T., Purification and characterization of lovastatin from *Aspergillus terreus* (JX081272. 1). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **2012**, *3* (3), 342-351.
116. Grein, A., Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* **1987**, *32*, 203-214.
117. Gremaud, G.; Tabacchi, R., Isocoumarins of the fungus *Ceratocystis fimbriata coffea*. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *5* (2), 95-103.
118. Grove, J. F., Metabolic products of *Stemphylium radicinum*. Part IV. Minor products. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 2261-2263.
119. Gupta, J., Metabolism of trans-ferulic acid by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **1981**, *128* (4), 349-354.
120. Gummalla, S.; Broadbent, J. R., Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84* (5), 1011-1019.
121. Hallock, Y. F.; Clardy, J.; Kenfield, D. S.; Strobel, G., De-O-methyladiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. *Phytochemistry* **1988**, *27* (10), 3123-3125.
122. Hammerschmidt, L.; Wray, V.; Lin, W.; Kamilova, E.; Proksch, P.; Aly, A. H., New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*. *Phytochemistry Letters* **2012**, *5* (3), 600-603.
123. Hänsel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E.; Alban, S., *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. Springer Berlin: **1999**; Vol. 5.
124. Harris, C.; Harris, J. S.; Roberson, T., Biosynthesis of griseofulvin. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (17), 5380-5386.
125. Harris, C. M.; Schneider, M. J.; Ungemach, F. S.; Hill, J. E.; Harris, T. M., Biosynthesis of the toxic indolizidine alkaloids slaframine and swainsonine in *Rhizoctonia leguminicola*: metabolism of 1-hydroxyindolizidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (3), 940-949.
126. Harwooda, J. S.; Cutler, H. G.; Jacyno, J. M., Nigrosporolide, a plant growth-inhibiting macrolide from the mould *Nigrospora sphaerica*. *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *6* (3), 181-185.
127. Hashimoto, T.; Suganuma, M.; Fujiki, H.; Yamada, M.; Kohno, T.; Asakawa, X., Isolation and synthesis of TNF- $\alpha$  release inhibitors from Fijian kawa (*Piper methysticum*). *Phytomedicine* **2003**, *10* (4), 309-317.
128. Hassan, A., Novel natural products from endophytic fungi of Egyptian medicinal plants - chemical and biological characterization. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany, **2007**.

129. Hayashi, H.; Matsumoto, H.; Akiyama, K., New insecticidal compounds, communesins C, D and E, from *Penicillium expansum* link MK-57. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68* (3), 753-756.
130. He, J.-W.; Chen, G.-D.; Gao, H.; Yang, F.; Li, X.-X.; Peng, T.; Guo, L.-D.; Yao, X.-S., Heptaketides with antiviral activity from three endolichenic fungal strains *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp. *Fitoterapia* **2012**, *83* (6), 1087-1091.
131. He, X.-Y.; Yang, S.-Y., Glutamate-119 of the large  $\alpha$ -subunit is the catalytic base in the hydration of 2-trans-enoyl-coenzyme A catalyzed by the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1997**, *36* (36), 11044-11049.
132. Henrikson, J. C.; Hoover, A. R.; Joyner, P. M.; Cichewicz, R. H., A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (3), 435-438.
133. Herrmann, K. M.; Weaver, L. M., The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1999**, *50* (1), 473-503.
134. Hertweck, C.; Jarvis, A. P.; Xiang, L.; Moore, B. S.; Oldham, N. J., A mechanism of benzoic acid biosynthesis in plants and bacteria that mirrors fatty acid  $\beta$ -oxidation. *ChemBioChem* **2001**, *2* (10), 784-786.
135. Hiort, J., Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany, **2003**.
136. Hirata, S., Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. 10. Indole-acetic acid production of five species of bacteria causing gall, canker, or scab. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University* **1960**, *5* (2), 85-92.
137. Hirota, A.; Horikawa, T.; Fujiwara, A., Isolation of phenylacetic acid and indoleacetic acid from a phytopathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57* (3), 492-492.
138. Hodges, C. S., Studies of black root rot of pine seedlings. Texas, **1960**.
139. Holenstein, J.; Stoessl, A., Metabolites of *Alternaria solani*, part IX: Phytotoxicity of altersolanol A. *Phytopathologische Zeitschrift* **1983**, *108* (2), 143-147.
140. Höller, U.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T., Biologically active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (6), 876-882.
141. Horwitz, S., Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13* (4), 134-136.
142. Hosoe, T.; Nozawa, K.; Udagawa, S.-i.; Nakajima, S.; Kawai, K.-i., An anthraquinone derivative from *Dichotomophthora lutea*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (3), 997-999.
143. Houghton, P. J.; Cheshire, P. J.; Hallman II, J. D.; Lutz, L.; Friedman, H. S.; Danks, M. K.; Houghton, J. A., Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36* (5), 393-403.
144. Hradil, C.; Hradil, Y. F.; Hallock, J.; Clardy, D.; Kenfield, G.; Strobel, C., Phytotoxins from *Alternaria cassiae*. *Phytochemistry* **1989**, *28* (1), 73-75.
145. Hsiang, Y.-H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L. F., Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (27), 14873-14878.
146. Huang, K.-X.; Fujii, I.; Ebizuka, Y.; Gomi, K.; Sankawa, U., Molecular cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from *Aspergillus terreus*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (37), 21495-21502.
147. Huber, C.; Court, W. A.; Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Scott, P. M., Stemphone: A new type of natural quinone. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15* (29), 2545-2548.
148. Hwang, B. K.; Lim, S. W.; Kim, B. S.; Lee, J. Y.; Moon, S. S., Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (8), 3739-3745.
149. Hyun, S.; Hyun, H.; Lee, S.; Kang, H.; Chung, J.; Choi, S., Inhibitory activities of *Cassia tora* and its anthraquinone constituents on angiotensin-converting enzyme. *Phytother. Res.* **2009**, *23* (2), 178-184.

150. Iacobellis, N. S.; DeVay, J. E., Studies on pathogenesis of *Rhizoctonia solani* in beans: an evaluation of the possible roles of phenylacetic acid and its hydroxy derivatives as phytotoxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1987**, *30* (3), 421-432.
151. Ichihara, A.; Hashimoto, M.; Hirai, T.; Takeda, I.; Sasamura, Y.; Sakamura, S.; Sato, R.; Tajimi, A., Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium orthosporum*. *Chem. Lett.* **1989**, *18* (8), 1495-1498.
152. Inamori, Y.; Kato, Y.; Kubo, M.; Kamiki, T.; Takemoto, T.; Nomoto, K., Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. *aureus*. I. Chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture broth. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31* (12), 4543-4548.
153. Inderbitzin, P.; Inderbitzin, Y. R.; Mehta, M. L.; Berbee, P., *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. *Mycologia* **2009**, *101* (3), 329-339.
154. Ivanova, L.; Petersen, D.; Uhlig, S., Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. *Toxicon* **2010**, *55* (6), 1107-1114.
155. Jang, Y.-W.; Lee, I.-K.; Kim, Y.-S.; Seok, S.-J.; Yu, S.; Yun, B.-S., Chemical constituents of the fruiting body of *Xylaria polymorpha*. *Mycobiology* **2009**, *37* (3), 207.
156. Janse, J. M., Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. *Ann. Jard. bot. Buitenzorg.(14)* **1897**, 53-201.
157. Jarvis, A. P.; Schaaf, O.; Oldham, N. J., 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta* **2000**, *212* (1), 119-126.
158. Jiang, T.-F.; Wang, Y.-H.; Lv, Z.-H.; Yue, M.-E., Determination of kava lactones and flavonoid glycoside in *Scorzonera austriaca* by capillary zone electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (3), 854-858.
159. Jones, K. H.; Trudgill, P. W.; Hopper, D. J., Metabolism of *p*-cresol by the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59* (4), 1125-1130.
160. Joshi, B.; Joshi, J. B.; Gloer, D.; Wicklow, B., Bioactive natural products from a sclerotium-colonizing isolate of *Humicola fuscoatra*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (11), 1734-1737.
161. Jurna, I., Sertürner und Morphin—eine historische Vignette. *Der Schmerz* **2003**, *17* (4), 280-283.
162. Kabbaj, F. Z.; Lai, D.; Meddah, B.; Altenbach, H.-J.; Cherrah, Y.; Proksch, P.; Faouzi, M. E. A.; Debbab, A., Chemical constituents from aerial parts of *Thymelaea lythroides*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, *51*, 153-155.
163. Kanamaru, S.; Honma, M.; Murakami, T.; Tsushima, T.; Kudo, S.; Tanaka, K.; Nihei, K. I.; Nehira, T.; Hashimoto, M., Absolute stereochemistry of altersolanol A and alterporriols. *Chirality* **2012**, *24* (2), 137-146.
164. Kashiwada, Y.; Kashiwada, G.; Nonaka, I.; Nishioka, Y., Studies on rhubarb (*rhei rhizoma*). V. Isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32* (9), 3493-3500.
165. Kavitha, A.; Prabhakar, P.; Vijayalakshmi, M.; Venkateswarlu, Y., Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL\_333. *Res. Microbiol.* **2010**, *161* (5), 335-345.
166. Kern, H., Production of auxins and cytokinins by *Taphrina* species. *Phytopathologische Zeitschrift* **1975**, *83* (3), 193-200.
167. Khaldi, N.; Collemare, J.; Lebrun, M.-H.; Wolfe, K. H., Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome Biol.* **2008**, *9* (1), R18.
168. Khamthong, N.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Kaewpet, M.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J., Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95. *Arch. Pharmacol. Res.* **2012**, *35* (3), 461-468.
169. Kim, J.-C.; Kim, G. J.; Choi, J.-H.; Park, H.; Kim, K.; Cho, J.-C., Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manage. Sci.* **2001**, *57* (6), 554-559.

170. Kimura, Y.; Kozawa, M.; Baba, M.; Hata, K., New constituents of roots of *Polygonum cuspidatum*. *Planta Med.* **1983**, *48* (7), 164.
171. Kimura, Y.; Shiojima, K.; Nakajima, H.; Hamasaki, T., Structure and biological activity of plant growth regulators produced by *Penicillium* sp. No.31f. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56* (7), 1138-1139.
172. Kingston, D. G. I.; Kingston, P. N.; Chen, J.; Vercellotti, D., Metabolites of *Aspergillus versicolor*: 6,8-di-O-methylnidurufin, griseofulvin, dechlorogriseofulvin, and 3,8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylxanthone. *Phytochemistry* **1976**, *15* (6), 1037-1039.
173. Kinsella, J. E.; Hwang, D. H.; Dwivedi, B., Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1976**, *8* (2), 191-228.
174. Kishore, G.; Sugumaran, M.; Vaidyanathan, C. S., Metabolism of DL-(+/-)-phenylalanine by *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol.* **1976**, *128* (1), 182-191.
175. Kitamoto, Y.; Suzuki, A.; Shimada, S., A new method for the preservation of fungus stock cultures. *Mycoscience* **2002**, *43*, 143-149.
176. Kittell, B. L.; Helinski, D. R.; Ditta, G. S., Aromatic aminotransferase activity and indoleacetic acid production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (10), 5458-5466.
177. Kjer, J., New natural products from endophytic fungi from mangrove plants—structure elucidation and biological screening - Neue Naturstoffe aus endophytischen Pilzen aus Mangroven—Strukturaufklärung und Evaluierung. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany, **2010**.
178. Kjer, J.; Wray, V.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Pretsch, A.; Lin, W.; Proksch, P., Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (11), 2053-2057.
179. Klaiklay, S.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Bussaban, B., Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. *Arch. Pharmacol. Res.* **2012**, *35* (7), 1127-1131.
180. Knight, V.; Sanglier, J. J.; DiTullio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L., Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62* (5-6), 446-458.
181. Köhl, J.; Groenenboom-de Haas, B.; Goossen-van de Geijn, H.; Speksnijder, A.; Kastelein, P.; Hoog, S.; Gerrits van den Ende, B., Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *Eur. J. Plant Pathol.* **2009**, *124* (1), 151-162.
182. Kokubun, T.; Kokubun, N. C.; Veitch, P.; Bridge, M. S. J.; Simmonds, T., Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. *Phytochemistry* **2003**, *62* (5), 779-782.
183. König, C. C.; Scherlach, K.; Schroeckh, V.; Horn, F.; Nietzsche, S.; Brakhage, A. A.; Hertweck, C., Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* **2013**, *14* (8), 938-942.
184. Kosano, H.; Stensgard, B.; Charlesworth, M. C.; McMahon, N.; Toft, D., The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (49), 32973-32979.
185. Kour, A.; Shawl, A. S.; Rehman, S.; Sultan, P.; Qazi, P. H.; Suden, P.; Khajuria, R. K.; Verma, V., Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24* (7), 1115-1121.
186. Kowalski, T.; Kehr, R. D., Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. In *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution.*, Redlin, S. C.; Carris, L. M., Eds. **1996**, pp 67-86.
187. Krings, M.; Taylor, T. N.; Hass, H.; Kerp, H.; Dotzler, N.; Hermsen, E. J., Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol.* **2007**, *174* (3), 648-657.
188. Krings, U.; Hinz, M.; Berger, R. G., Degradation of [<sup>2</sup>H] phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *J. Biotechnol.* **1996**, *51* (2), 123-129.

189. Krings, U.; Pilawa, S.; Theobald, C.; Berger, R. G., Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* — elucidation of metabolic pathways using [5-<sup>2</sup>H]-ferulic acid. *J. Biotechnol.* **2001**, *85* (3), 305-314.
190. Krohn, K.; Biele, C.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B., Herbarulide, a ketodivinyllactone steroid with an unprecedented homo-6-oxaergostane skeleton from the endophytic fungus *Pleospora herbarum*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62* (4), 629-630.
191. Kroon, P. A.; Williamson, G., Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79* (3), 355-361.
192. Kuhnert, N., Hundert Jahre Aspirin®. *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33* (4), 213-220.
193. Kumar, A.; Patil, D.; Rajamohanam, P. R.; Ahmad, A., Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS One* **2013**, *8* (9), e71805.
194. Kunnumakkara, A. B.; Koca, C.; Dey, S.; Gehlot, P.; Yodkeeree, S.; Danda, D.; Sung, B.; Aggarwal, B. B., Traditional uses of spices: an overview. In *Molecular targets and therapeutic uses of spices.*, Aggarwal, B. B.; Kunnumakkara, A. B., Eds. World Scientific: New Jersey, **2009**; pp 1-24.
195. Kuo, Y.-H.; Lee, P.-H.; Wein, Y.-S., Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (8), 1165-1167.
196. Kurosaki, F., Dissociation of dimeric 6-hydroxymellein synthase, a polyketide biosynthetic enzyme in carrot cell extracts, with loss of keto-reducing activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *321* (1), 239-244.
197. Kurosawa, K.; Ghiviriga, I.; Sambandan, T. G.; Lessard, P. A.; Barbara, J. E.; Rha, C.; Sinsky, A. J., Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (4), 1126-1127.
198. Kusari, S.; Zühlke, S.; Spitteller, M., Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (4), 764-775.
199. Kusari, S.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Spitteller, M., An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (2), 159-162.
200. Kusari, S.; Zühlke, S.; Košuth, J. n.; Čellárová, E.; Spitteller, M., Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (10), 1825-1835.
201. Langenbeck-Schwich, B.; Grainbow, H. J., Metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-methanol in wheat leaf segments. *Physiol. Plant.* **1984**, *61* (1), 125-129.
202. Lavelle, F.; Gueritte-Voegelein, F.; Guenard, D., Taxotere: from yew's needles to clinical practice. *Bull. Cancer* **1993**, *80* (4), 326-338.
203. Leach, C. M., Phytopathogenic and saprophytic fungi associated with forage legume seed. *Plant Disease Reporter* **1960**, *44* (5), 364-369.
204. Lean, Q.; Narkowicz, C. K.; Geraghty, D. P., Investigation of flavonoid metabolites after ingestion of *Carpobrotus rossii* extract in the rat. University of Tasmania, **2010**.
205. Lee, H.-I.; León, J.; Raskin, I., Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (10), 4076-4079.
206. Lee, H. J.; Choi, J. S.; Jung, J. H.; Kang, S. S., Alaternin glucoside isomer from *Cassia tora*. *Phytochemistry* **1998**, *49* (5), 1403-1404.
207. Lee, H. J.; Lee, J. H.; Hwang, B. Y.; Kim, H. S.; Lee, J. J., Fungal metabolites, asteric acid derivatives inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tube formation of HUVECs. *The Journal of Antibiotics* **2002**, *55* (6), 552-556.
208. Lee, I.-K.; Yun, B.-S., Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *The Journal of Antibiotics* **2011**, *64* (5), 349-359.
209. Li, D.-L.; Li, X.-M.; Wang, B.-G., Natural anthraquinone derivatives from a marine mangrove plant-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*: structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19* (7), 675-680.
210. Li, D.; Wang, F.; Xiao, X.; Zeng, X.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W., A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. *Arch. Pharmacol. Res.* **2007**, *30* (5), 552-555.

211. Li, L.; Huang, C.-G.; Wang, C.-Y.; Guo, Y.-W., Sexangulic acid, a new cytotoxic triterpenoid from the Chinese mangrove *Bruguiera sexangula*. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24* (11), 1044-1049.
212. Li, Y.; Sun, B.; Liu, S.; Jiang, L.; Liu, X.; Zhang, H.; Che, Y., Bioactive asterriic acid derivatives from the antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (9), 1643-1646.
213. Lin, T.; Lu, C.; Shen, Y., Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. F1, a commensal fungal strain of *Trewia nudiflora*. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23* (1), 77-85.
214. Lin, T.; Lin, X.; Lu, C.; Shen, Y., Secondary metabolites of *Pyrenochaeta* sp. B36, an endophytic fungus from *Annona squamosa* L. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25* (10), 1008-1013.
215. Ling, D.; Qin, S.; Li, F.; Xi, X.; Laatsch, H., Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. *Curr. Microbiol.* **2008**, *56* (3), 229-235.
216. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23* (1), 3-25.
217. Liu, F.; Cai, X.-L.; Yang, H.; Xia, X.-K.; Guo, Z.-Y.; Yuan, J.; Li, M.-F.; She, Z.-G.; Lin, Y.-C., The bioactive metabolites of the mangrove endophytic fungus *Talaromyces* sp. ZH-154 isolated from *Kandelia candel* (L.) Druce. *Planta Med.* **2010**, *76* (2), 185-189.
218. Liu, R.; Zhu, W.; Zhang, Y.; Zhu, T.; Liu, H.; Fang, Y.; Gu, Q., A new diphenyl ether from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. BF-2. *The Journal of Antibiotics* **2006**, *59* (6), 362-365.
219. Liu, S.-C., Study on chemical constituents of *Melia azedarach*. *中国实验方剂学杂志* **2011**, *17* (6), 93-96.
220. Liu, X.-H.; Miao, F.-P.; Li, X.-D.; Yin, X.-L.; Ji, N.-Y., A new sesquiterpene from an endophytic *Aspergillus versicolor* strain. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7* (7), 819-822.
221. Liu, Y.-H.; Zhou, H.-Q.; Yuan, K., Analysis of chemical constituents of the volatile oil in the green peel of *Carya cathayensis* Sarg. by SPME-GC-MS. *时珍国医国药* **2009**, *20* (7), 1667.
222. Liu, Y.; Hu, Z.; Lin, X.; Lu, C.; Shen, Y., A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. *Nat. Prod. Res.* **2013**, (ahead-of-print), 1-5.
223. Loder, J. W.; Loder, G. B.; Russell, J., Tropine 1,2-dithiolane-3-carboxylate, a new alkaloid from *Bruguiera sexangula*. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7* (51), 6327-6329.
224. Lopes, A.; Lopes, M. T.; Pupo, A., Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22* (1), 80-85.
225. Ma, Y.; Sachdeva, K.; Liu, J.; Ford, M.; Yang, D.; Khan, I. A.; Chichester, C. O.; Yan, B., Desmethoxyyangonin and dihydromethysticin are two major pharmacological kavalactones with marked activity on the induction of CYP3A23. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32* (11), 1317-1324.
226. Macías, M.; Gamboa, A.; Ulloa, M.; Toscano, R.; Mata, R., Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* **2001**, *58* (5), 751-758.
227. Mao, S.; Jin, R.-D.; Lee, S.-J.; Kim, Y.-W.; Kim, I.-S.; Shim, J.-H.; Park, R.-D.; Kim, K.-Y., Isolation and in vitro antimicrobial activity of low molecular phenolic compounds from *Burkholderia* sp. MP-1. *한국토양비료학회지* **2006**, *39* (4), 195-203.
228. Marlida, Y.; Delfita, R.; Adnadi, P.; Ciptaan, G., Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. *Pakistan Journal of Nutrition* **2010**, *9* (5), 471-474.
229. Marschner, H.; Dell, B., Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* **1994**, *159* (1), 89-102.
230. Martins, M.; Ordway, D.; Kristiansen, M.; Viveiros, M.; Leandro, C.; Molnar, J.; Amaral, L., Inhibition of the *Carpobrotus edulis* methanol extract on the growth of phagocytosed

- multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* **2005**, 76 (1), 96-99.
231. Marumo, S.; Hattori, H.; Katayama, M., Stemphol from *Pleospora herbarum* as a self-inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49 (5), 1521-1522.
232. Matsuo, H.; Ueno, Y., *Fusarium* as plant pathogens. *Trichothecenes* **1983**, 83-94.
233. Mavrides, C.; Orr, W., Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1975**, 250 (11), 4128-4133.
234. Meyer, F. H., Symbiosen: Mykorrhiza. In *Progress in Botany*, Springer: **1989**; pp 375-390.
235. Mo, S.; Wang, S.; Zhou, G.; Yang, Y.; Li, Y.; Chen, X.; Shi, J., Phelligrindins C-F: Cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and furo[3,2-c]pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (5), 823-828.
236. Morikawa, T.; Funakoshi, K.; Ninomiya, K.; Yasuda, D.; Miyagawa, K.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M., Medicinal foodstuffs. XXXIV. Structures of new prenylchalcones and prenylflavanones with TNF- $\alpha$  and aminopeptidase N inhibitory activities from *Boesenbergia rotunda*. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56 (7), 956-962.
237. Morikawa, Y.; Karube, I.; Suzuki, S., Penicillin G production by immobilized whole cells of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21 (2), 261-270.
238. Morishima, Y.; Kanelakis, K. C.; Murphy, P. J. M.; Lowe, E. R.; Jenkins, G. J.; Osawa, Y.; Sunahara, R. K.; Pratt, W. B., The hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein hsp90/hsp70-based chaperone system in vivo where it acts to stabilize the client protein hsp90 complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (49), 48754-48763.
239. Muir, R. M.; Fujita, T.; Hansch, C., Structure-activity relationship in the auxin activity of mono-substituted phenylacetic acids. *Plant Physiol.* **1967**, 42 (11), 1519-1526.
240. Nakajima, S.; Watashi, K.; Kamisuki, S.; Tsukuda, S.; Takemoto, K.; Matsuda, M.; Suzuki, R.; Aizaki, H.; Sugawara, F.; Wakita, T., Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 440 (4), 515-520.
241. Nakajima, Y.; Sato, Y.; Konishi, T., Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) pilat (Chaga). *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55 (8), 1222-1226.
242. Nerurkar, P. V.; Dragull, K.; Tang, C.-S., In vitro toxicity of kava alkaloid, pipermethystine, in HepG2 cells compared to kavalactones. *Toxicol. Sci.* **2004**, 79 (1), 106-111.
243. 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 (3), 311-335.
244. Nguyen, M.; Nguyen, M. C., Isosclerone from *Carya tonkinensis*. *Tap chí hóa học* **1999**, 37 (2), 74-77.
245. Nicolet, B.; Tabacchi, R.; Lyr, H.; Russell, P. E.; Dehne, H.-W.; Sisler, H. D. In *Secondary metabolites produced by Stagonospora sp., a potential biocontrol agent against bindweeds*, Modern fungicides and antifungal compounds II. 12th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, 24th-29th May 1998., Intercept Limited: 1999; pp 469-476.
246. Nicoletti, R.; Nicoletti, M. P.; Lopez Gresa, E.; Manzo, A.; Carella, M.; Ciavatta, R., Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia* **2007**, 163 (5), 295-301.
247. Nicoletti, R.; Buommino, E.; Filippis, A.; Lopez Gresa, M.; Manzo, E.; Carella, A.; Petrazzuolo, M.; Tufano, M., Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 24 (2), 189-195.
248. Nishimura, S.; Kohmoto, K., Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1983**, 21 (1), 87-116.
249. Nützmann, H.-W.; Reyes-Dominguez, Y.; Scherlach, K.; Schroeckh, V.; Horn, F.; Gacek, A.; Schumann, J.; Hertweck, C.; Strauss, J.; Brakhage, A. A., Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (34), 14282-14287.

250. Oh, D.-C.; Jensen, P. R.; Kauffman, C. A.; Fenical, W., Libertellenones A–D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (17), 5267-5273.
251. Ohashi, H.; Akiyama, H.; Nishikori, K.; Mochizuki, J.-I., Asterric acid, a new endothelin binding inhibitor. *The Journal of Antibiotics* **1992**, *45* (10), 1684-1685.
252. Ohashi, H.; Ishikawa, M.; Ito, J.; Ueno, A.; Gleich, G.; Kita, H.; Kawai, H.; Fukamachi, H., Sulochrin inhibits eosinophil degranulation. *The Journal of Antibiotics* **1997**, *50* (11), 972-974.
253. Ohnishi, K.; Tanabe, H.; Hayashi, S.; Suemitsu, R., Biosynthesis of alterporriol A by *Alternaria porri*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56* (1), 42-43.
254. Ohnishi, K.; Suemitsu, R.; Kubota, M.; Matano, H.; Yamada, Y., Biosyntheses of alterporriol D and E by *Alternaria porri*. *Phytochemistry* **1991**, *30* (8), 2593-2595.
255. Okamura, N.; Mimura, K.; Haraguchi, H.; Shingu, K.; Miyahara, K.; Yagi, A., Altersolanol-related compounds from the culture liquid of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* **1996**, *42* (1), 77-80.
256. Okuno, T.; Natsume, I.; Sawai, K.; Sawamura, K.; Furusaki, A.; Matsumoto, T., Structure of antifungal and phytotoxic pigments produced by *Alternaria* sp. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (50), 5653-5656.
257. Ola, A. R. B.; Thomy, D.; Lai, D.; Brötz-Oesterhelt, H.; Proksch, P., Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (11), 2094-2099.
258. Ostefeld Larsen, T.; Perry, N. B.; Andersen, B., Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (24), 4511-4513.
259. Owellen, R. J.; Owens, A. H.; Donigian, D. W., The binding of vincristine, vinblastine and colchicine to tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *47* (4), 685-691.
260. Oxford, A. E.; Raistrick, H.; Simonart, P., Studies in the biochemistry of microorganisms: Griseofulvin, C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. J.* **1948**, *33* (2), 323-329.
261. Papaspyridi, L.-M.; Aligiannis, N.; Christakopoulos, P.; Skaltsounis, A.-L.; Fokialakis, N., Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1746-1752.
262. Park, J.-H.; Choi, G. J.; Lee, H. B.; Kim, K. M.; Jung, H. S.; Lee, S.-W.; Jang, K. S.; Cho, K. Y.; Kim, J.-C., Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *15* (1), 112-117.
263. Park, J.-O.; Ghisalberti, E.; Sivasithamparam, K.; Skelton, B.; White, A.; Hargreaves, J., New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* species. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (1), 7-10.
264. Pedras, M. S. C.; Chumala, P. B., Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. *Phytochemistry* **2005**, *66* (1), 81-87.
265. Pedras, M. S. C.; Ahiahonu, P. W. K., Metabolism and metabolites of dithiocarbamates in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (32), 7792-7798.
266. Pedras, M. S. C.; Zheng, Q.-A.; Strelkov, S., Metabolic changes in roots of the oilseed canola infected with the biotroph *Plasmodiophora brassicae*: Phytoalexins and phytoanticipins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (21), 9949.
267. Pedras, M. S. C.; Chumala, P.; Jin, W.; Islam, M.; Hauck, D., The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: Phytotoxin production and phytoalexin elicitation. *Phytochemistry* **2009**, *70* (3), 394-402.
268. Perrin, P. W.; Towers, G. H. N., Hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus*. *Phytochemistry* **1973**, *12* (3), 589-592.
269. Petrini, O., Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *Microbiology of the phyllosphere/edited by NJ Fokkema and J. van den Heuvel* **1986**.
270. Petrini, O., Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves*, Springer: **1991**; pp 179-197.

271. Petrini, O.; Sieber, T. N.; Toti, L.; Viret, O., Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins* **1993**, *1* (3), 185-196.
272. Podwysotszki, V., Pharmakologische Studien über *Podophyllum peltatum*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1880**, *13* (1), 29-52.
273. Preisig-Müller, R.; Gühnemann-Schäfer, K.; Kindl, H., Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (32), 20475-20481.
274. Pryor, B.; Pryor, R. L.; Gilbertson, B., Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **2000**, *104* (11), 1312-1321.
275. Pu, X.; Qu, X.; Chen, F.; Bao, J.; Zhang, G.; Luo, Y., Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (21), 9365-9375.
276. Pur, S. C.; Amna, T.; Khajuria, A.; Gupta, A.; Arora, R.; Spitteller, M.; Qazi, G. N., Immunomodulatory activity of an extract of the novel fungal endophyte *Entrophospora infrequens* isolated from *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2007**, *54* (3), 237-260.
277. Puri, S. C.; Nazir, A.; Chawla, R.; Arora, R.; Riyaz-ul-Hasan, S.; Amna, T.; Ahmed, B.; Verma, V.; Singh, S.; Sagar, R., The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol.* **2006**, *122* (4), 494-510.
278. Ramirez Bribiesca, J.; Ramirez-Bribiesca, J. E.; Wang, Y.; Jin, L.; Canam, T.; Town, J. R.; Tsang, A.; Dumonceaux, T. J.; McAllister, T. A., Chemical characterization and in vitro fermentation of *Brassica* straw treated with the aerobic fungus, *Trametes versicolor*. *Canadian Journal of Animal Science* **2011**, *91* (4), 695-702.
279. Rebacz, B.; Larsen, T. O.; Clausen, M. H.; Rønne, M. H.; Löffler, H.; Ho, A. D.; Krämer, A., Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. *Cancer Res.* **2007**, *67* (13), 6342-6350.
280. Redecker, D.; Kodner, R.; Graham, L. E., Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **2000**, *289* (5486), 1920-1921.
281. Redman, R. S.; Sheehan, K. B.; Stout, R. G.; Rodriguez, R. J.; Henson, J. M., Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **2002**, *298* (5598), 1581-1581.
282. Rehman, S.; Shawl, A. S.; Kour, A.; Sultan, P.; Ahmad, K.; Khajuria, R.; Qazi, G. N., Comparative studies and identification of camptothecin produced by an endophyte at shake flask and bioreactor. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23* (11), 1050-1057.
283. Rehman, S.; Shawl, A. S.; Kour, A.; Andrabi, R.; Sudan, P.; Sultan, P.; Verma, V.; Qazi, G. N., An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2008**, *44* (2), 203-209.
284. Ribnicky, D. M.; Shulaev, V.; Raskin, I., Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **1998**, *118* (2), 565-572.
285. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20* (7), 933-956.
286. Rosa, L. H.; Vaz, A. B. M.; Caligiorne, R. B.; Campolina, S.; Rosa, C. A., Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biol.* **2009**, *32* (2), 161-167.
287. Rösecke, J.; König, W. A., Odorous compounds from the fungus *Gloeophyllum odoratum*. *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15* (5), 315-319.
288. Rukachaisirikul, V.; Buadam, S.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Hutadilok Towatana, N., Indanone and mellein derivatives from the *Garcinia*-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. *Phytochemistry Letters* **2013**, *6* (1), 135-138.
289. Rukachaisirikul, V.; Khamthong, N.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Hutadilok Towatana, N.; Graidist, P.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K., Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol derivatives from the sea fan-derived fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. *Arch. Pharmacol. Res.* **2010**, *33* (3), 375-380.

290. Sagee, O.; Riou, J.; Goren, R., Ethylene-enhanced catabolism of [<sup>14</sup>C] indole-3-acetic acid to indole-3-carboxylic acid in citrus leaf tissues. *Plant Physiol.* **1990**, *92* (1), 54-60.
291. Saikkonen, K.; Faeth, S. H.; Helander, M.; Sullivan, T. J., Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1998**, 319-343.
292. Sankawa, U.; Sankawa, H.; Shimada, T.; Sato, T.; Kinoshita, K.; Yamasaki, U., Biosynthesis of scytalone. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29* (12), 3536-3542.
293. Sarkar, S. K.; Subodh, K.; Phan, C., The biosynthesis of 8-hydroxy-6-methoxy-3-methyl-3, 4-dihydroisocoumarin and 5-hydroxy-7-methoxy-2-methylchromone in carrot root tissues treated with ethylene. *Physiol. Plant.* **1975**, *33* (1), 108-112.
294. Sasaki, T.; Li, W.; Morimura, H.; Li, S.; Li, Q.; Asada, Y.; Koike, K., Chemical constituents from *Sambucus adnata* and their protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59* (11), 1396-1399.
295. Sato, Y.; Oda, T.; Saitô, H., <sup>2</sup>H nuclear magnetic resonance studies on biosynthesis: stereochemistry of the 5'-hydrogen atoms of griseofulvin derived from griseophenone B and 4-demethyldehydrogriseofulvin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, (3), 135-136.
296. Saykhedkar, S. S.; Singhal, R. S., Supercritical carbon dioxide extraction of griseofulvin from the solid matrix obtained after solid-state fermentation. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20* (3), 818-824.
297. Scharld, C. L.; Clay, K., Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In *Plant Relationships Part B*, Springer: **1997**; pp 221-238.
298. Schmeda Hirschmann, G.; Hormazabal, E.; Astudillo, L.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C., Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21* (1), 27-32.
299. Schmitt, I.; Lumbsch, H. T., Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. *PLoS One* **2009**, *4* (2), e4437.
300. Schneider, S.; Mohamed, M. E.-S.; Fuchs, G., Anaerobic metabolism of L-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **1997**, *168* (4), 310-320.
301. Schulthess, F. M.; Faeth, S. H., Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia* **1998**, 569-578.
302. Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Römmert, A.-K.; Krohn, K., Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* **2002**, *106* (9), 996-1004.
303. Schwarz, M.; Köpcke, B.; Weber, R. W. S.; Sterner, O.; Anke, H., 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* **2004**, *65* (15), 2239-2245.
304. Sembdner, G.; Gross, D.; Liebisch, H. W.; Schneider, G., Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In *Hormonal Regulation of Development I*, Springer: **1980**; pp 281-444.
305. Senthil Kumaran, R.; Muthumary, J.; Hur, B. K., Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Eng. Life Sci.* **2008**, *8* (4), 438-446.
306. Seto, Y.; Kogami, Y.; Shimanuki, T.; Takahashi, K.; Matsuura, H.; Yoshihara, T., Production of phleichrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperazines of *Epichloe typhina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69* (8), 1515-1519.
307. Shang, Z.; Li, X.-M.; Li, C.-S.; Wang, B.-G., Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media. *Chem. Biodiversity* **2012**, *9* (7), 1338-1348.
308. Shigemori, H.; Komatsu, K.; Mikamia, Y.; Kobayashi, J. i., Seragakinone A, a new pentacyclic metabolite from a marine-derived fungus. *Tetrahedron* **1999**, *55* (52), 14925-14930.
309. Shimada, A.; Shiokawa, C.; Kusano, M.; Fujioka, S.; Kimura, Y., Hydroxysulochrin, a tea pollen growth inhibitor from the fungus *Aureobasidium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67* (2), 442-444.
310. Shwab, E. K.; Bok, J. W.; Tribus, M.; Galehr, J.; Graessle, S.; Keller, N. P., Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6* (9), 1656-1664.

311. Shweta, S.; Zuehlke, S.; Ramesha, B. T.; Priti, V.; Mohana Kumar, P.; Ravikanth, G.; Spitteller, M.; Vasudeva, R.; Uma Shaanker, R., Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry* **2010**, *71* (1), 117-122.
312. Slater, G. P.; Haskins, R. H.; Hogge, L. R., Metabolites from a *Chrysosporium* species. *Can. J. Microbiol.* **1971**, *17* (12), 1576-1579.
313. Smetanina, O. F.; Yurchenko, A. N.; Kalinovsky, A. I.; Pushilin, M. A.; Slinkina, N. N.; Yurchenko, E. A.; Afiyatullo, S. H., 4-Methoxy-3-methylgoniothalamin from marine-derived fungi of the genus *Penicillium*. *Russ. Chem. Bull.* **2011**, *60* (4), 760-763.
314. Smith, D. A.; VanEtten, H. D.; Bateman, D. F., Accumulation of phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* hypocotyls following infection by *Rhizoctonia solani*. *Physiological Plant Pathology* **1975**, *5* (1), 51-64.
315. Smith, K.; Smith, H. R. W.; Dharmaratne, M.; Feltenstein, S.; Broom, J. T.; Roach, N. P. D.; Nanayakkara, I.; Khan, K.; Sufka, K., Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. *Psychopharmacology* **2001**, *155* (1), 86-90.
316. Soliman, S. S. M.; Raizada, M. N., Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4* (3), 1-14.
317. Somers, E.; Ptacek, D.; Gysegom, P.; Srinivasan, M.; Vanderleyden, J., *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (4), 1803-1810.
318. Sommart, U.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Hutadilok Towatana, N.; Sakayaroj, J., Modiolin and phthalide derivatives from the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. *Tetrahedron* **2012**, *68* (48), 10005-10010.
319. Sonnenbichler, J.; Dietrich, J.; Peipp, H., Secondary fungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, *375* (1), 71-80.
320. Sonnenbichler, J.; Dietrich, J.; Schäfer, W.; Zetl, I., Secondary fungal metabolites and their biological activities, IV. Synthesis of compounds with structural similarities to the toxic metabolites of the pathogenic fungus *Heterobasidion annosum* and investigation of their antibiotic activities. *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374* (11), 1047-1056.
321. Springfield, E. P.; Amabeoku, G.; Weitz, F.; Mabusela, W.; Johnson, Q., An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine* **2003**, *10* (5), 434-439.
322. Stack, M. E.; Mazzola, E. P., Stemphytoxin III from *Alternaria alternata*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52* (2), 426-427.
323. Stack, M. E.; Mazzola, E. P.; Page, S. W.; Pohland, A. E.; Hight, R. J.; Tempesta, M. S.; Corley, D. G., Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II, and III. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49* (5), 866-871.
324. Stermitz, F.; Stermitz, H. A.; Schroeder, J.; Geigert, F., Asteric acid from *Scytalidium*. *Phytochemistry* **1973**, *12* (5), 1173.
325. Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **1993**, *260* (5105), 214-216.
326. Stoessl, A.; Unwin, C. H., Metabolites of *Alternaria solani*. V. Biosynthesis of altersolanol A and incorporation of altersolanol A-<sup>13</sup>Cx into altersolanol B and macrosporin. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (27), 2481-2484.
327. Stoessl, A.; Stothers, J. B., Tetrahydroaltersolanol B, a hexahydroanthronol from *Alternaria solani*. *Can. J. Chem.* **1983**, *61* (2), 378-382.
328. Stoessl, A.; Stoessl, C. H.; Unwin, J. B.; Stothers, A., On the biosynthesis of some polyketide metabolites in *Alternaria solani*: <sup>13</sup>C and <sup>2</sup>H NMR studies. *Can. J. Chem.* **1983**, *61* (2), 372-377.
329. Strobel, G.; Daisy, B., Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67* (4), 491-502.

330. Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R. S.; Hess, W. M., Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* **1996a**, *142* (2), 435-440.
331. Strobel, G. A.; Hess, W. M.; Ford, E.; Sidhu, R. S.; Yang, X., Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *J. Ind. Microbiol.* **1996b**, *17* (5-6), 417-423.
332. Suemitsu, R.; Yamada, Y.; Sano, T.; Yamashita, K., Phytotoxic activities of altersolanol A, B and dactylariol, and activities of altersolanol A against some microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48* (9), 2383-2384.
333. Suemitsu, R.; Yamamoto, T.; Miyai, T.; Ueshima, T., Alterporriol A: a modified bianthraquinone from *Alternaria porri*. *Phytochemistry* **1987**, *26* (12), 3221-3224.
334. Suemitsu, R.; Horiuchi, K.; Kubota, M.; Okamatsu, T., Production of alterporriols, altersolanols and macrosporin by *Alternaria porri* and *A. solani*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (5), 1509-1511.
335. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Yanagawase, S.; Yamamoto, K.; Yamada, Y., Biosynthesis of macrosporin by *Alternaria porri*. *Phytochemistry* **1989a**, *28* (6), 1621-1622.
336. Suemitsu, R.; Sakurai, Y.; Nakachi, K.; Miyoshi, I.; Kubota, M.; Ohnishi, K., Alterporriol D and E, modified bianthraquinones from *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri. *Agric. Biol. Chem.* **1989b**, *53* (5), 1301-1304.
337. Suga, T., The metabolites of *Botrytis cinerea*. *Journal of Science of the Hiroshima University. Series A, Physics and Chemistry* **1984**, *48* (2), 75.
338. Sugijanto, N. E.; Diesel, A.; Ebel, R.; Indrayanto, G.; Zaini, N. C., Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecytophora* sp. isolated from *Alyxia reinwardtii*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4* (11), 1485.
339. Sun, Z.-L.; Zhang, M.; Feng, J.-F., Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massarison* sp. *Phytomedicine* **2011**, *18* (10), 859-862.
340. Sutherland, J. B.; Selby, A. L.; Freeman, J. P.; Fu, P. P.; Miller, D. W.; Cerniglia, C. E., Identification of xyloside conjugates formed from anthracene by *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.* **1992**, *96* (6), 509-517.
341. Takahashi, T.; Yamaguchi, S.; Chida, K.; Shibuya, M., A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- $\gamma$  and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO Journal* **2001**, *20* (11), 2768-2778.
342. Teiten, M.-H.; Mack, F.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Dicato, M.; Proksch, P.; Diederich, M., Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- $\kappa$ B activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (13), 3850-3858.
343. Teuscher, G.; Teuscher, E., 5-hydroxyindole-3-acetic acid as a metabolic product of indole-3-acetic acid produced by ergot fungus. *Phytochemistry* **1965**, *4* (3), 511-515.
344. Threlfall, D. R.; Whistance, G. R.; Goodwin, T. W., Biosynthesis of phytoquinones. Incorporation of l-[Me- $^{14}$ C $^3$ H] methionine into terpenoid quinones and chromanols in maize shoots. *Biochem. J.* **1968**, *106* (1), 107-112.
345. Tian, S.-Z.; Pu, X.; Luo, G.; Zhao, L.-X.; Xu, L.-H.; Li, W.-J.; Luo, Y., Isolation and characterization of new p-terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (12), 3006-3012.
346. Trigos, Á.; Mendoza, G.; Espinoza, C.; Salinas, A.; Fernández, J. J.; Norte, M., The role of macrosporin in necrotic spots. *Phytochemistry Letters* **2011**, *4* (2), 122-125.
347. Tsantrizos, Y.; Tsantrizos, X.-J.; Xu, F.; Sauriol, R.; Hynes, Y., Novel quinazolinones and enniatins from *Fusarium lateritium* Nees. *Can. J. Chem.* **1994**, *72* (5), 1415-1415.
348. Uen, Y. H.; Liu, D. Z.; Weng, M. S.; Ho, Y. S.; Lin, S. Y., NF- $\kappa$ B pathway is involved in griseofulvin-induced G2/M arrest and apoptosis in HL-60 cells. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101* (5), 1165-1175.
349. Van de Staaij, J.; Rozema, J.; Van Beem, A.; Aerts, R., Increased solar UV-B radiation may reduce infection by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in dune grassland plants: evidence from five years of field exposure. *Plant Ecol.* **2001**, *154* (1-2), 169-177.
350. Van Maanen, J. M. S.; Retel, J.; De Vries, J.; Pinedo, H. M., Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *80* (19), 1526-1533.

351. Varela, E.; Mester, T.; Tien, M., Culture conditions affecting biodegradation components of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Arch. Microbiol.* **2003**, *180* (4), 251-256.
352. Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W., Toxins produced by the dogwood anthracnose fungus *Discula* sp. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54* (5), 1293-1297.
353. Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W. S., Phytotoxins produced by *Tubakia dryina*. *Mycopathologia* **1992**, *120* (1), 33-37.
354. Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T.; Sim, G. A., Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (16), 3888-3890.
355. Wang, F.; Liu, J.-K., Chemical constituents of basidiomycete *Calodon suaveolens*. *天然产物研究与开发* **2004**, *16* (3), 204-209.
356. Wang, J.-P.; Lin, W.; Wray, V.; Lai, D.; Proksch, P., Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (20), 2492-2496.
357. Wang, L.; Zhou, H.-B.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A., *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2004a**, *86* (2), 173-179.
358. Wang, Q.-Z.; Ge, H.-M.; Zhang, J.; Wu, J.-H.; Song, Y.-C.; Zhang, Y.-F.; Tan, R.-X., Cochliones A–D, four new tetrahydrochromanone derivatives from endophytic *Cochliobolus* sp. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12* (6), 485-491.
359. Wang, W.; Zhu, T.; Tao, H.; Lu, Z.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W., Two new cytotoxic quinone type compounds from the halotolerant fungus *Aspergillus variegator*. *The Journal of Antibiotics* **2007**, *60* (10), 603-607.
360. Wang, Y.; Yang, S.-P.; Wu, Y.; Yue, J.-M., Alkaloids from the fungus *Lactarius subplinthogalus*. *Nat. Prod. Res.* **2004b**, *18* (2), 159-162.
361. Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T., Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2325-2327.
362. Watson, P., Warming to the ice plants. *Tasmanian Nat* **2007**, *129*, 8-15.
363. Weber, D., Mollisianitrile, a new antibiotic from *Mollisia* sp. A59-96. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of biosciences* **2007**, *62* (7/8), 567.
364. Weiss, J.; Sauer, A.; Frank, A.; Unger, M., Extracts and kavalactones of *Piper methysticum* G. Forst (kava-kava) inhibit P-glycoprotein in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (11), 1580-1583.
365. Wheeler, M. H.; Stipanovic, R. D., Melanin biosynthesis in *Thielaviopsis basicola*. *Exp. Mycol.* **1979**, *3* (4), 340-350.
366. Wheeler, M. M.; Wheeler, D.; Peterson, G. W., Anthraquinone pigments from the phytopathogen *Phomopsis juniperovora* hahn. *Phytochemistry* **1975**, *14* (1), 288-289.
367. Whitaker, R. J.; Gaines, C. G.; Jensen, R. A., A multispecific quintet of aromatic aminotransferases that overlap different biochemical pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257* (22), 13550-13556.
368. White Jr, J. F.; Morgan-Jones, G.; Morrow, A. C., Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric., Ecosyst. Environ.* **1993**, *44* (1), 13-37.
369. Wightman, F.; Lighty, D. L., Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* **1982**, *55* (1), 17-24.
370. Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck, P. R.; Rahman, S. K., Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.* **1989**, *52* (6), 1189-1208.
371. Wu, M.-D.; Cheng, M.-J.; Chen, I.-S.; Su, Y.-S.; Hsieh, S.-Y.; Chang, H.-S.; Chang, C.-W.; Yuan, G.-F., Phytochemical investigation of *Annulohyphoxylon ilanense*, an endophytic fungus derived from *Cinnamomum* species. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10* (3), 493-505.
372. Wu, S.-H.; Chen, Y.-W.; Qin, S.; Huang, R., A new spiroketal from *Aspergillus terreus*, an endophytic fungus in *Opuntia ficusindica* Mill. *J. Basic Microbiol.* **2008**, *49* (4), 140-142.

373. Wu, S.; Wu, U. S.; Krings, H.; Zorn, R.; Berger, S.; Wu, Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus (Schaeffer: Fr.) Fr. *Food chemistry* **2005**, *92* (2), 221-226.
374. Wubshet, S. G.; Nyberg, N. T.; Tejesvi, M. V.; Pirttilä, A. M.; Kajula, M.; Mattila, S.; Stärk, D., Targeting high-performance liquid chromatography– high-resolution mass spectrometry– solid-phase extraction– nuclear magnetic resonance analysis with high-resolution radical scavenging profiles– bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium namyslowskii*. *J. Chromatogr. A* **2013**, 34-39.
375. Xia, X.; Li, Q.; Li, J.; Shao, C.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Liu, X.; Lin, Y.; Liu, C.; She, Z., Two new derivatives of griseofulvin from the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. (strain No. 1403) from *Kandelia candel* (L.) Druce. *Planta Med.* **2011**, *77* (15), 1735-1738.
376. Xianzhi, Y.; Lingqi, Z.; Bo, G.; Shiping, G., Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. *Zhong cao yao= Chinese Traditional and Herbal Drugs* **2003**, *35* (1), 79-81.
377. Xie, Z.-Y.; Lin, T.-T.; Yao, M.-C.; Wan, J.-Z.; Yin, S., Unusual guaiane sesquiterpenoids from *Artemisia rupestris*. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96* (6), 1182-1187.
378. 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* (1), 21-25.
379. Xu, J.; Kjer, J.; Sendker, J.; Wray, V.; Guan, H.; Edrada, R.; Lin, W.; Wu, J.; Proksch, P., Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (4), 662-665.
380. Xue, C.; Li, T.; Deng, Z.; Fu, H.; Lin, W., Janthinolide A-B, two new 2, 5-piperazinedione derivatives from the endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from the soft coral *Dendronephthya* sp. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, *61* (12), 1041-1044.
381. Xue, H.; Lu, C.; Liang, L.; Shen, Y., Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalotaxus mannii*. *Records of Natural Products* **2012**, *6* (1), 28-34.
382. Yagi, A.; Okamura, N.; Haraguchi, H.; Abot, T.; Hashimoto, K., Antimicrobial tetrahydroanthraquinones from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* **1993**, *33* (1), 87-91.
383. Yang, J.; Wang, N.; Yuan, H.-S.; Hu, J.-C.; Dai, Y.-C., A new sesquiterpene from the medicinal fungus *Inonotus vaninii*. *Chem. Nat. Compd.* **2013a**, *49* (2), 261-263.
384. Yang, L., Dihydroaltersolanol derivatives - unpublished data. **2013**.
385. Yang, X.-L.; Awakawa, T.; Wakimoto, T.; Abe, I., Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae*. *Tetrahedron Lett.* **2013b**, *54* (43), 5814-5817.
386. Yang, X. Y. H.; Schulz, H.; Elzinga, M.; Yang, S. Y., Nucleotide sequence of the promoter and fadB gene of the fadBA operon and primary structure of the multifunctional fatty acid oxidation protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1991**, *30* (27), 6788-6795.
387. Yang, Y.; Yan, Y.-M.; Wei, W.; Luo, J.; Zhang, L.-S.; Zhou, X.-J.; Wang, P.-C.; Cheng, Y.-X., Anthraquinone derivatives from *Rumex* plants and endophytic *Aspergillus fumigatus* and their effects on diabetic nephropathy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013c**, *23* (13), 3905-3909.
388. Yang, Z.-J.; Yu, Y.; Wang, Z.-Q.; Yang, T.; Chen, D.-J., Cytotoxic metabolites of endophytic fungus *Colletotrichum* sp. from *Aristolochia* spp. *天然产物研究与开发* **2012**, *24* (3), 329-332.
389. Ying, Y. M.; Shan, W. G.; Liu, W. H., Studies on the metabolites of a fungal endophyte *Penicillium* sp. HS-5 from *Huperzia serrata*. *Asian J. Chem.* **2013**, *25* (3), 1208-1210.
390. Yu, G.-C.; Li, X.-C.; Li, Z.-G.; Peng, G.-X.; Fang, S.-H., Effect of chloride ion supply on griseofulvin production. *Chinese Journal of Pharmaceuticals* **2002**, *33* (12), 587-589.

391. Yuen, G. Y.; Kim, K.-N.; Horst, G. L., Use of ELISA and isolation for determining the distribution of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* spp. in asymptomatic creeping bentgrass. *Crop Protect.* **1994**, *13* (4), 296-300.
392. Zain, M., Effect of olive oil on secondary metabolite and fatty acid profiles of *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. ochraceus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2009**, *3* (4), 4274-4280.
393. Zhan, F.; Yang, T.; Han, Y.-p.; Li, G.-y., A new chlorinated diphenyl ether and five known polyketide metabolites from *Penicillium griseofulvum* cib-119. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27* (15), 1393-1397.
394. Zhang, P.; Zhou, P.-P.; Yu, L.-J., An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr. Microbiol.* **2009a**, *59* (3), 227-232.
395. Zhang, P.; Zhou, P. P.; Yu, L. J., An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009b**, *293* (2), 155-159.
396. Zhang, Q.-H.; Tian, L.; Zhou, L.-D.; Zhang, Y.; Li, Z.-F.; Hua, H.-M.; Pei, Y.-H., Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2009c**, *11* (11), 962-966.
397. Zhang, Y.-Q.; Brock, M.; Keller, N. P., Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **2004**, *168* (2), 785-794.
398. Zhang, Y.; Zhang, J.; Zhang, N.; Jiang, Y.; Lu, L.; Wang, S.; Xu, W.; Wang, G.; Zhang, Q.; Xu, H.; Ge, J.; Ma, Y.; Song, R.; Tan, Y., Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (15), 5931-5940.
399. Zhao, J. H.; Zhang, Y. L.; Wang, L. W.; Wang, J. Y.; Zhang, C. L., Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28* (5), 2107-2112.
400. Zhao, W.-Y., Studies on the chemical constituents of secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus fumigatus* (II). *青岛科技大学学报 (自然科学版)* **2007**, *28* (5), 390-393.
401. Zhao, X.; Wang, B.-W.; Yan, X.-F., Effect of arbuscular mycorrhiza on camptothecin content in *Camptotheca acuminata* seedlings *Acta Ecologica Sinica* **2006**, *4*, 010.
402. Zheng, C.-J.; Shao, C.-L.; Guo, Z.-Y.; Chen, J.-F.; Deng, D.-S.; Yang, K.-L.; Chen, Y.-Y.; Fu, X.-M.; She, Z.-G.; Lin, Y.-C.; Wang, C.-Y., Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (2), 189-197.
403. Zhuang, P.; Tang, X.-X.; Yi, Z.-W.; Qiu, Y.-K.; Wu, Z., Two new compounds from marine-derived fungus *Penicillium* sp. F11. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14* (3), 197-203.
404. 刘涛; 李占林; 王宇; 田黎; 裴月湖; 华会明, 海洋来源真菌中二个聚酮类化合物的 NMR 研究. *化学与生物工程* **2012**, *29* (5), 81-84.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
A2780CisR	Cisplatin resistente, humane Ovarialkarzinom Zelllinie
A2780sens	Cisplatin sensitive, humane Ovarialkarzinom Zelllinie
Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub>	Deuteriertes Aceton
Ad	Auf
APCI	Athmospheric Pressure Chemical Ionization
BAEC	Bovine Aortic Endothelial Cells
BALB/3T3	Embryonale murine Fibroblasten Zelllinie
Bp	Basenpaare
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriertes Chloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Co-Enzym A
CoA	Co-Enzym A
COSY	Correlation Spectroscopy
Cyp3A23	Zytochrom 3A23
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDBJ	DNA Data Bank of Japan

## ***Abkürzungen***

---

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Deuteriertes DMSO
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
ED <sub>50</sub>	Mittlere effektive Dosis
EI	Electron Impact Ionization
EMNL	European Nucleotide Archive
ESI	Electrospray Ionization
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOAc	Ethylacetat
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HCT116	Humane Kolonkarzinom Zelllinie
Hep3B	Humane Leberzellkarzinom Zelllinie
HepG2	Humane Leberzellkarzinom Zelllinie
HL-60	Human Promyelocytic Leukemia Cells
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells

---

Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration (bei halbmaximaler Wirkung)
ipdC	Indolpyruvatdecarboxylase
K562	Humane Leukämie Zelllinie
kb	Kilobasen
KB	Epithelkarzinom Zelllinie
KbE	Koloniebildende Einheit
KBv200	Multiresistente humane Mundschleimhautkarzinom Zelllinie
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
L	Liter
L5178Y	Murine Lymphom Zelllinie
m	Multipllett
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung
MA	Malz-Agar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7, Mammakarzinom Zelllinie
MCF-7/ADR	Michigan Cancer Foundation – 7, multiresistente Mammakarzinom Zelllinie
MD1-MB231	Humane Adenomkarzinom Zelllinie
MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub>	Deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
Mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale inhibitorische Konzentration
MHz	Megahertz

## *Abkürzungen*

---

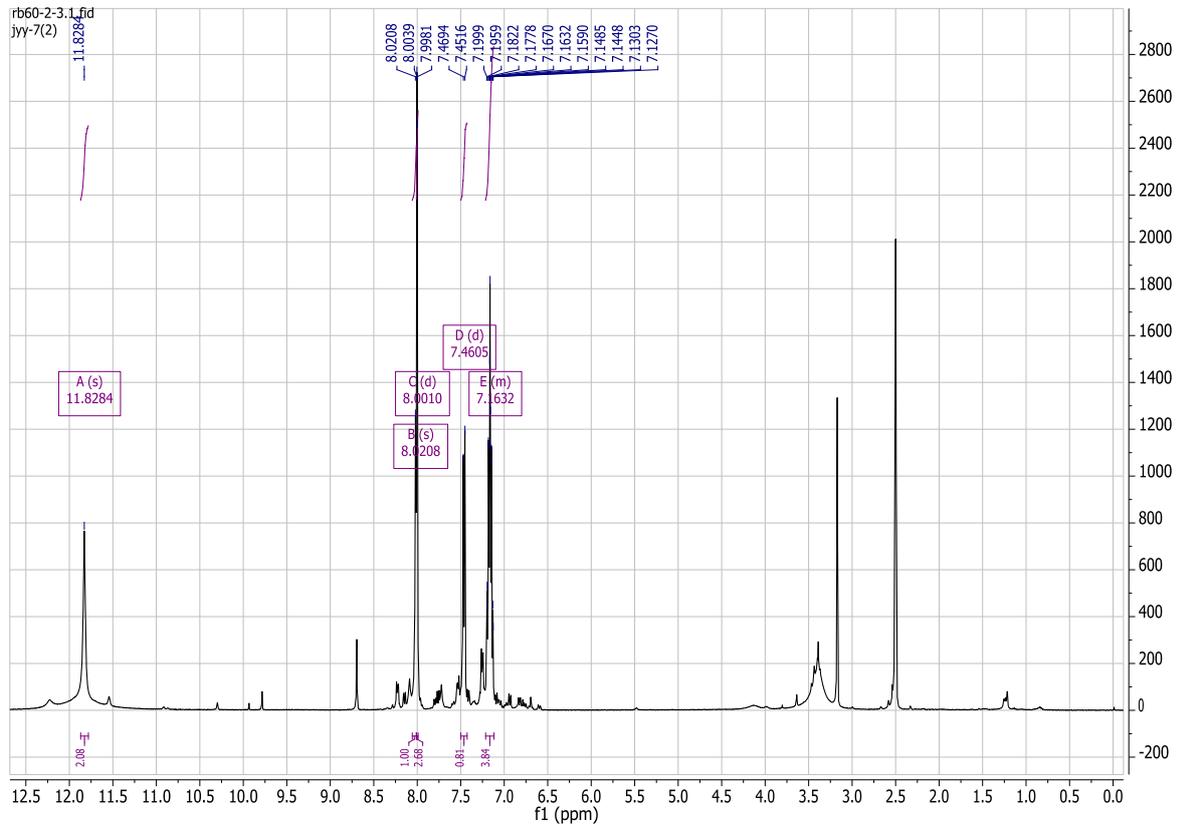
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MOLT-3	Akute lymphoblastische Leukämie Zelllinie
MS	Massenspektrometrie
MTT	Microculture Tetrazolium Assay
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAL	Phenylalaninammoniaklyase
PBS	Phosphate Puffered Saline
PC-3	Humane Prostatakarzinom Zelllinie
PDB	Protein Data Bank
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	Parts per Million
q	Quartett
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP 18	Reversed phase C18
rpm	Rounds per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s	Singulet
SAM	S-Methyladenosin
SW1116	Kolon Adenokarzinom Zelllinie
t	Triplett

---

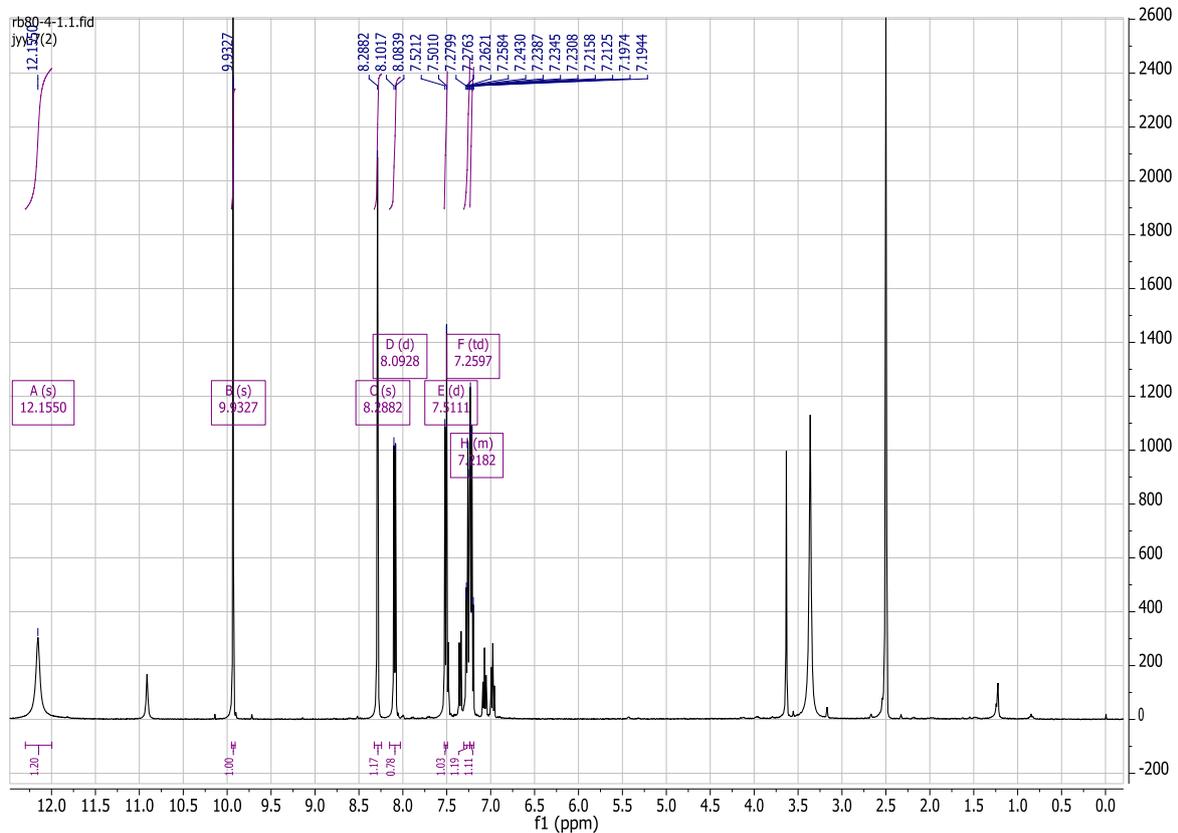
TAL	Thyrosinalaninammoniaklyase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TFA	Triflouressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Trp	Tryptophan
U	Units
U/mL	Einheiten pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenkonzentration
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
$\Delta$	Delta
$\lambda$	Lambda

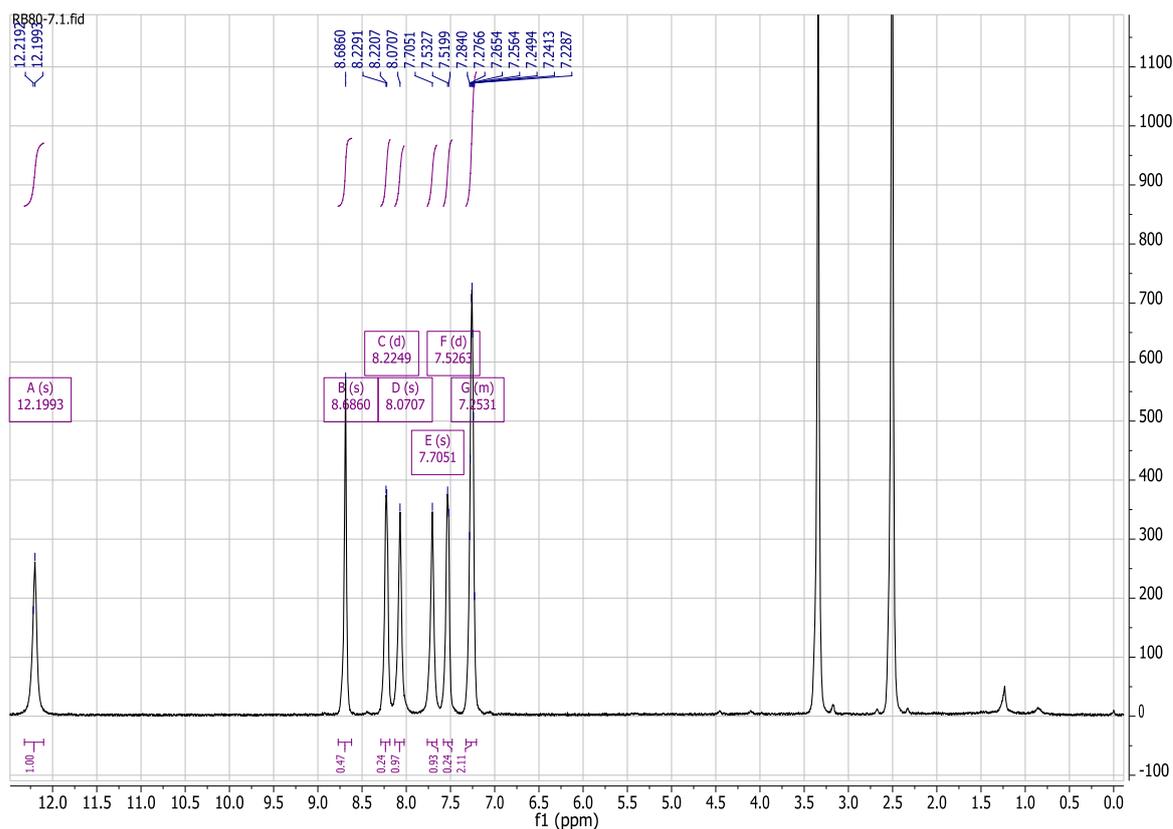
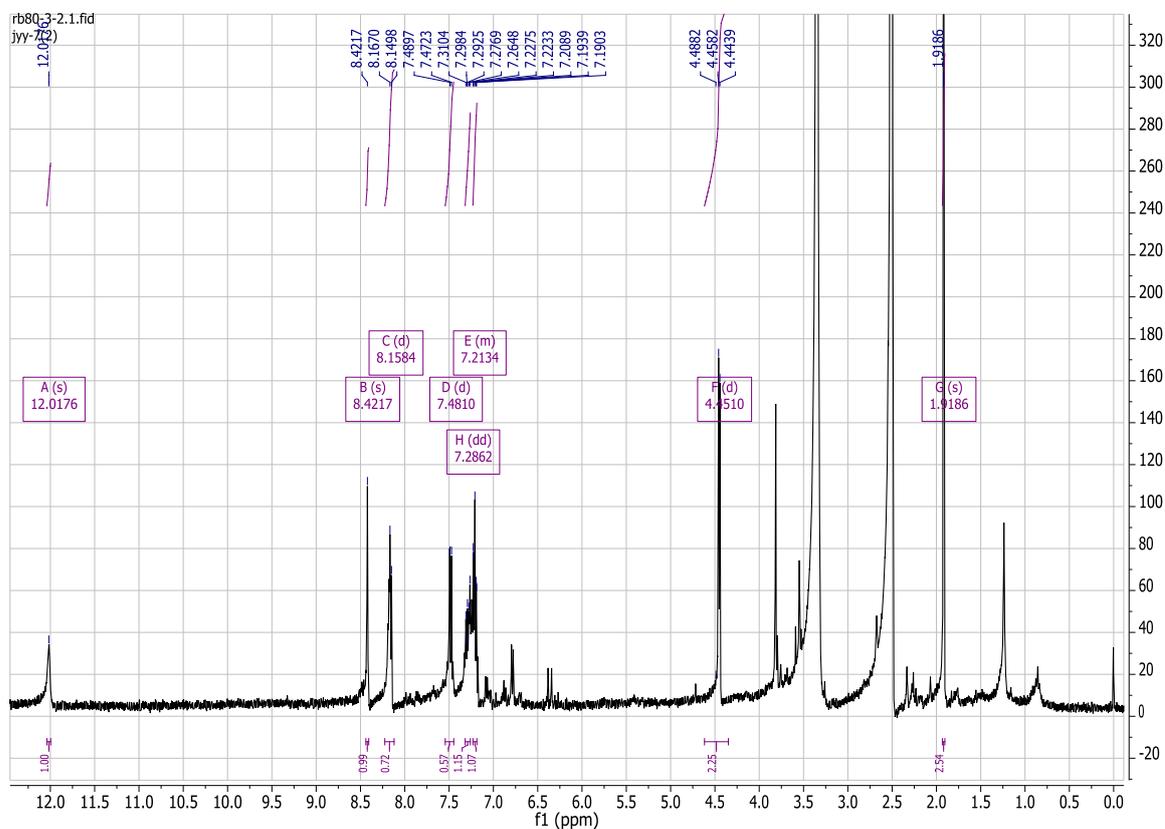
8. Anhänge

Anhang 1:  $^1\text{H}$  NMR von Indol-3-carbonsäure gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

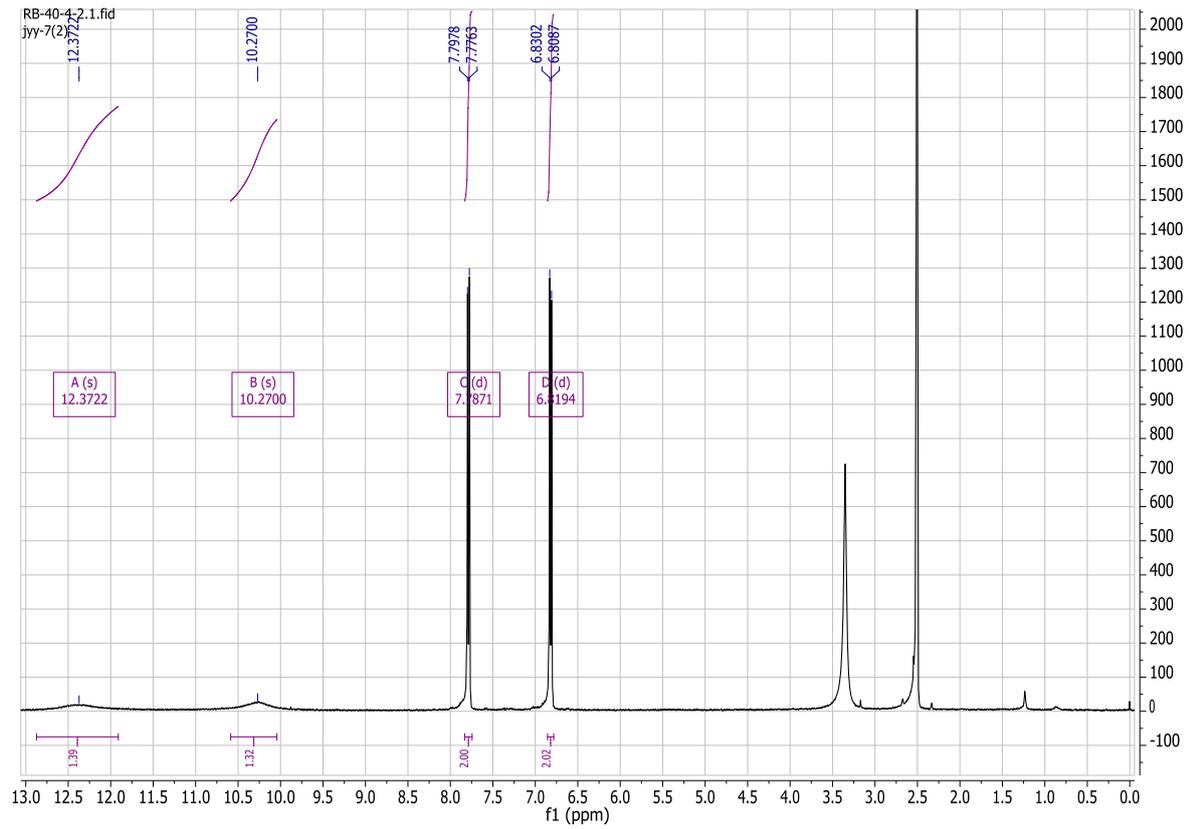


Anhang 2:  $^1\text{H}$  NMR von Indol-3-aldehyd gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

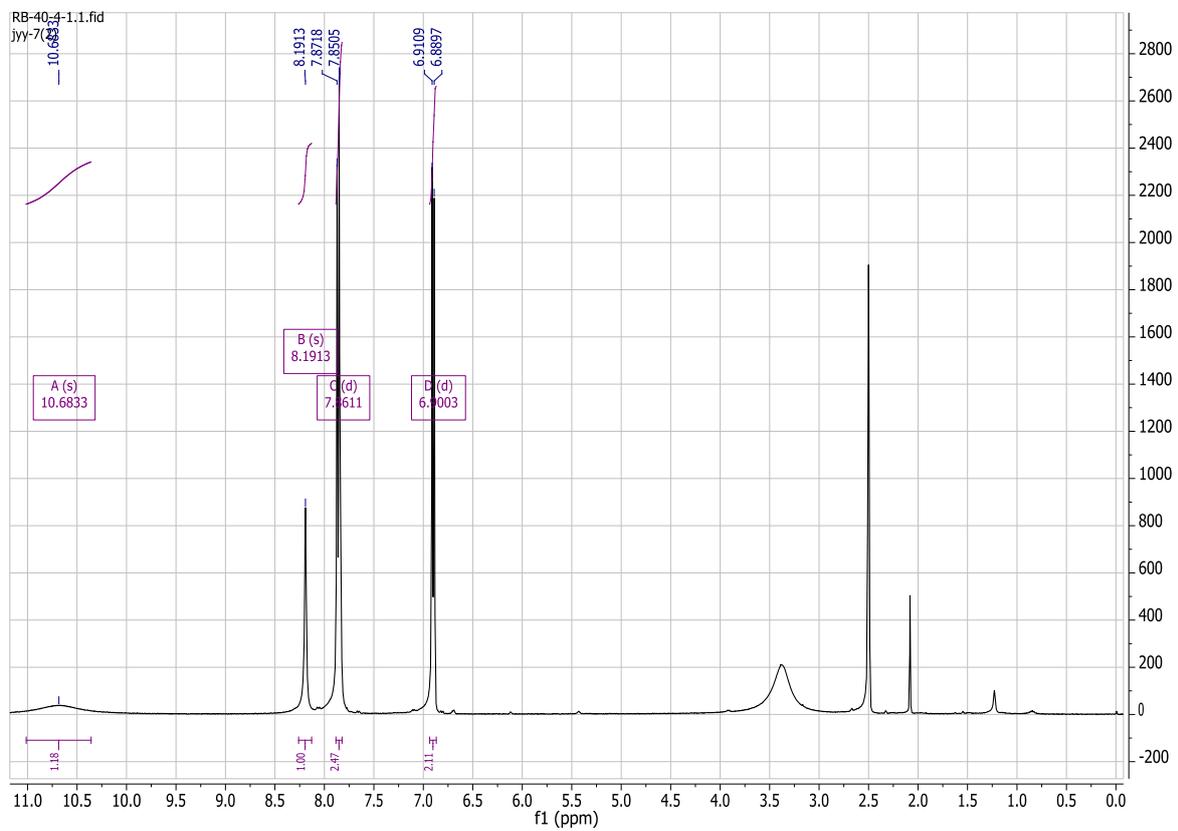


Anhang 3:  $^1\text{H}$  NMR Indol-3-amin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$ Anhang 4:  $^1\text{H}$  NMR von *N*-[(Indol-3-ylcarbonyl)methyl]-acetamid gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$ 

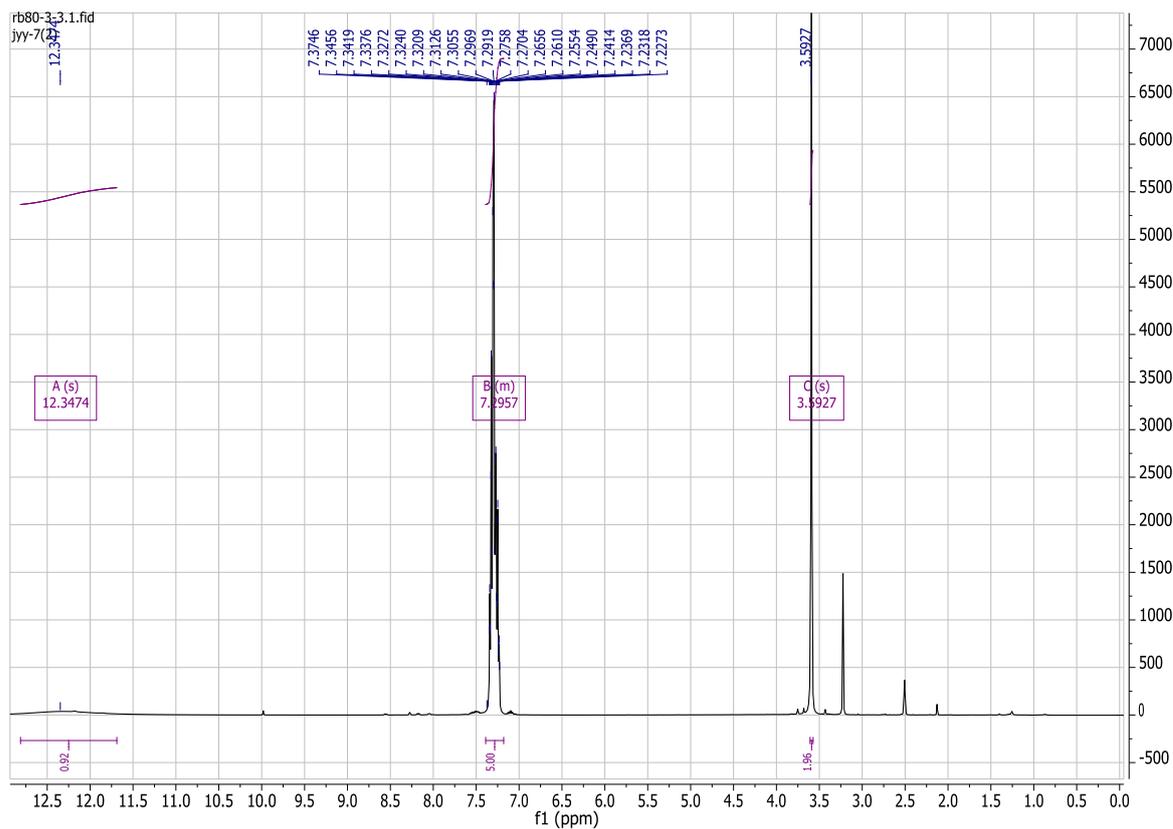
Anhang 5:  $^1\text{H}$  NMR von *p*-Hydroxybenzoesäure gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



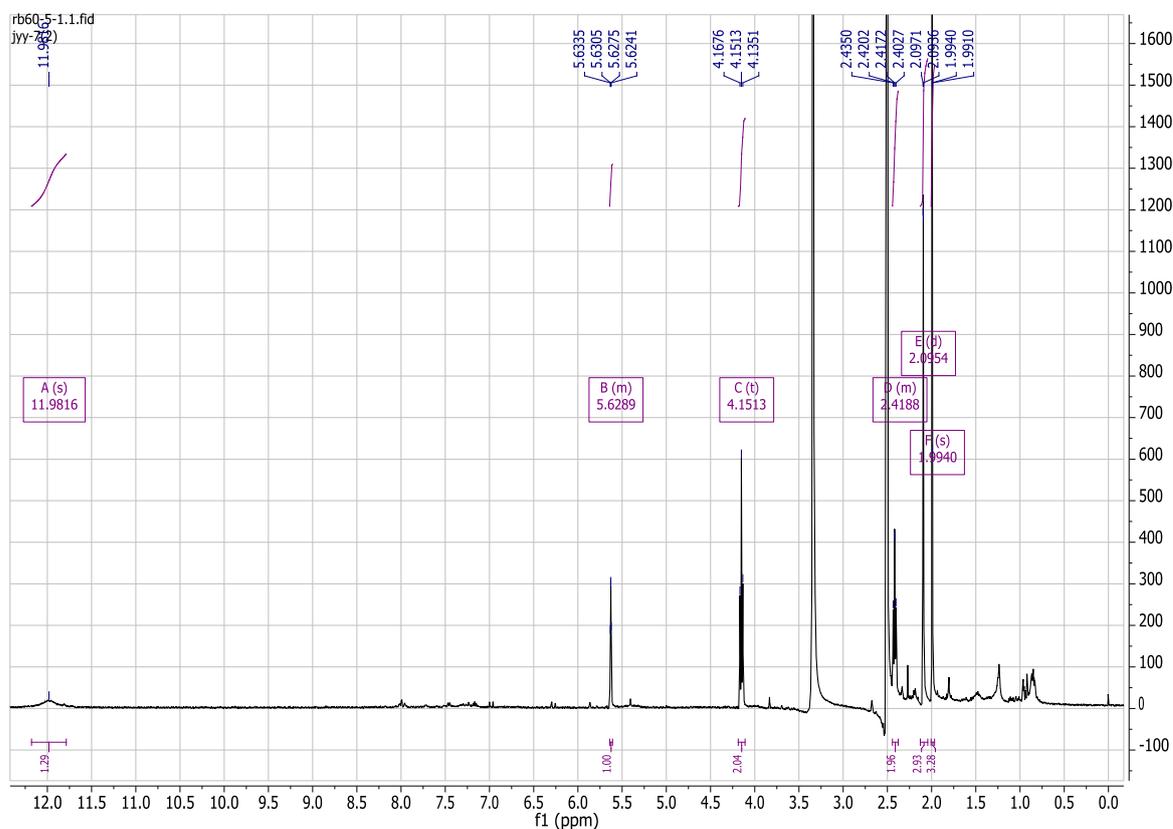
Anhang 6:  $^1\text{H}$  NMR von *p*-Hydroxybenzaldehyd gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



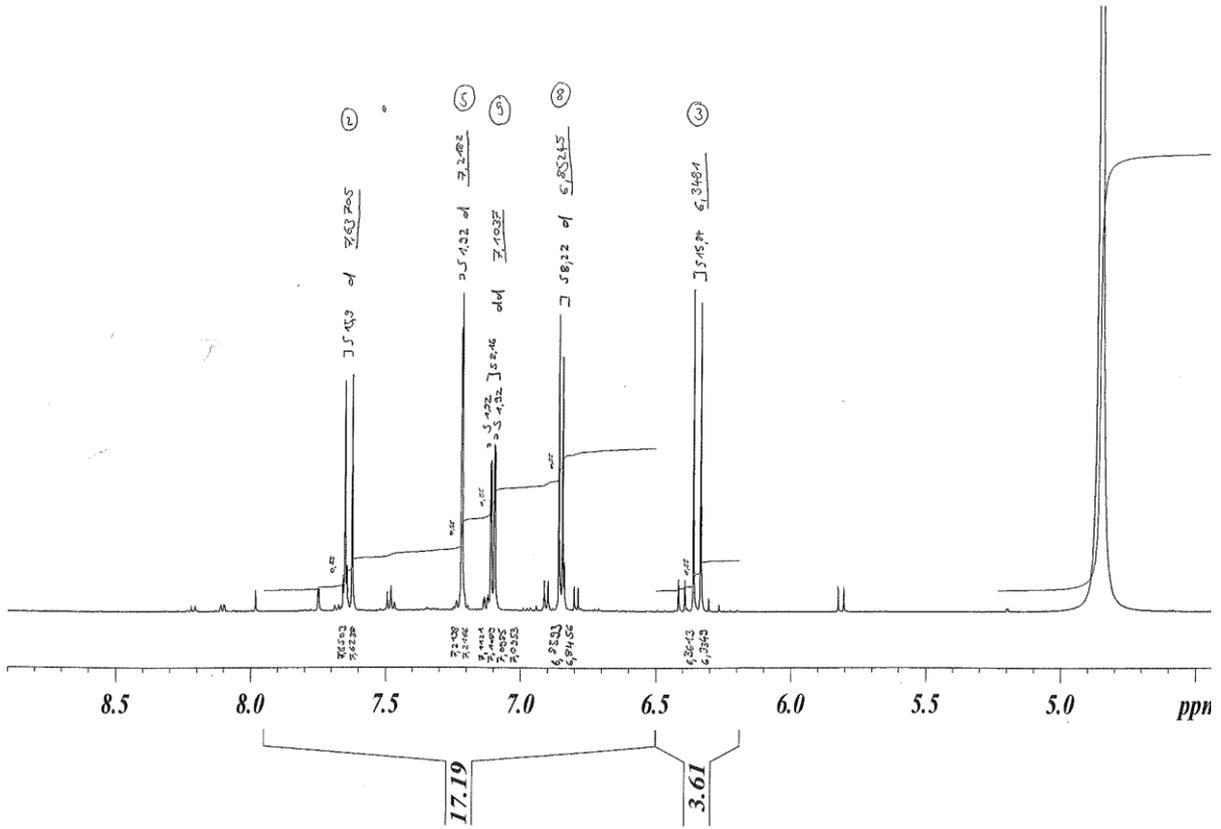
Anhang 7:  $^1\text{H}$  NMR von Phenylelessigsäure gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



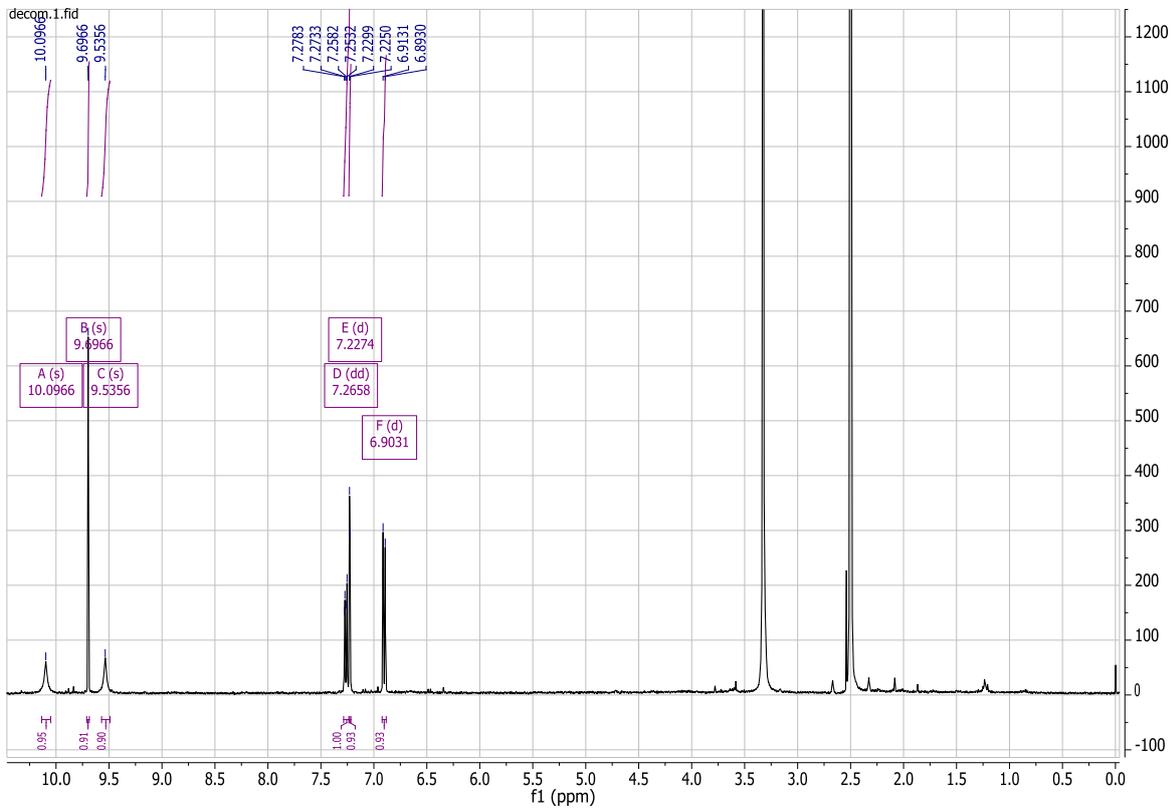
Anhang 8:  $^1\text{H}$  NMR von 5-Methyl-4-hexensäure gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

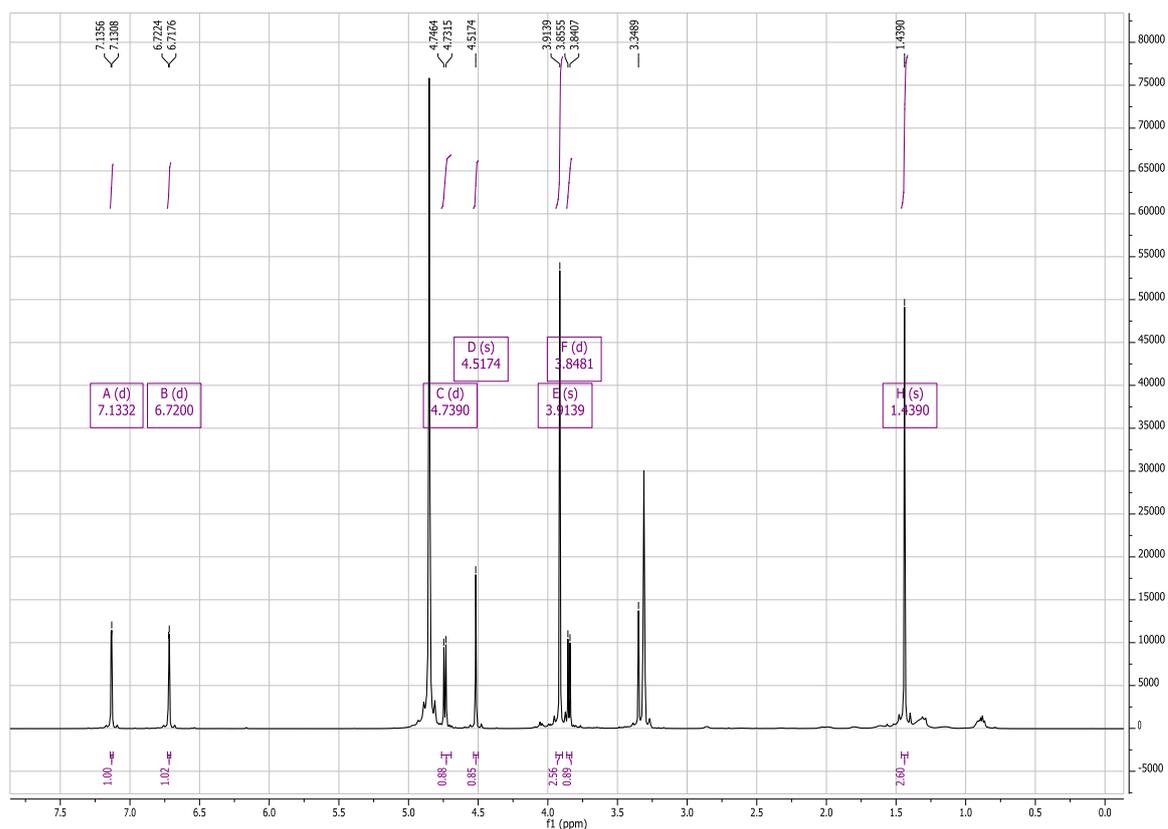
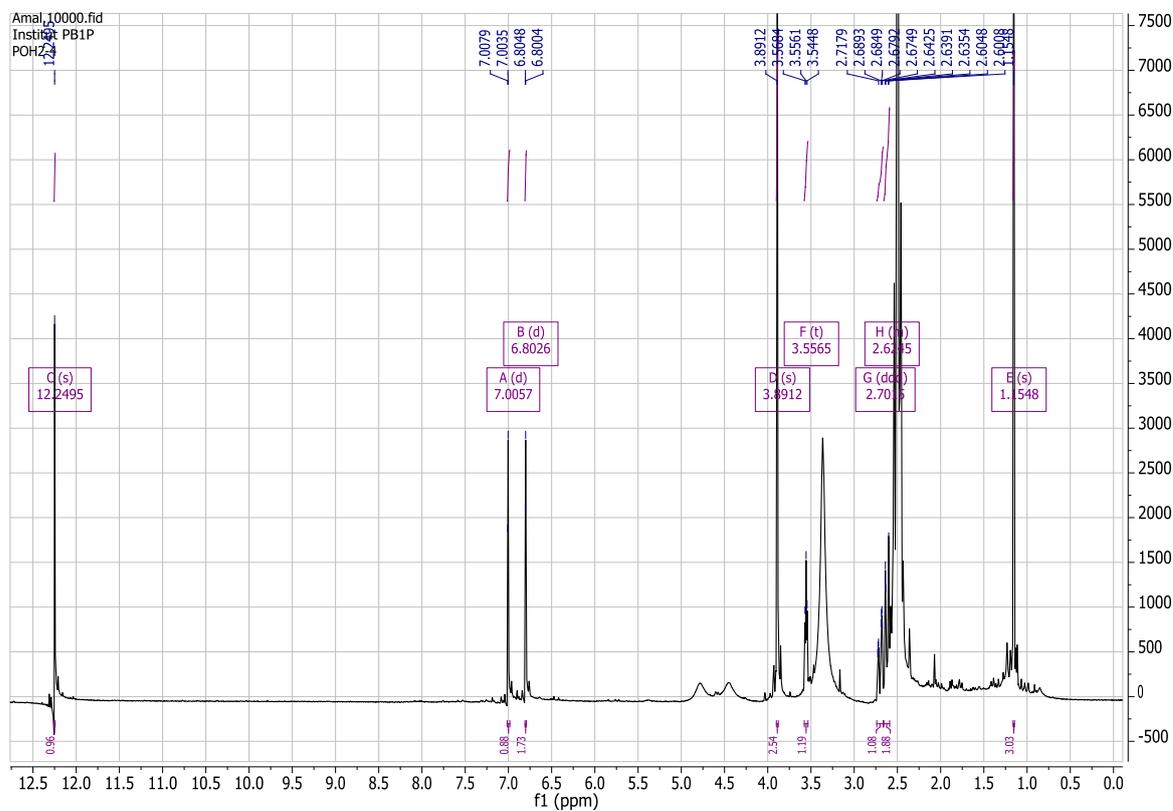


Anhang 9:  $^1\text{H}$  NMR von *t*-Ferulasäure gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD-}d_4$

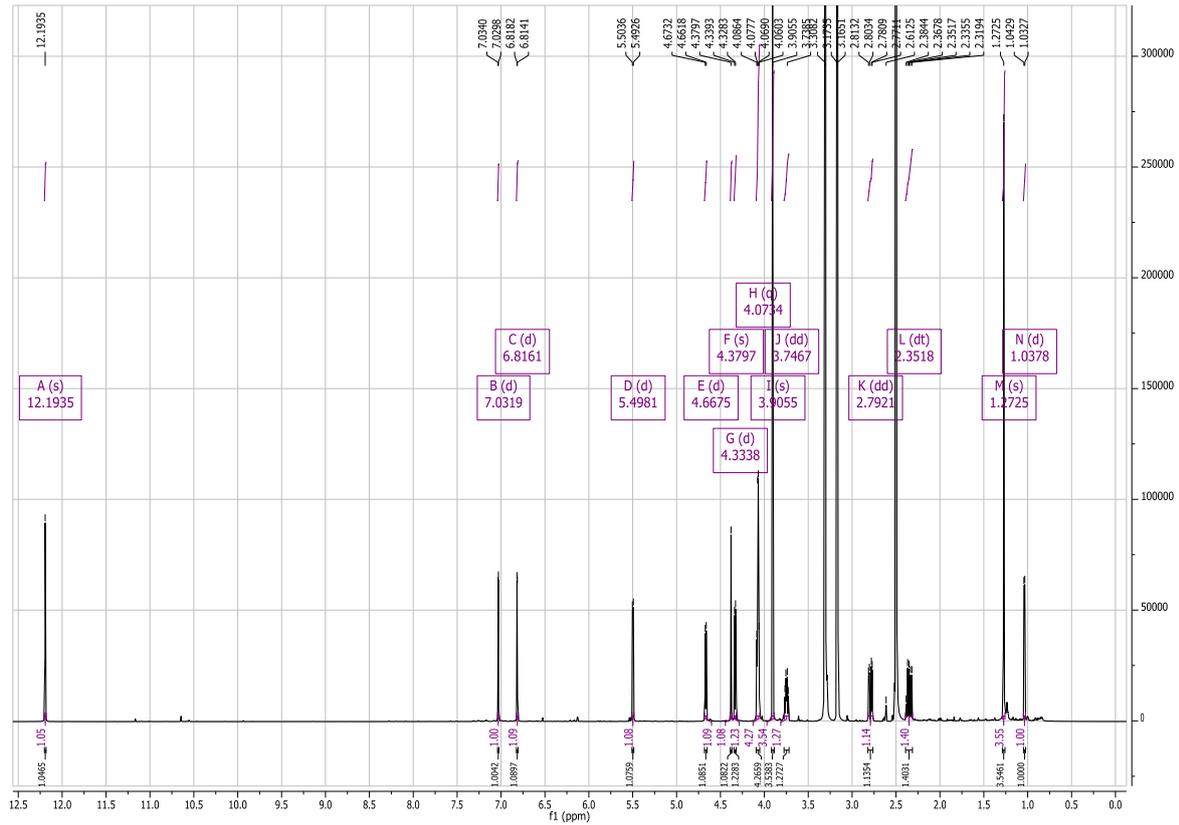


Anhang 10:  $^1\text{H}$  NMR von Protocatechualdehyd gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

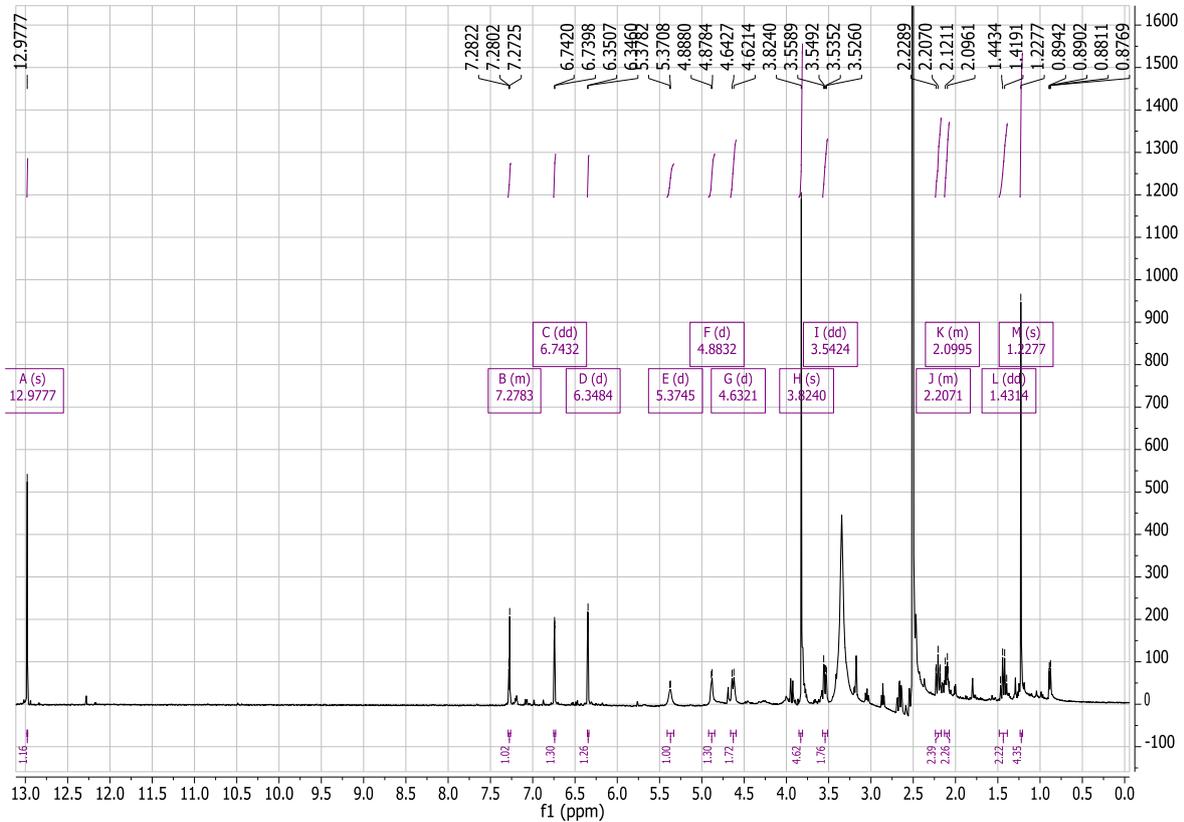


Anhang 11:  $^1\text{H}$  NMR von Altersolanol A gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD-}d_4$ Anhang 12:  $^1\text{H}$  NMR von Altersolanol B gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$ 

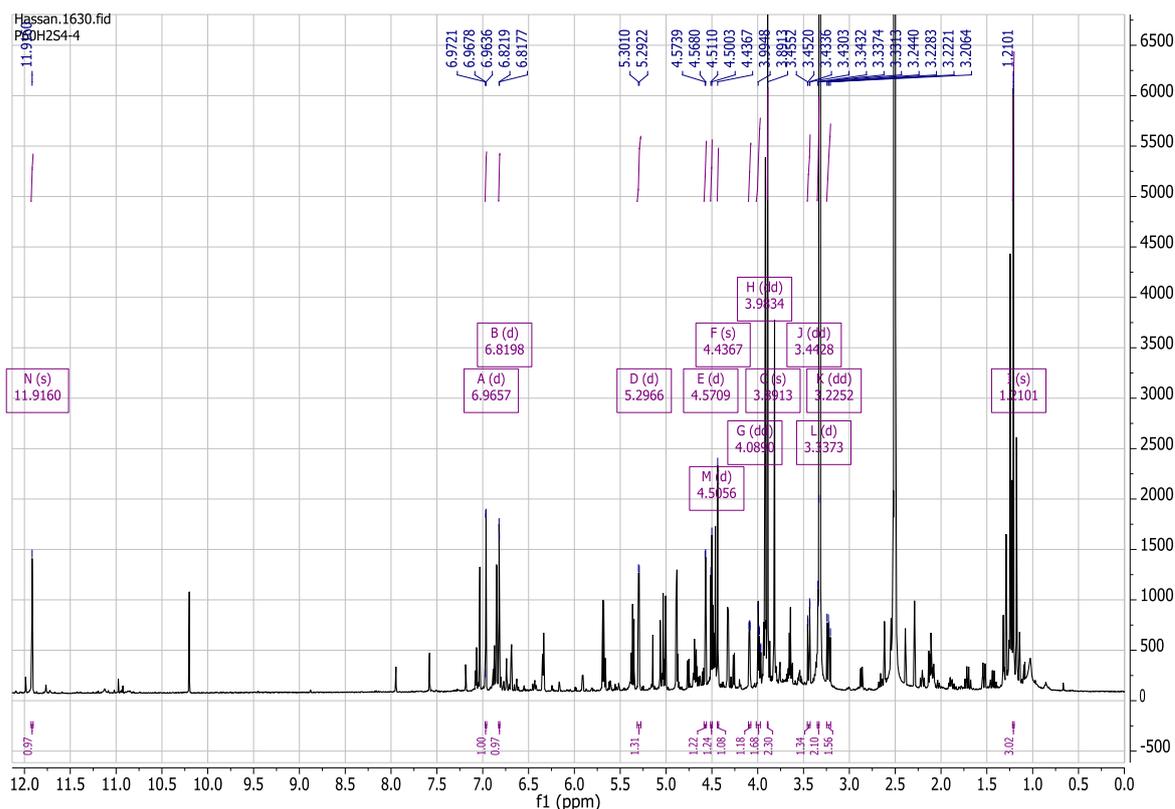
Anhang 13:  $^1\text{H}$  NMR von Altersolanol C gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



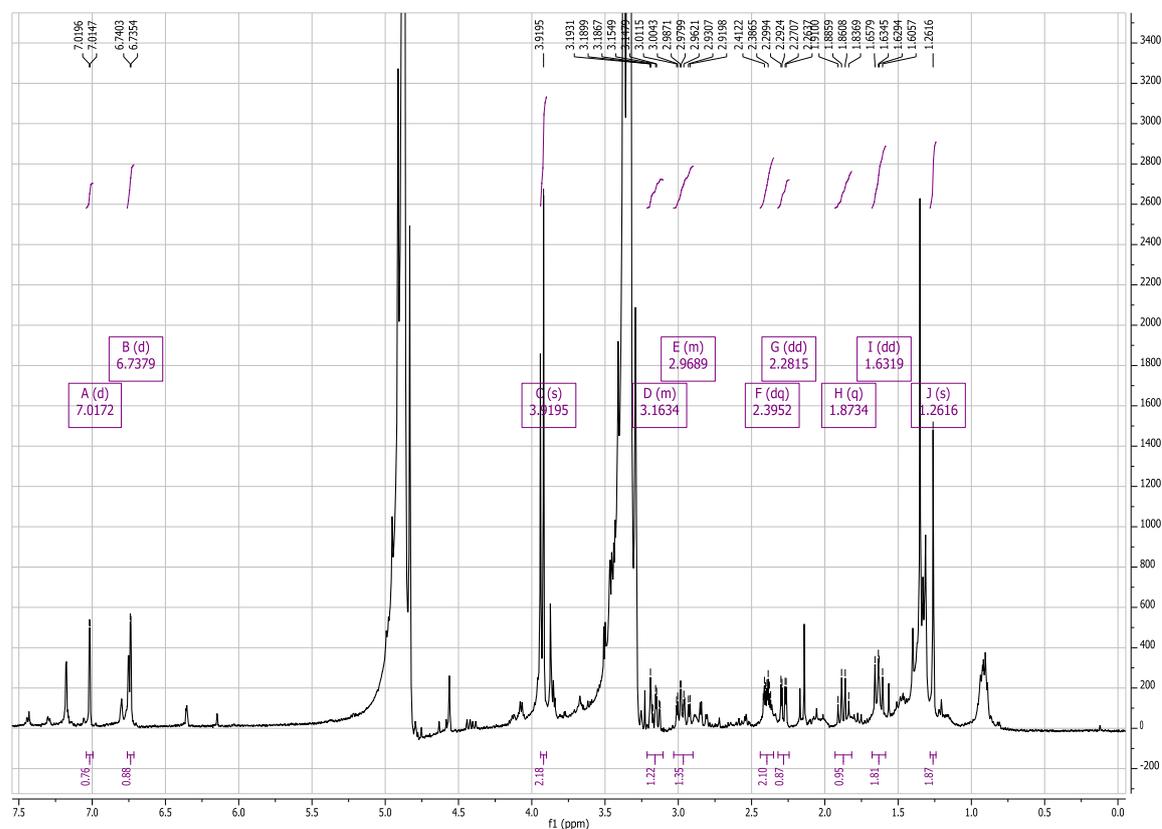
Anhang 14:  $^1\text{H}$  NMR von Altersolanol L gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



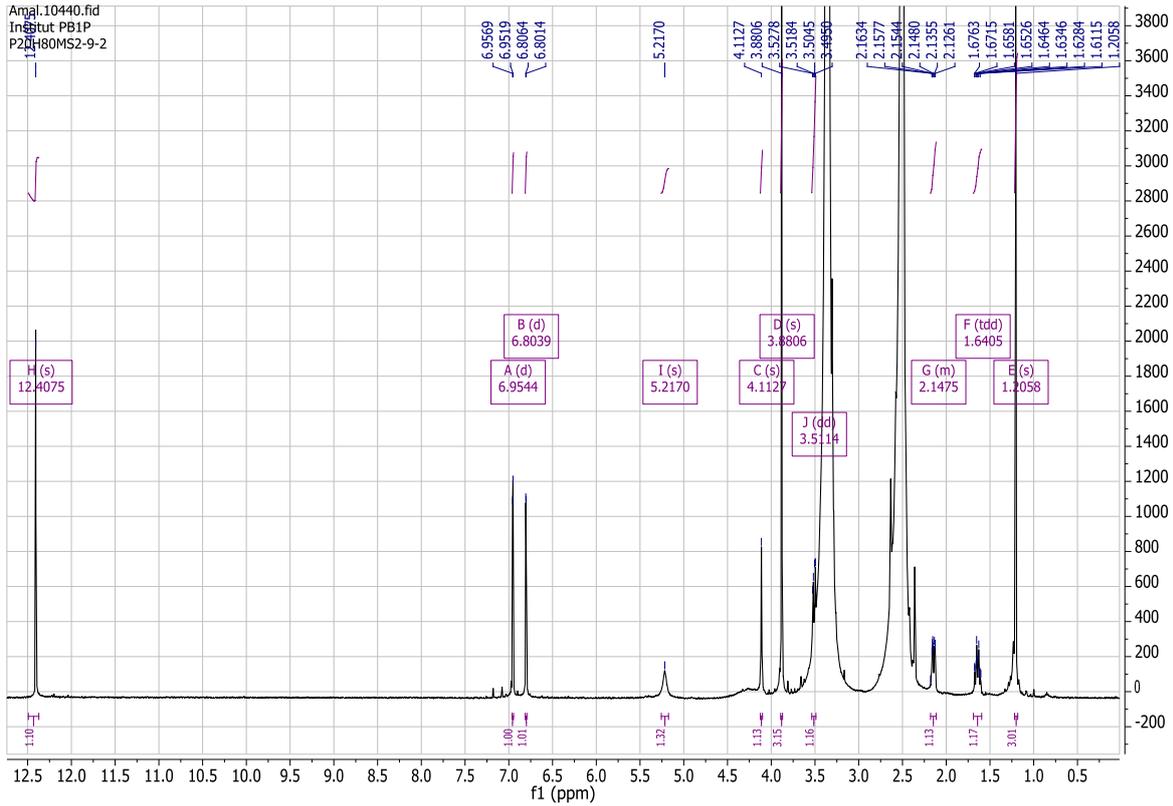
Anhang 15:  $^1\text{H}$  NMR von Dihydroaltersolanol A gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO}-d_6$



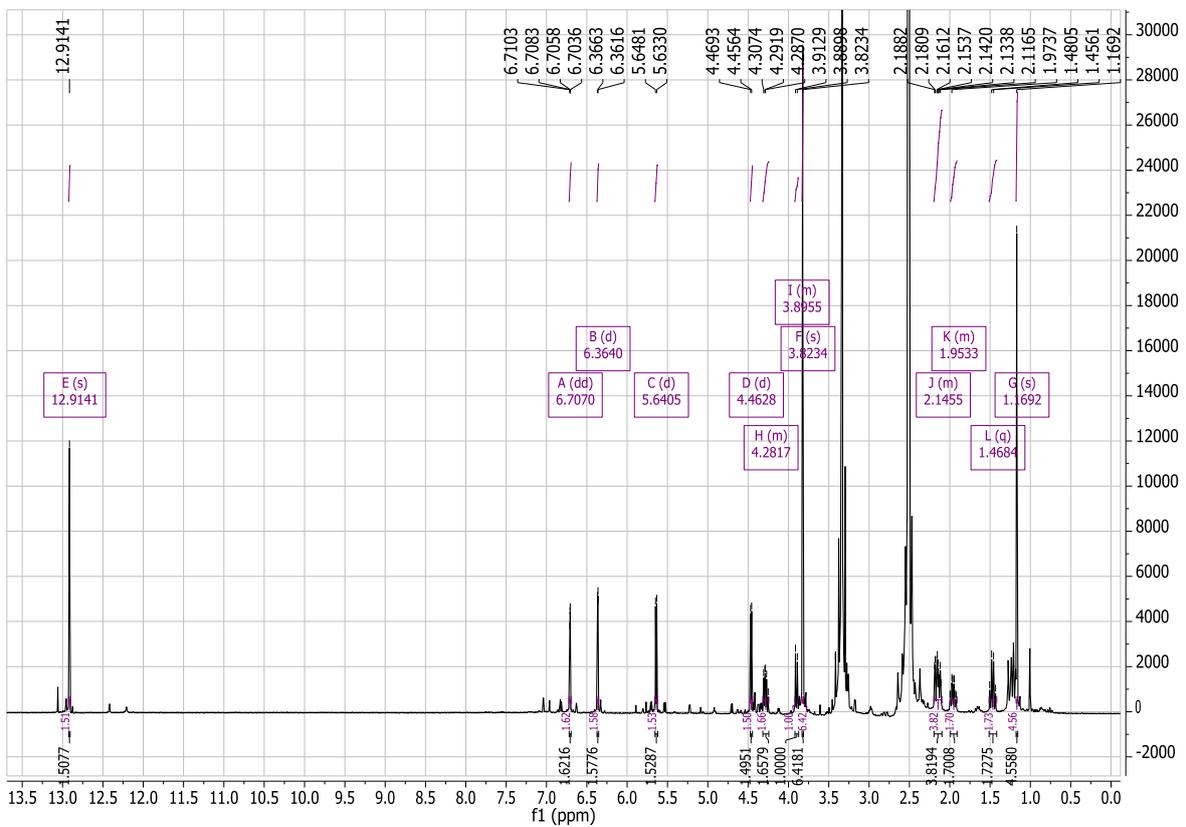
Anhang 16:  $^1\text{H}$  NMR von Dihydroaltersolanol B gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD}-d_4$



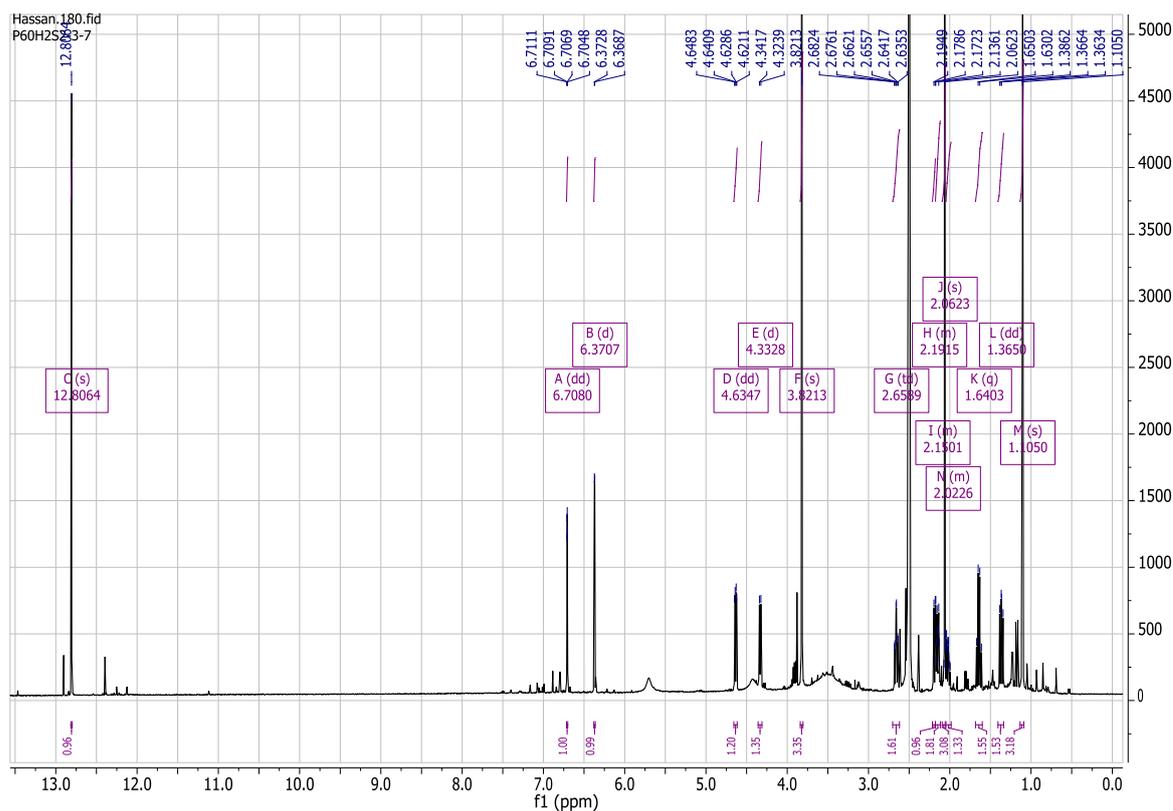
Anhang 17:  $^1\text{H}$  NMR von Dihydroaltersolanol C gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



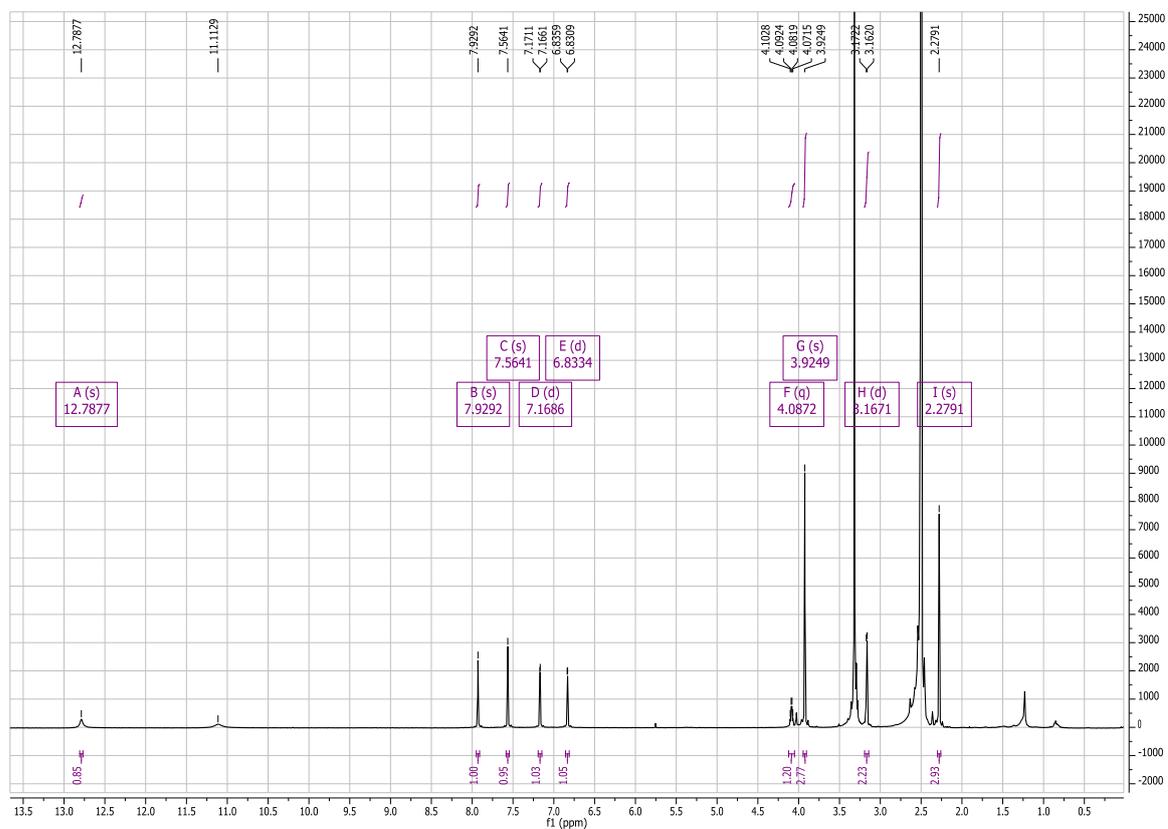
Anhang 18:  $^1\text{H}$  NMR von Tetrahydroaltersolanol B gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



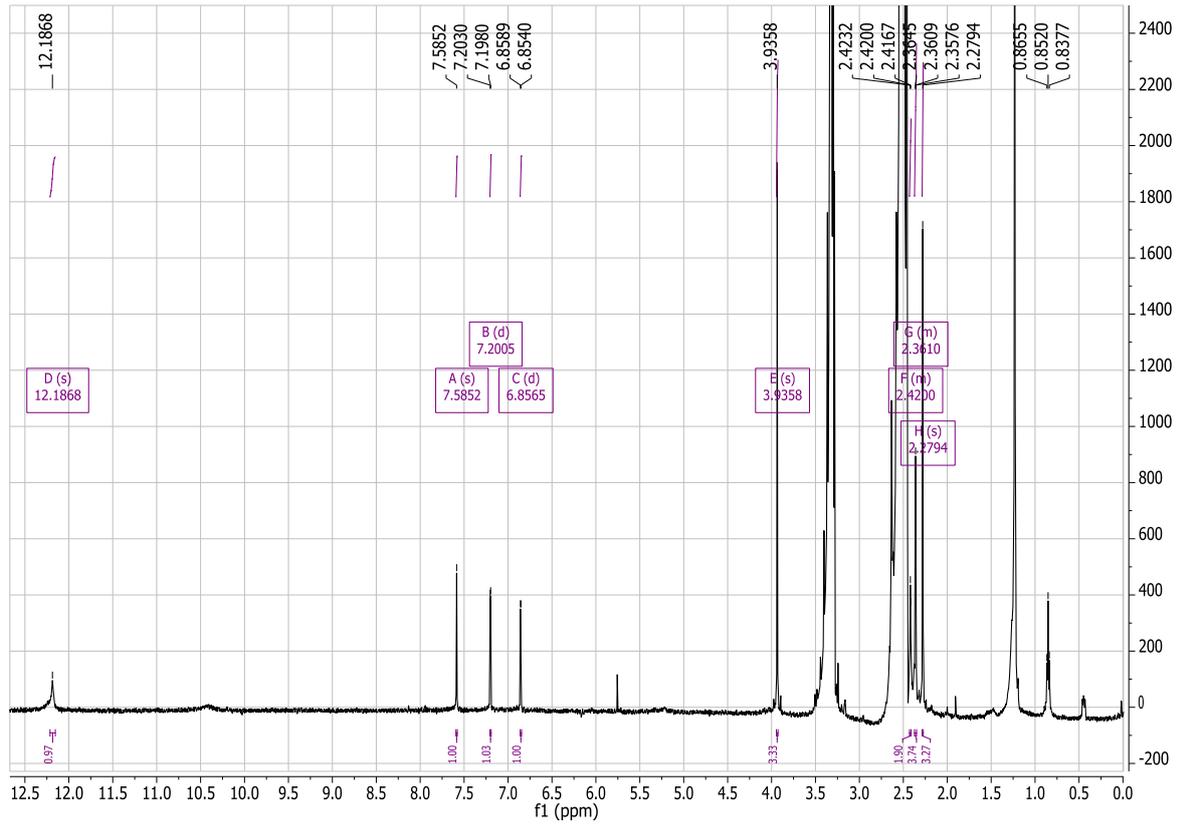
Anhang 19: <sup>1</sup>H NMR von Tetrahydroaltersolanol F gemessen bei 600MHz in DMSO-d<sub>6</sub>



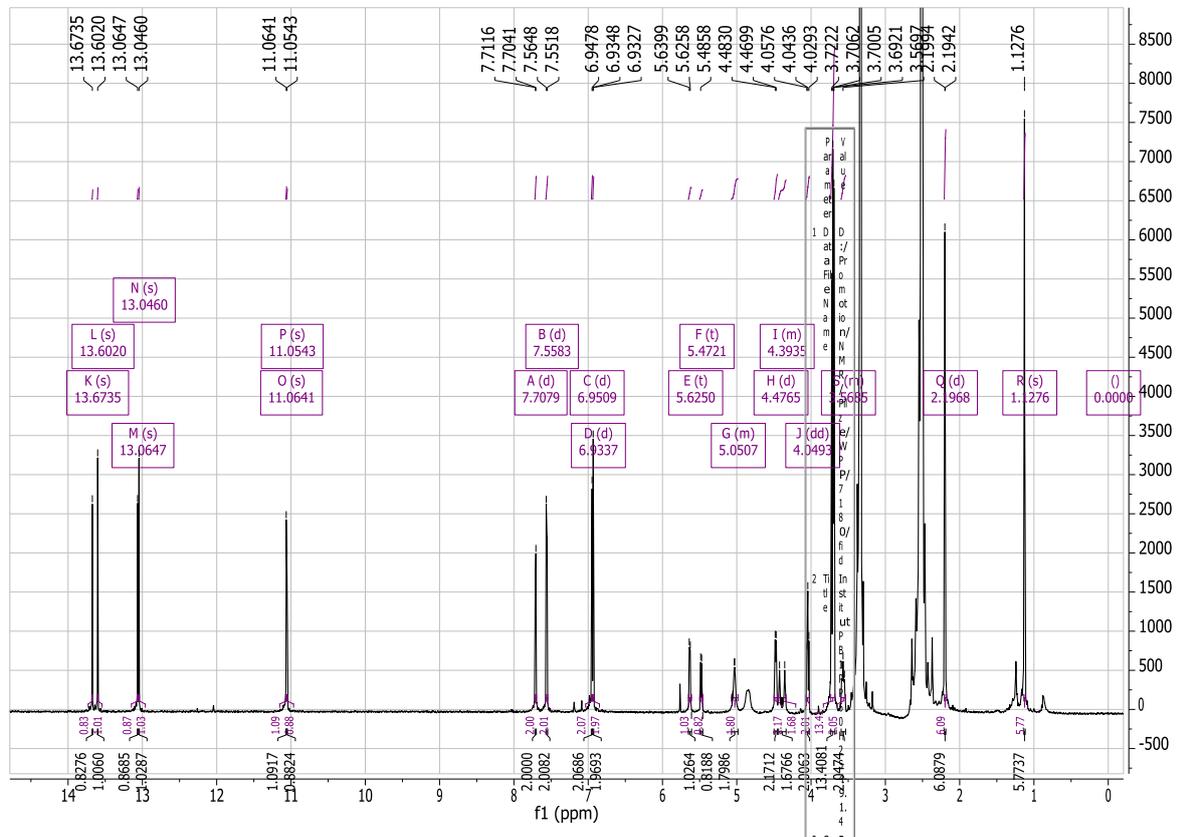
Anhang 20: <sup>1</sup>H NMR von Macrosporin gemessen bei 500MHz in DMSO-d<sub>6</sub>

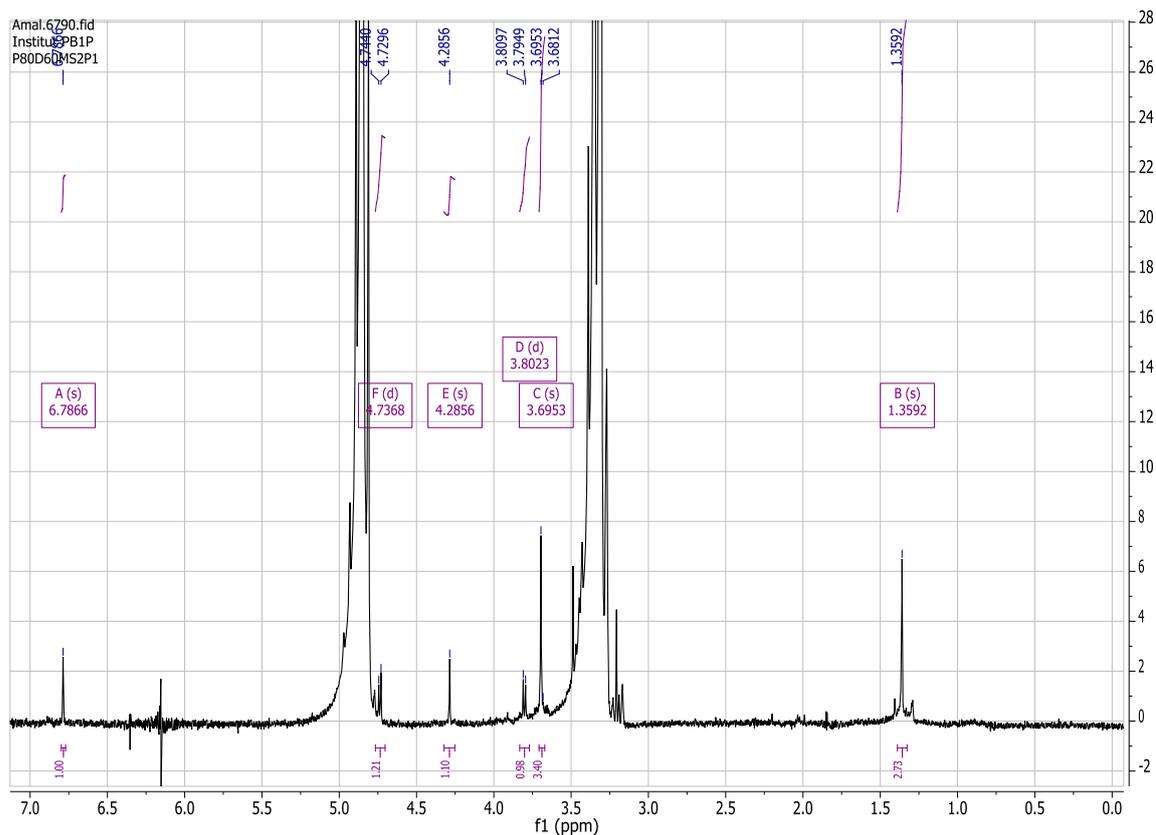
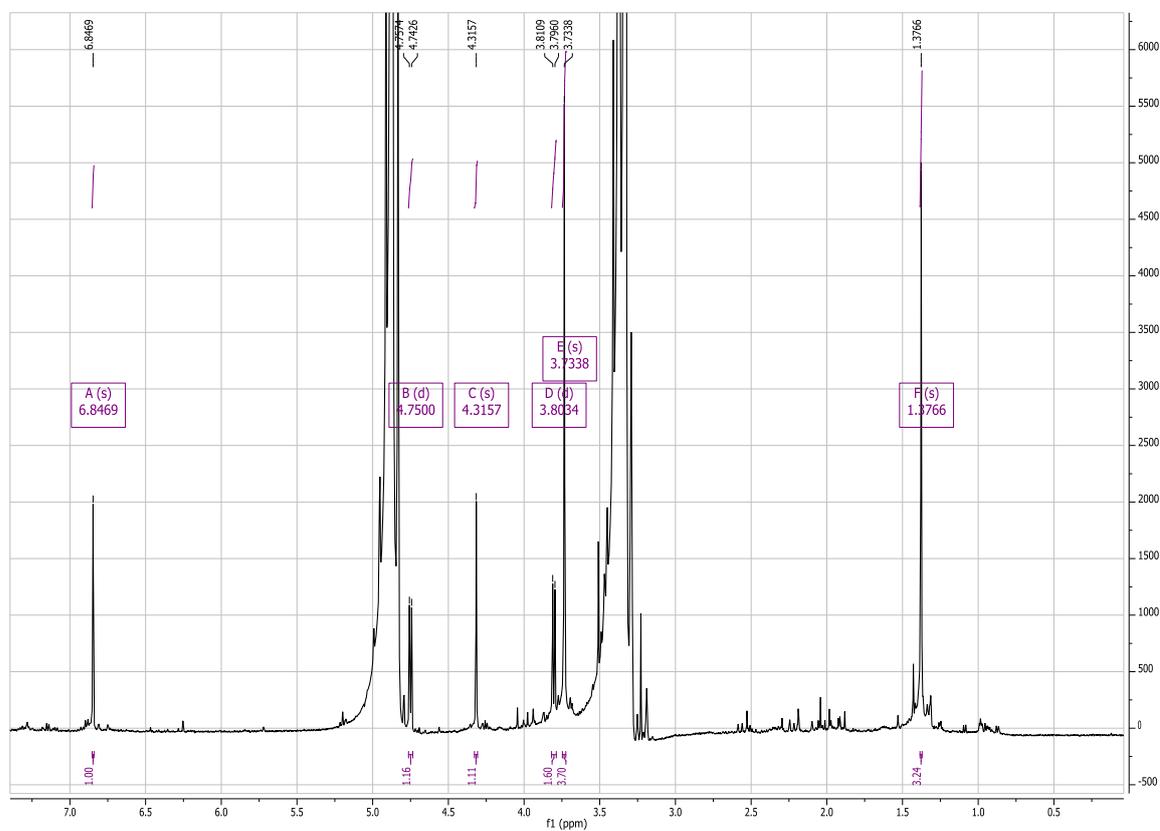


Anhang 21:  $^1\text{H}$  NMR von Methylalaternin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

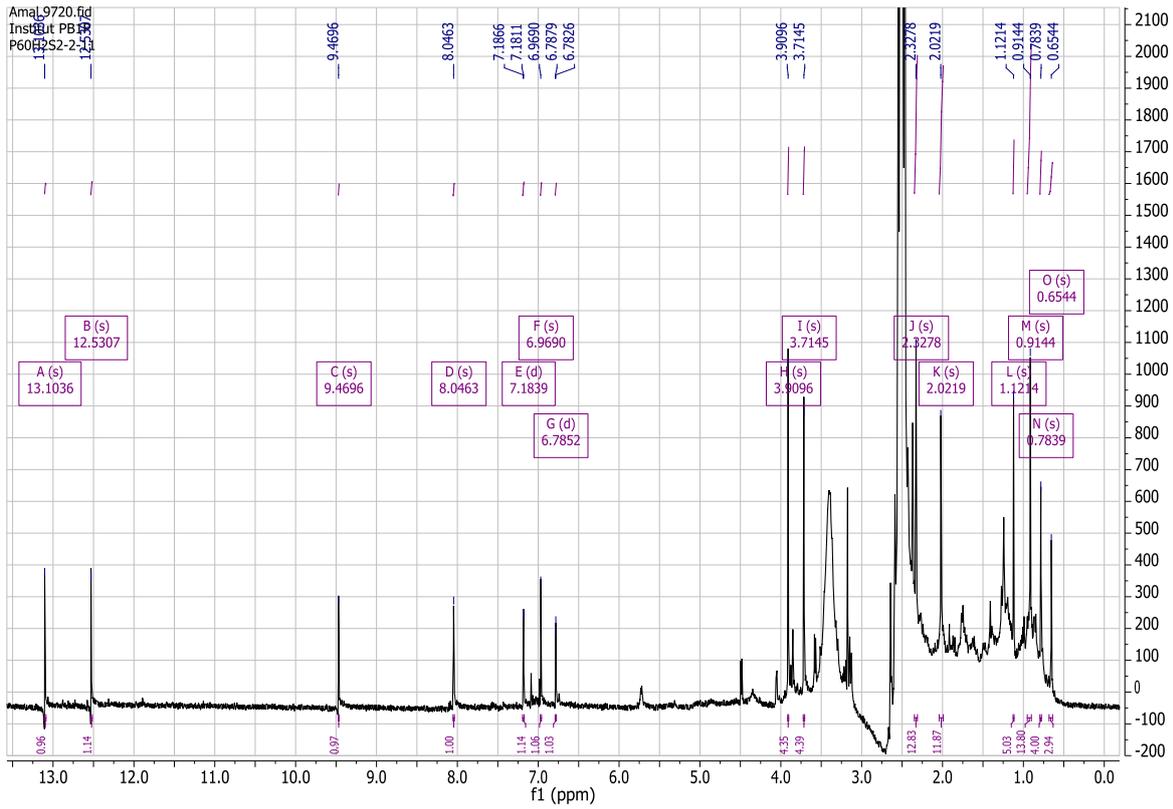


Anhang 22:  $^1\text{H}$  NMR von Alterporriol A+B gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD-}d_4$

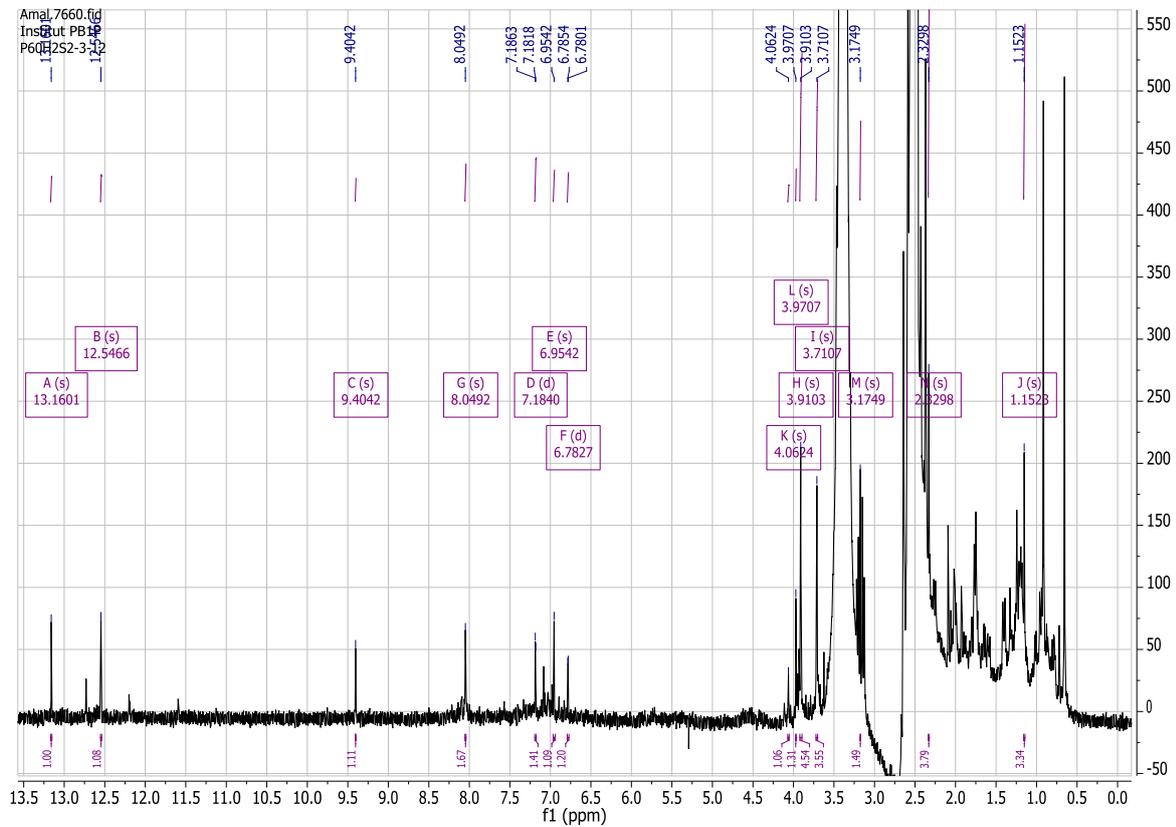


Anhang 23:  $^1\text{H}$  NMR von Alterporriol D gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD-}d_4$ Anhang 24:  $^1\text{H}$  NMR von Alterporriol E gemessen bei 500MHz in  $\text{MeOD-}d_4$ 

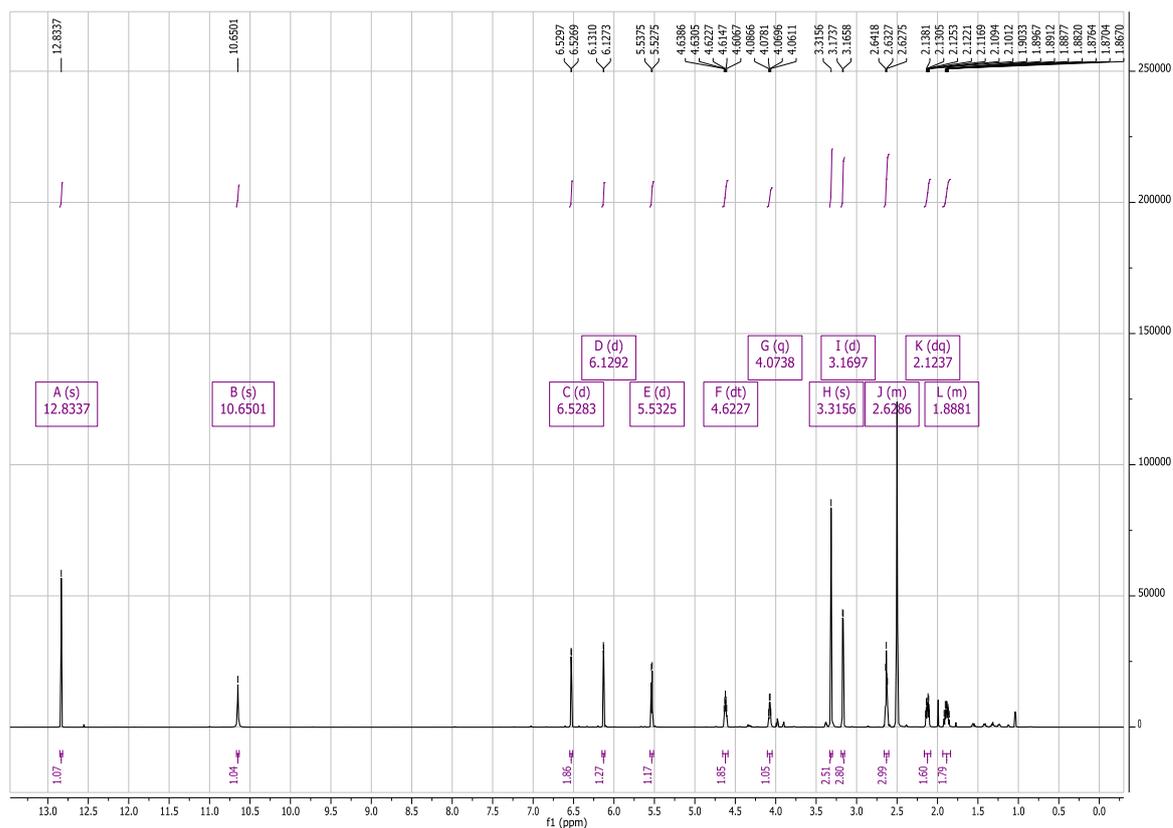
Anhang 25:  $^1\text{H}$  NMR von Alterporriol N gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



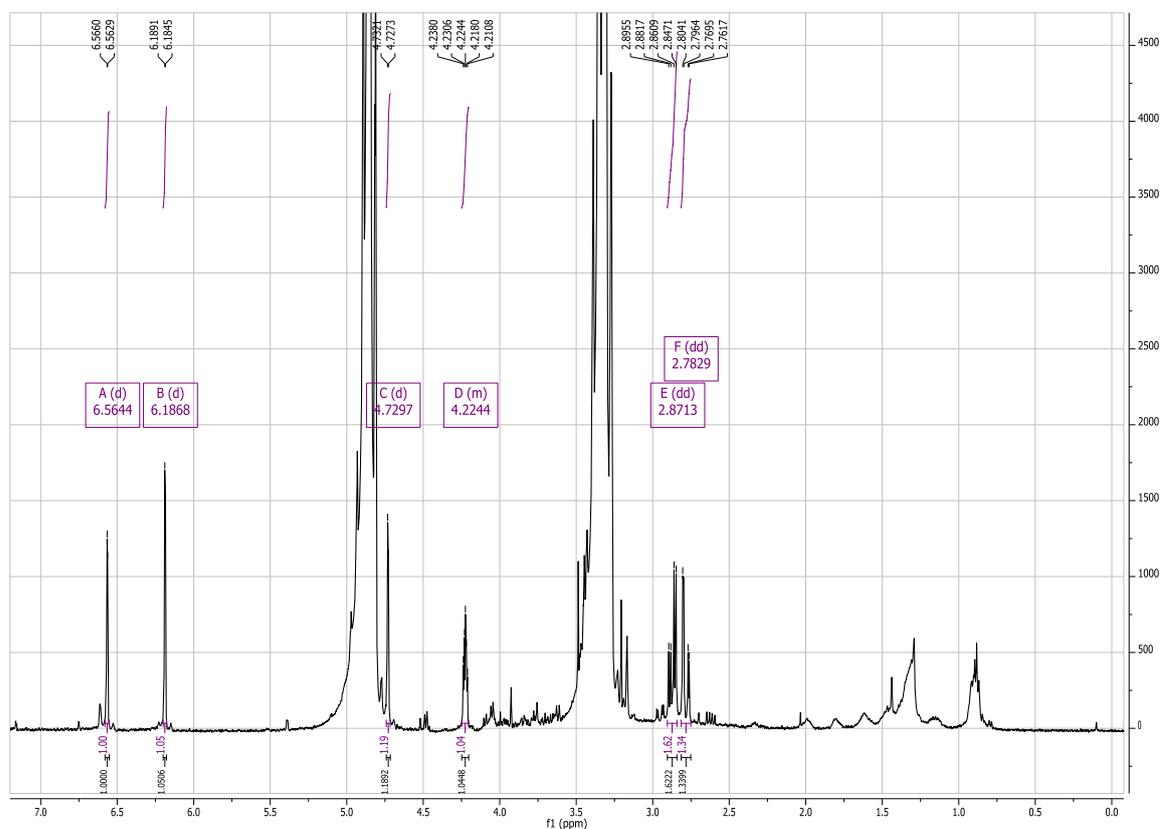
Anhang 26:  $^1\text{H}$  NMR von Alterporriol P gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



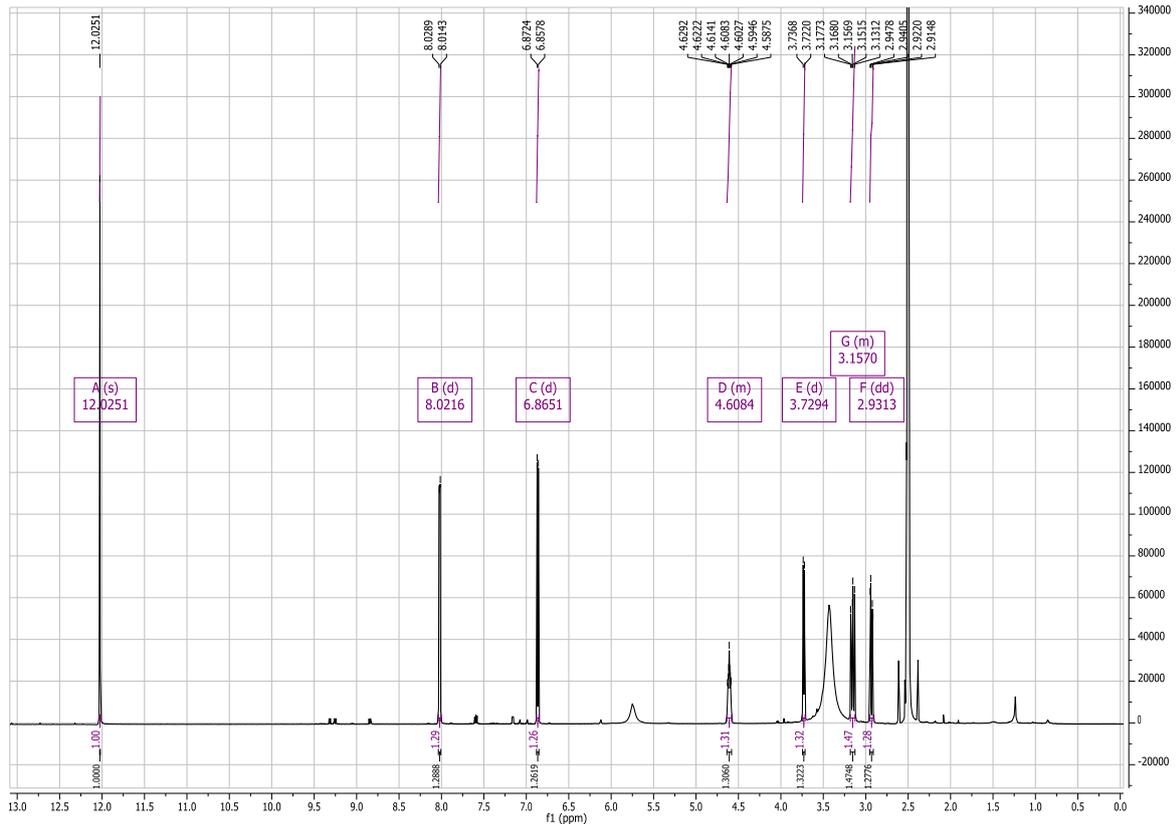
Anhang 27: <sup>1</sup>H NMR von Isoscleron gemessen bei 600MHz in DMSO-d<sub>6</sub>



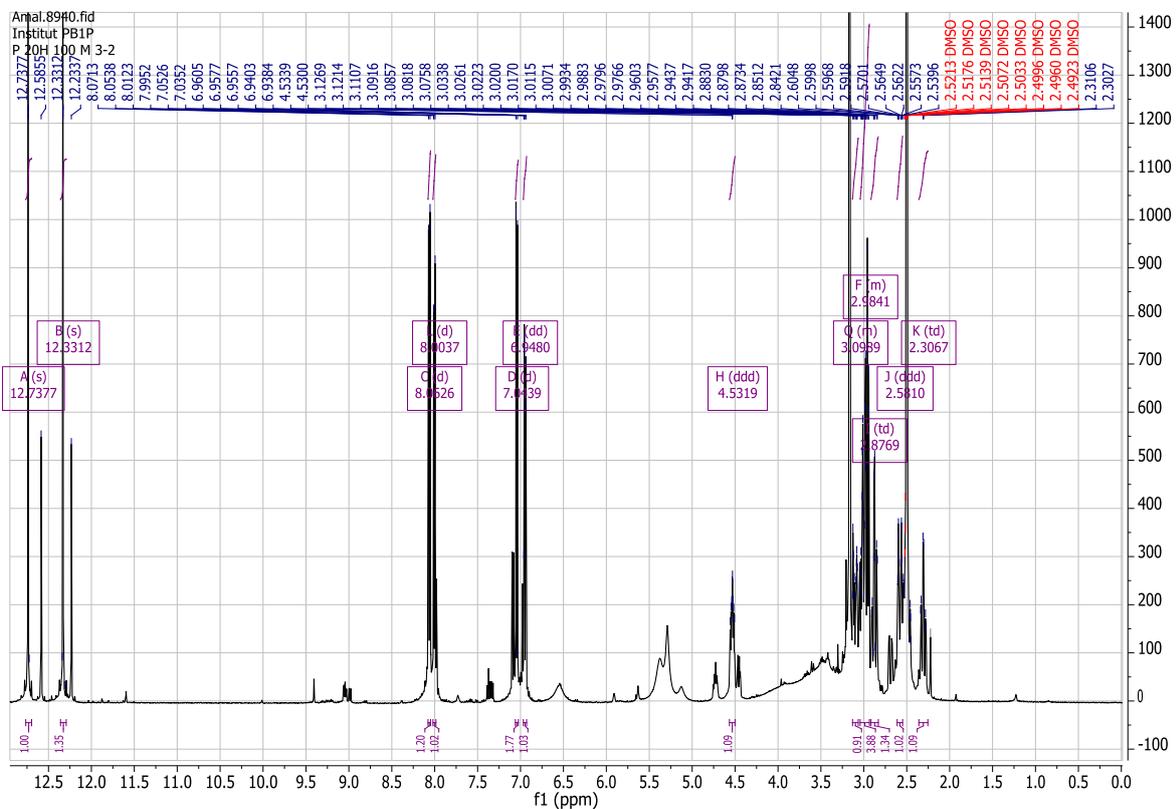
Anhang 28: <sup>1</sup>H NMR von 4-Hydroxysclaton gemessen bei 500MHz in MeOD-d<sub>4</sub>

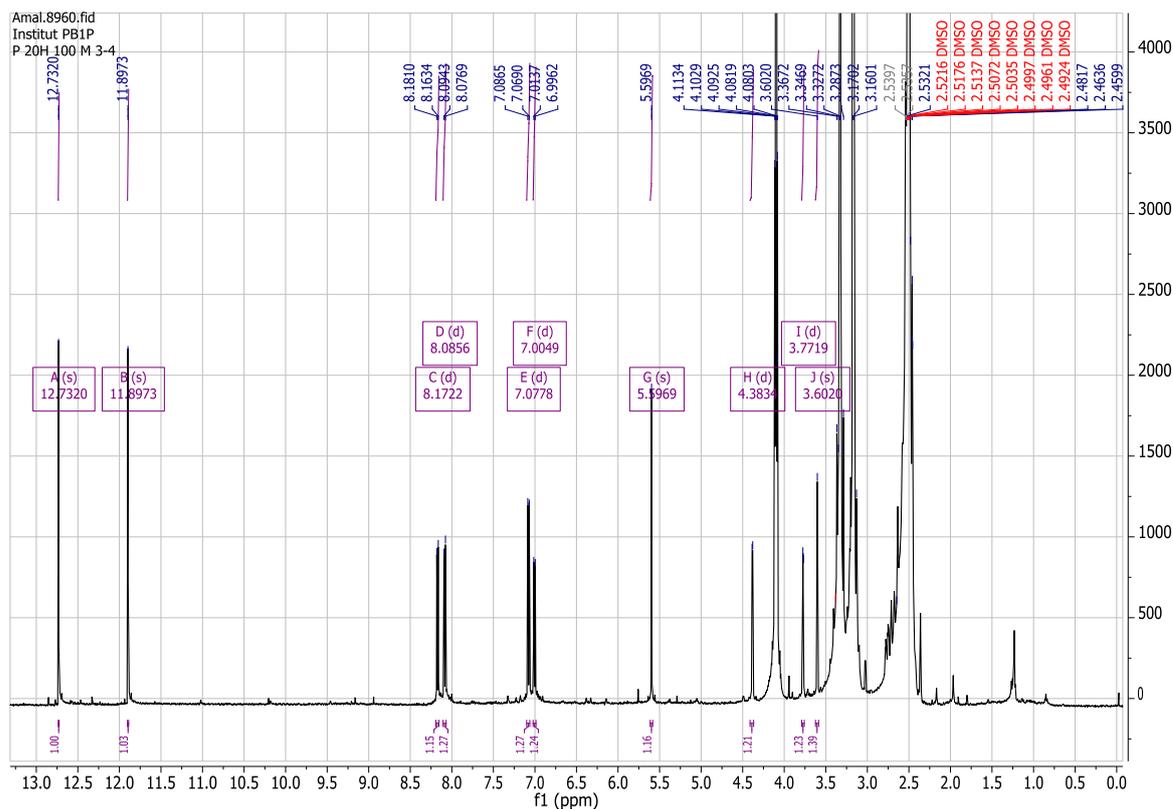
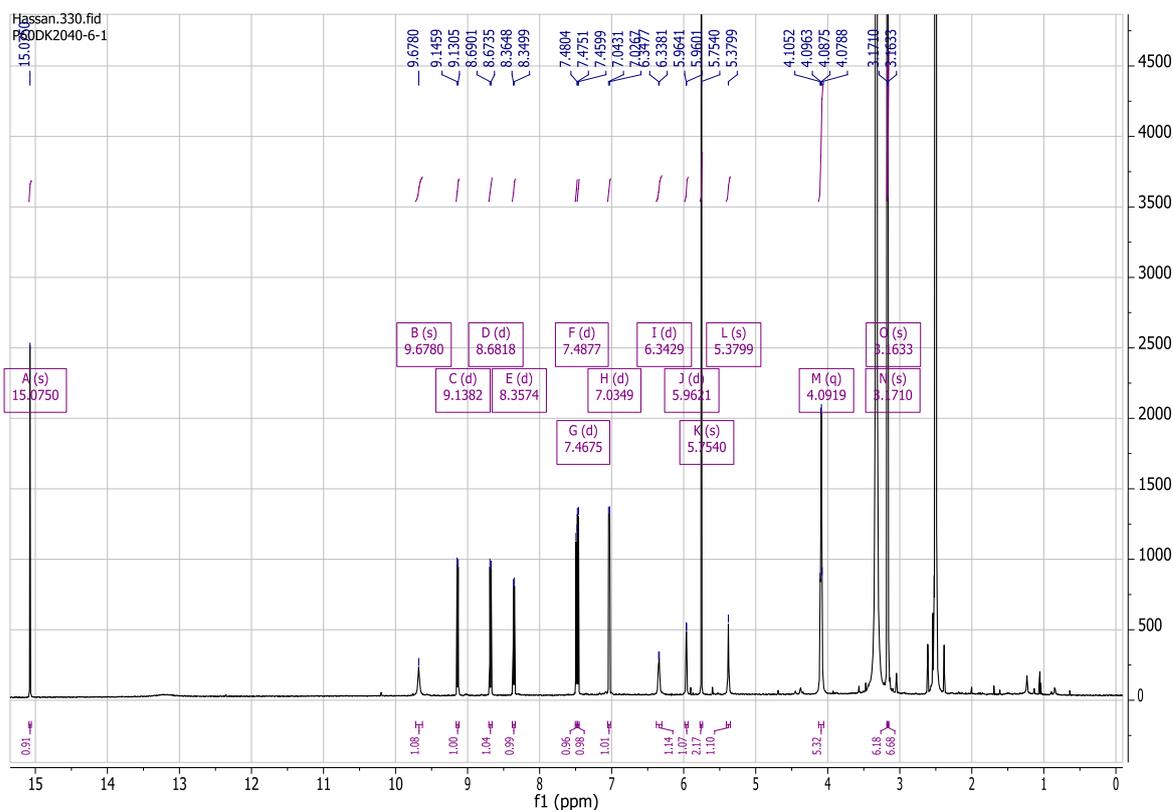


Anhang 29:  $^1\text{H}$  NMR von Stempheperyleneol gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO}-d_6$

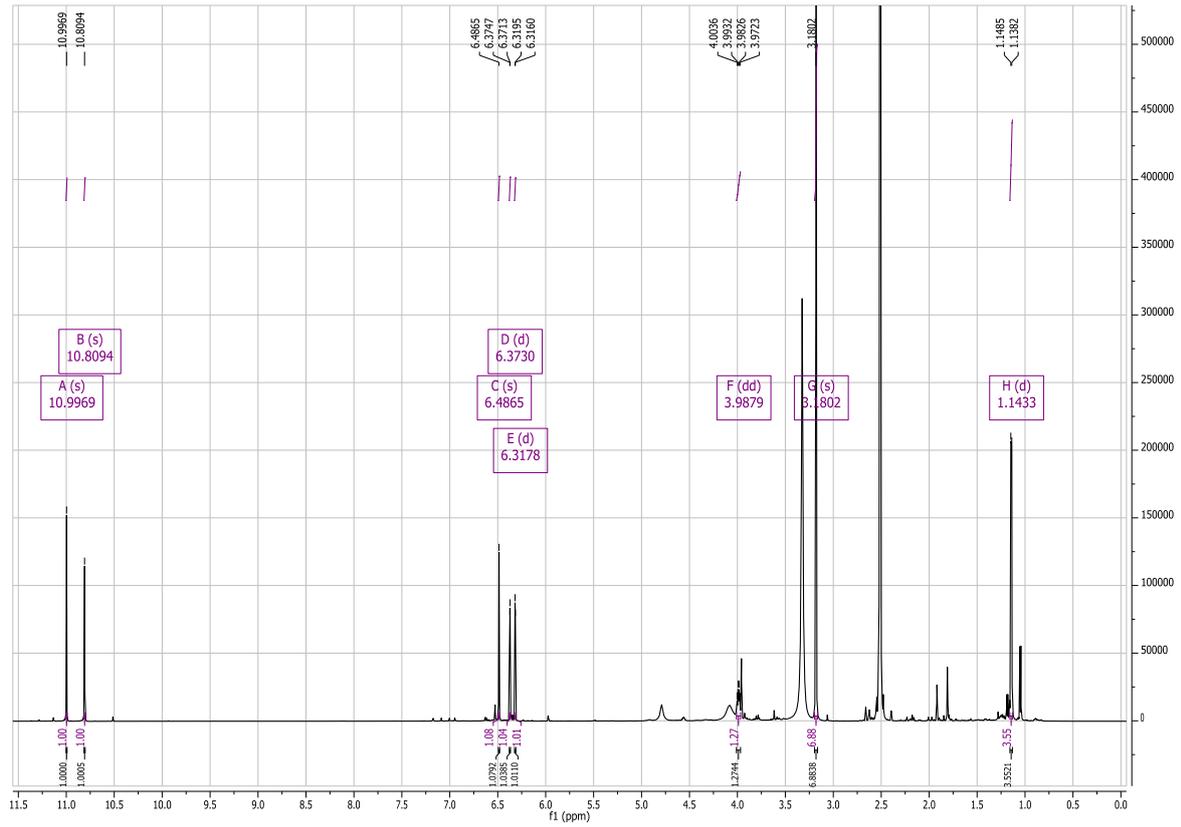


Anhang 30:  $^1\text{H}$  NMR von Alortoxin I gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$

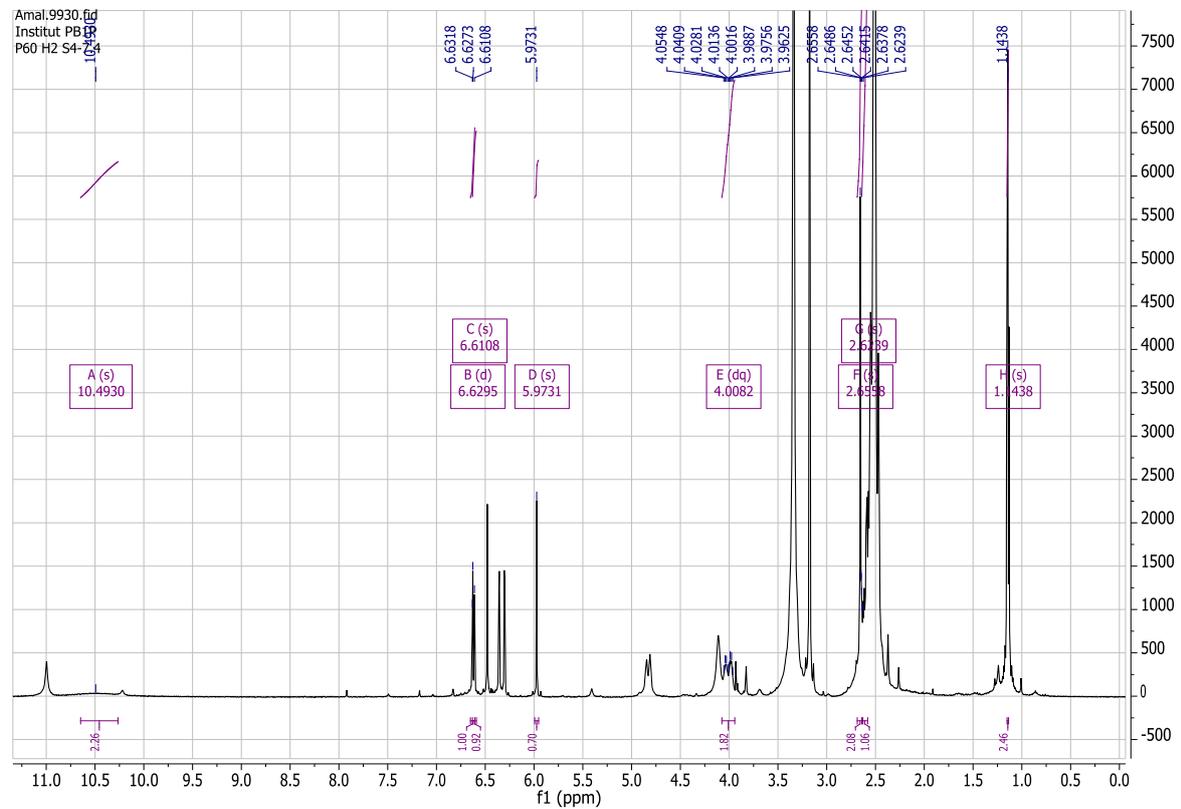


Anhang 31:  $^1\text{H}$  NMR von Stemphytoxin II gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$ Anhang 32:  $^1\text{H}$  NMR von Xanalteric Acid I gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO}-d_6$ 

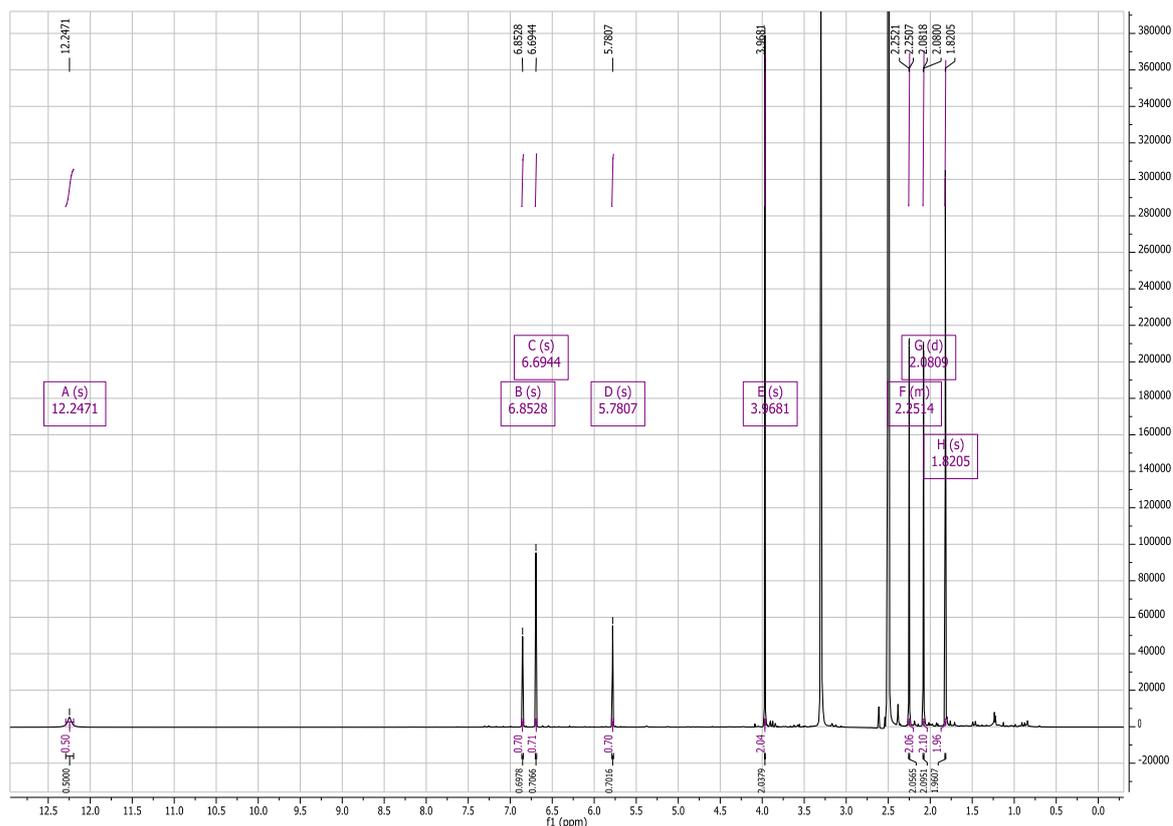
Anhang 33:  $^1\text{H}$  NMR von Orthosporin gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO}-d_6$



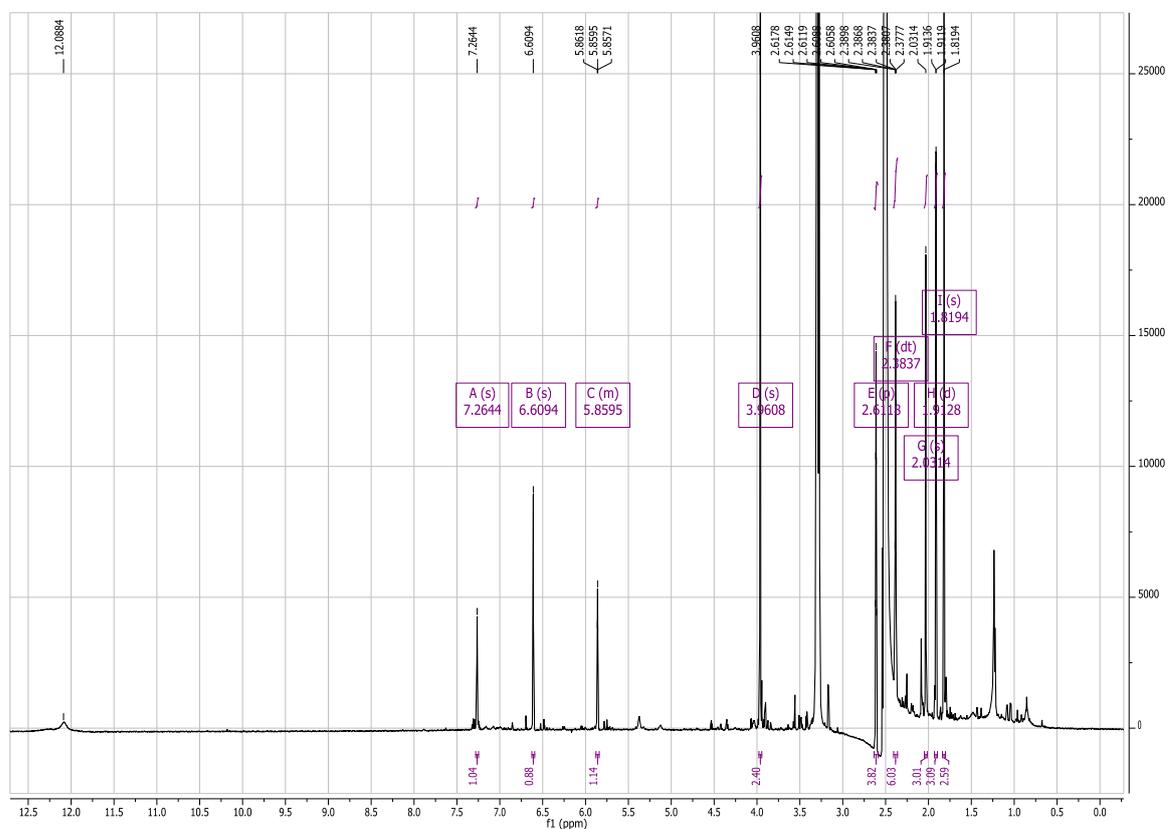
Anhang 34:  $^1\text{H}$  NMR von Aloesol gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$



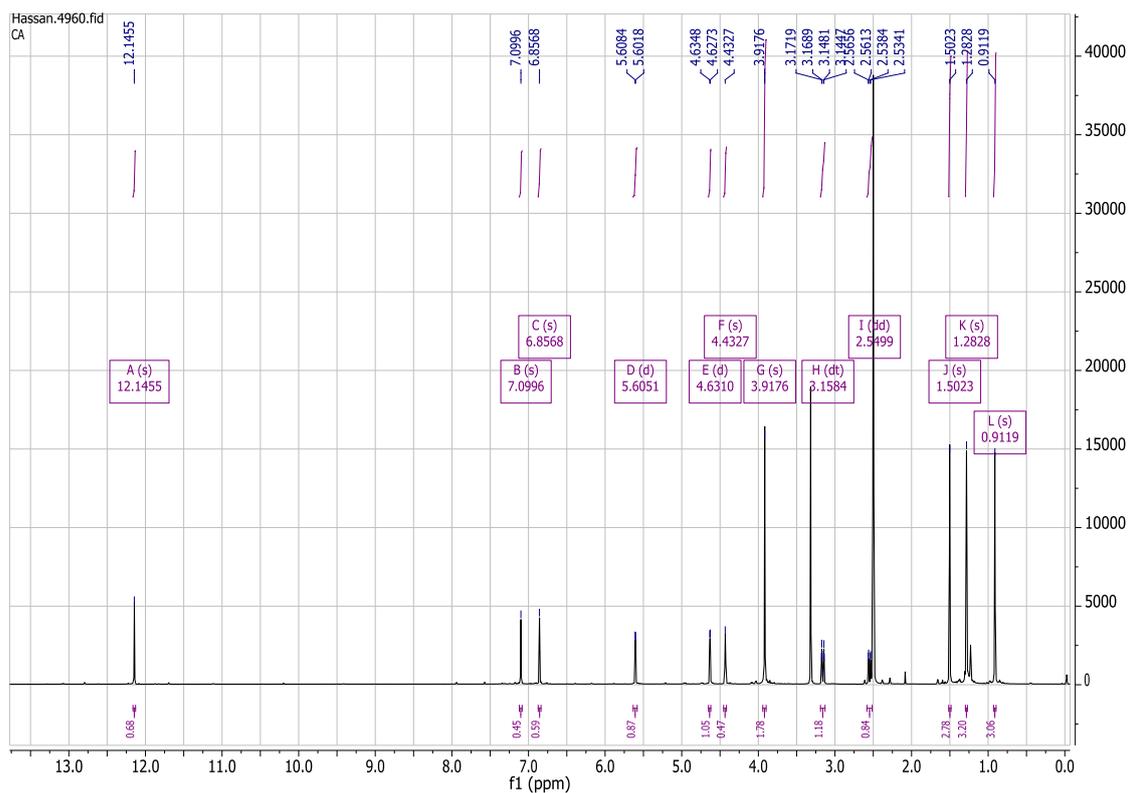
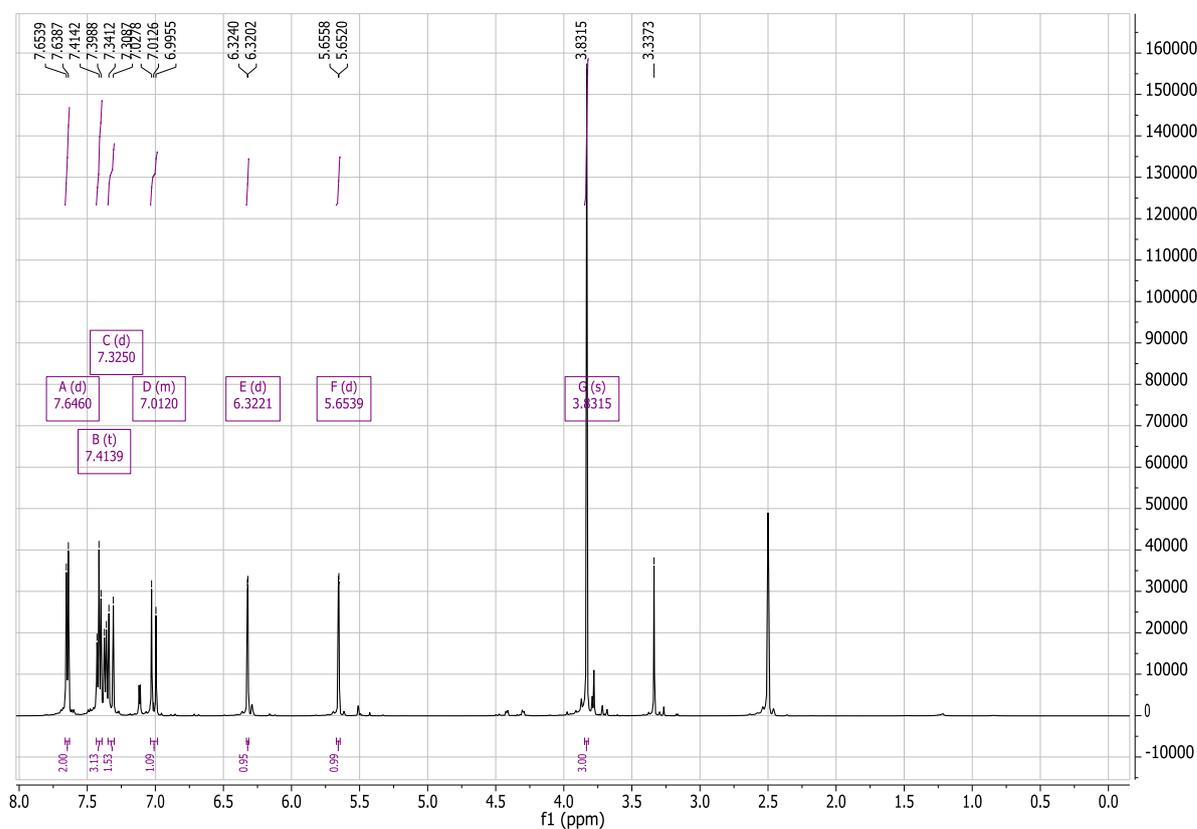
Anhang 35:  $^1\text{H}$  NMR von Infectopyron gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



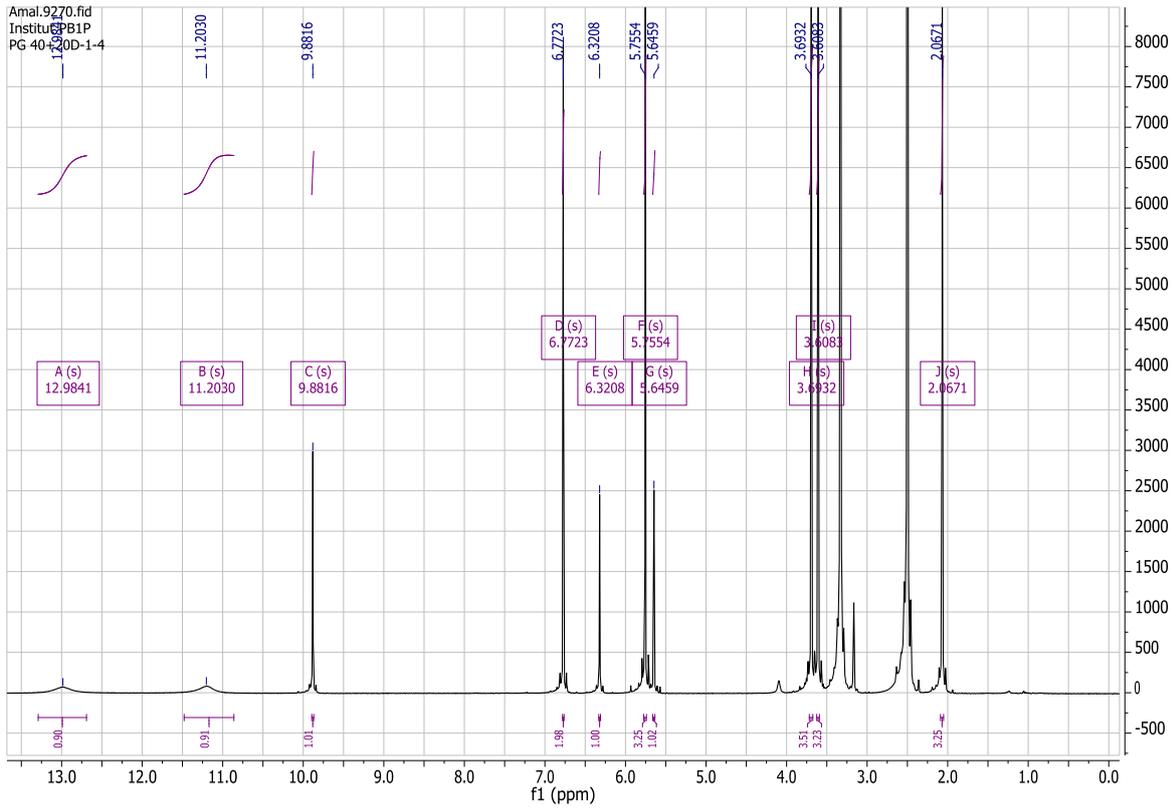
Anhang 36:  $^1\text{H}$  NMR von 4Z-Infectopyron gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



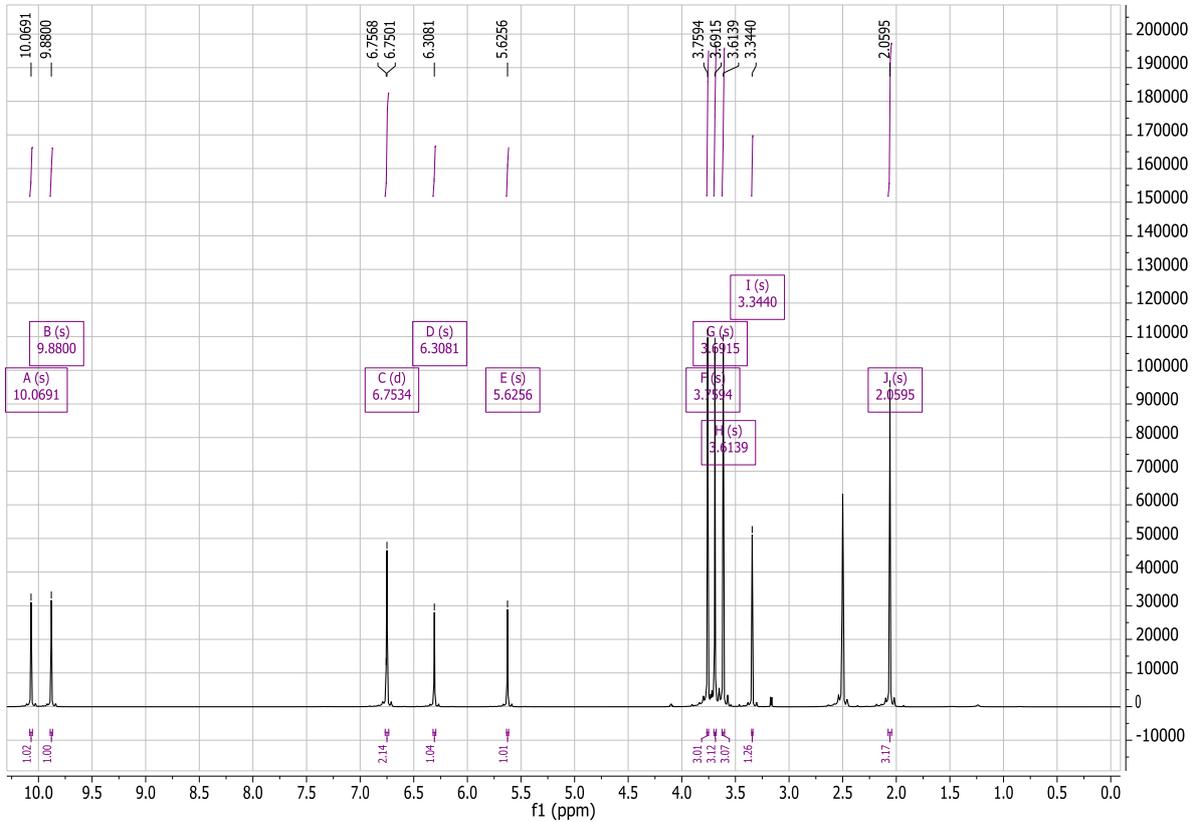


Anhang 39:  $^1\text{H}$  NMR von Altersolanol C Acetonid gemessen bei 600MHz in  $\text{DMSO}-d_6$ Anhang 40:  $^1\text{H}$  NMR von Desmethoxyyangonin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$ 

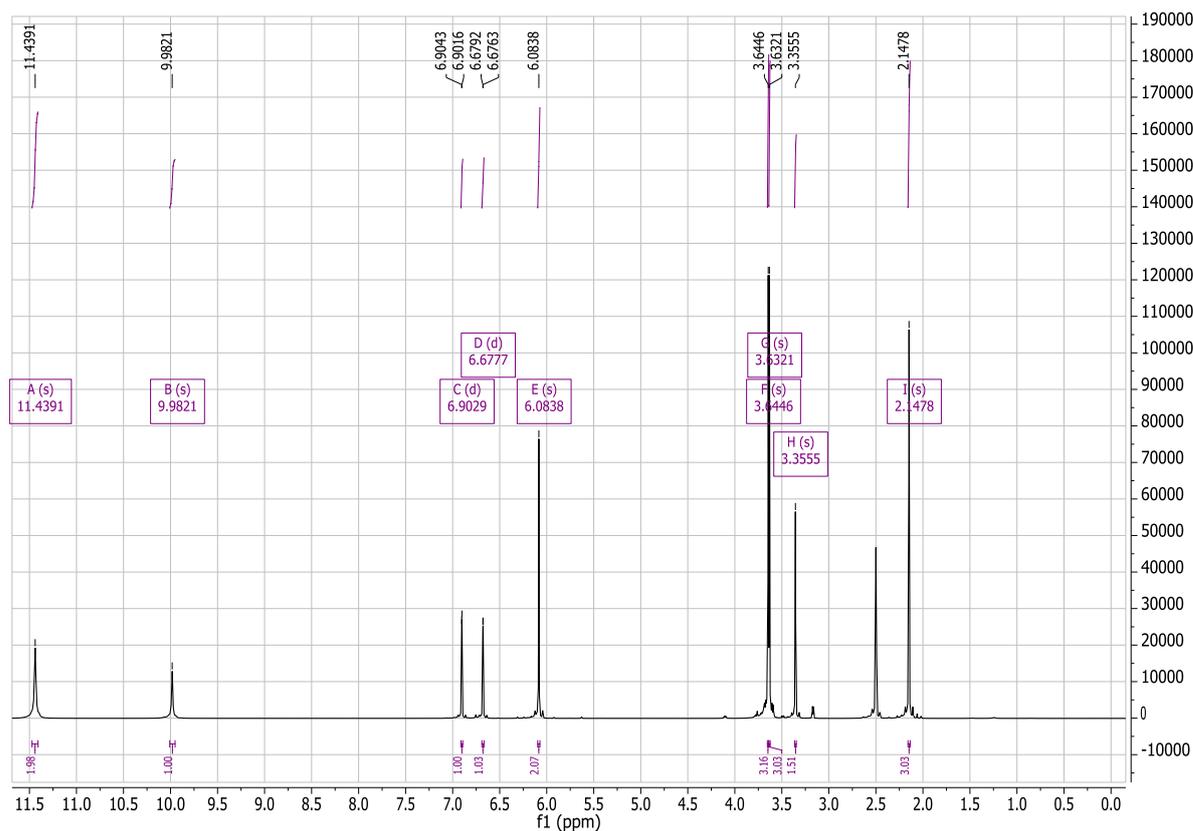
Anhang 41:  $^1\text{H}$  NMR von Asterricacid gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



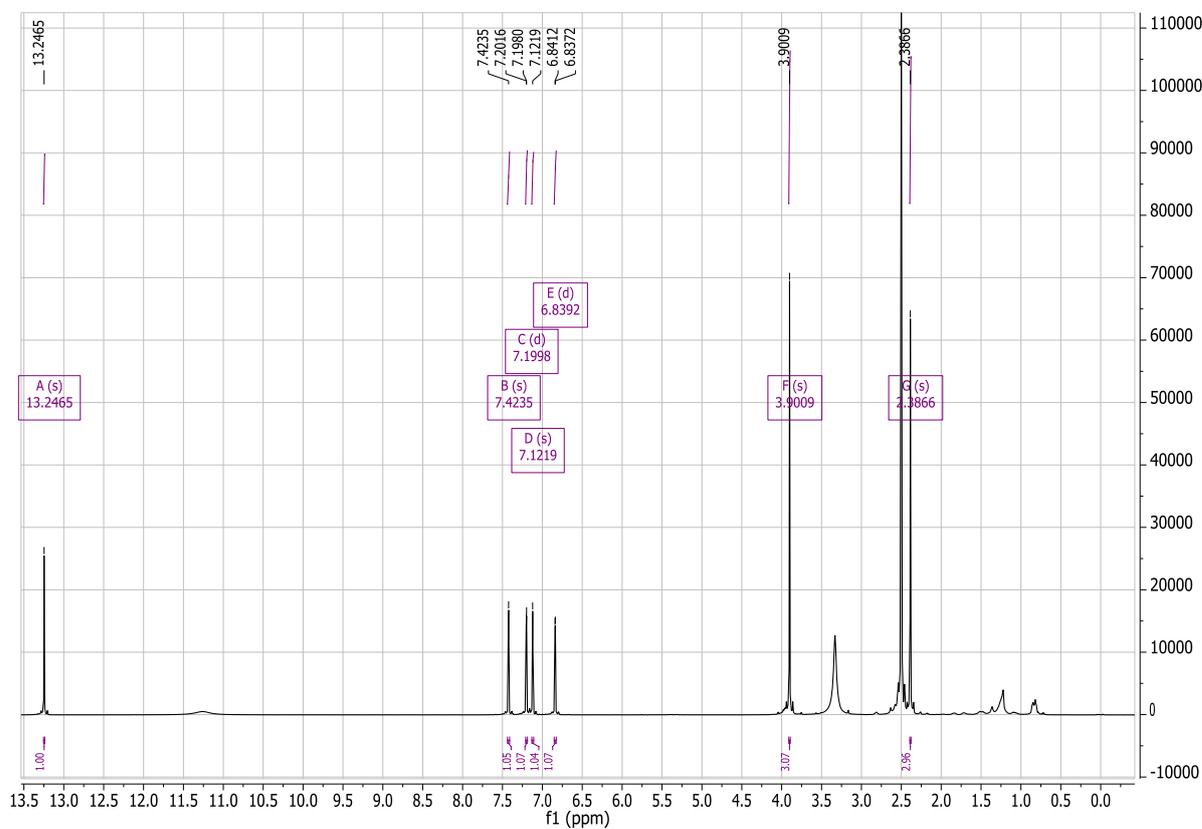
Anhang 42:  $^1\text{H}$  NMR von Methylasterricacid gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



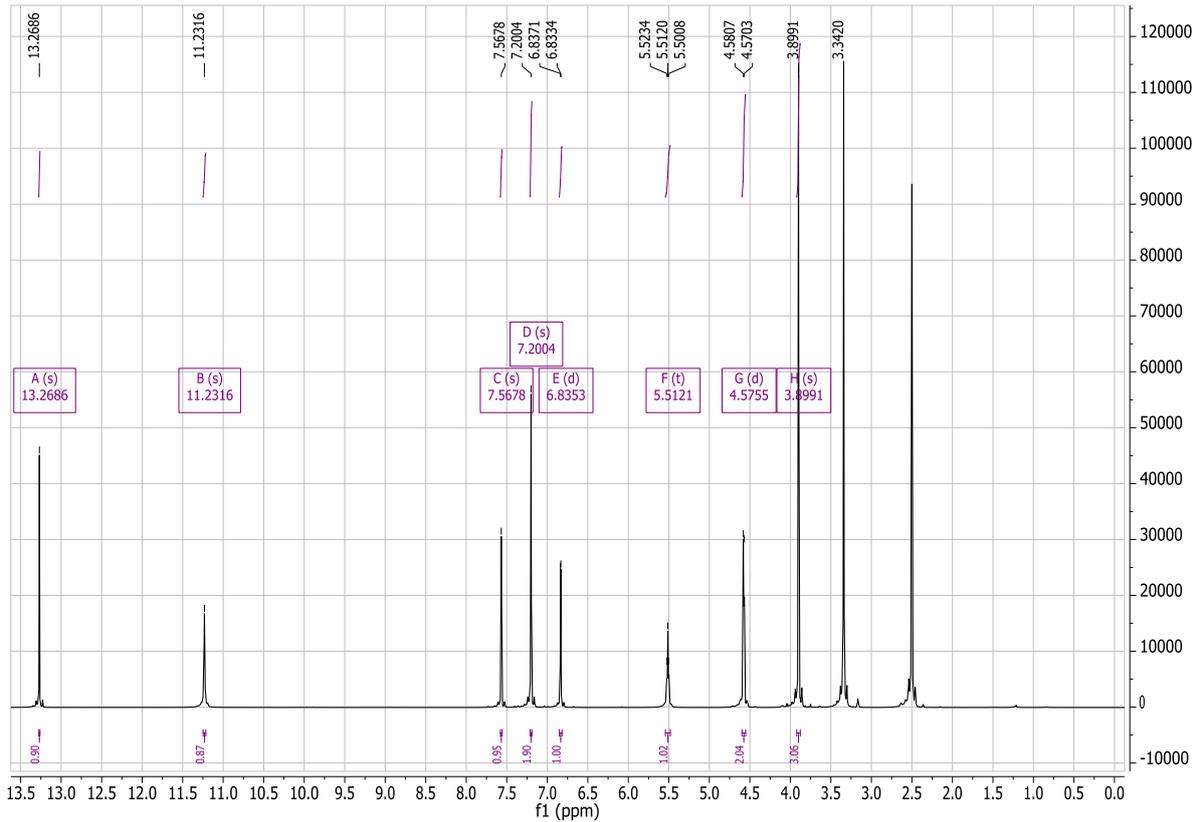
Anhang 43:  $^1\text{H}$  NMR von Sulochrin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$



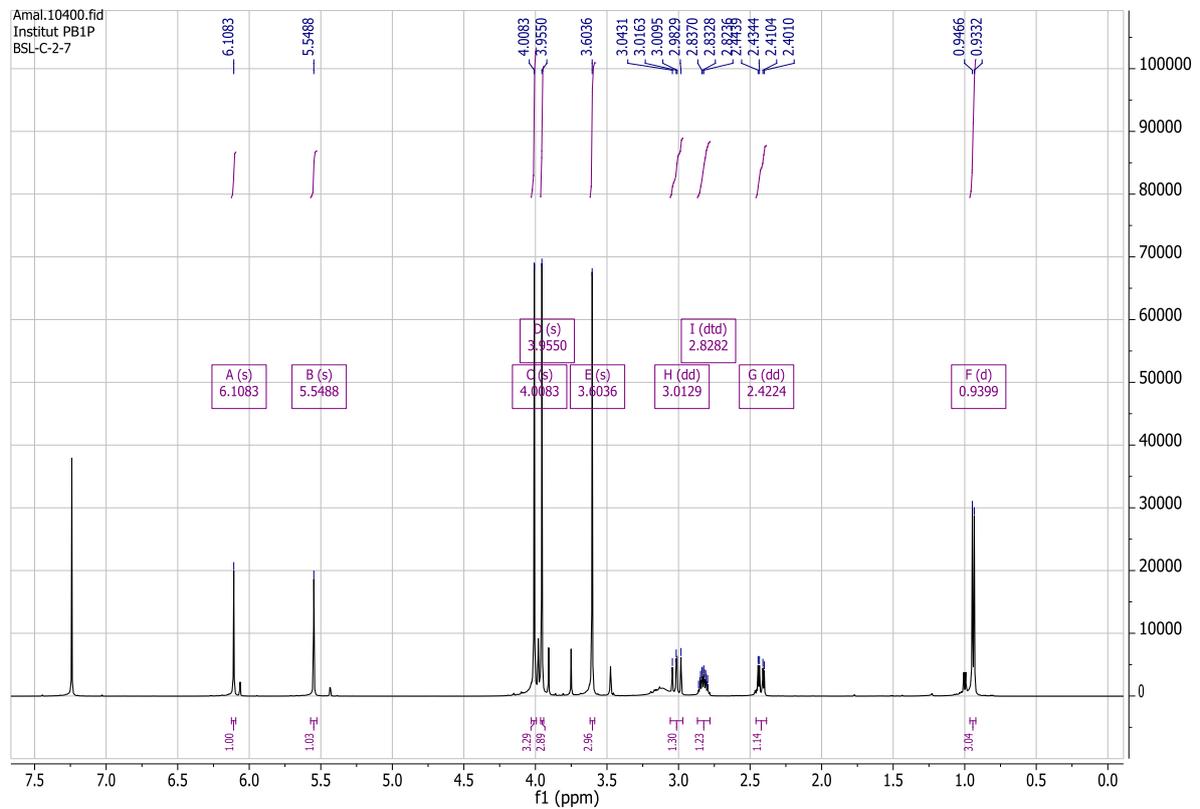
Anhang 44:  $^1\text{H}$  NMR von Questin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

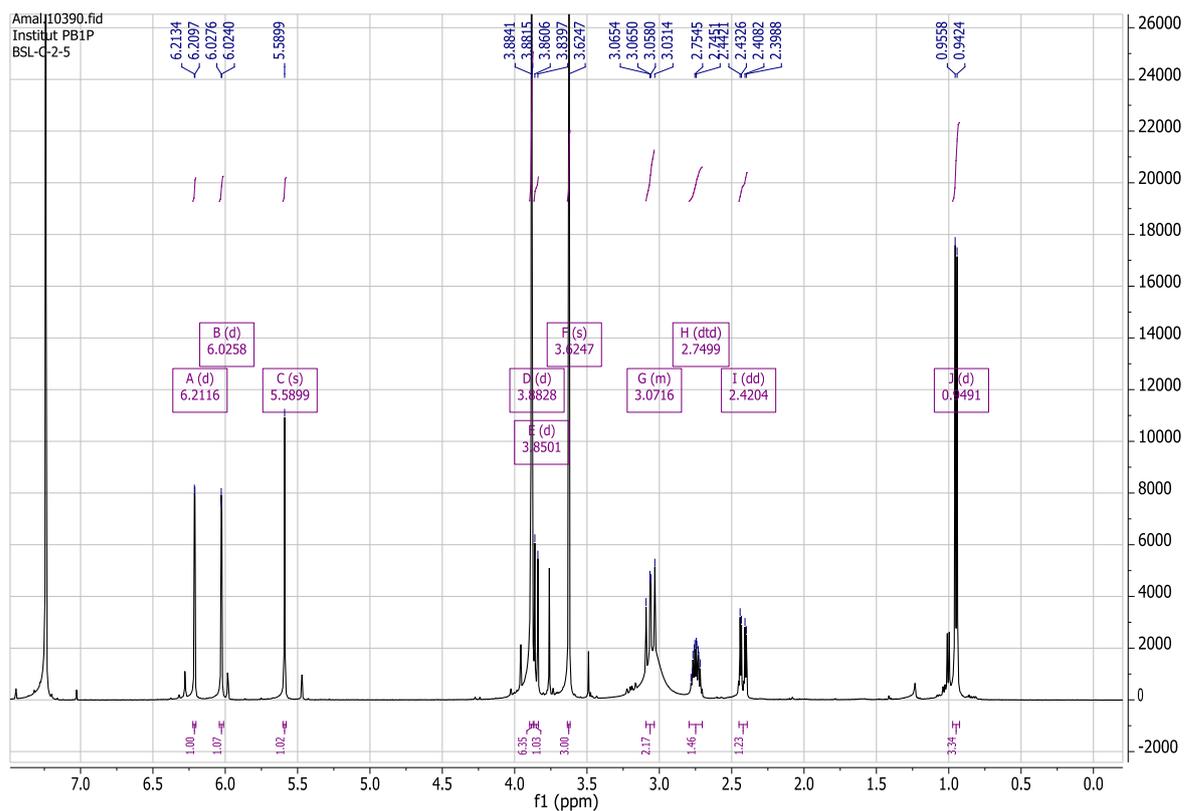
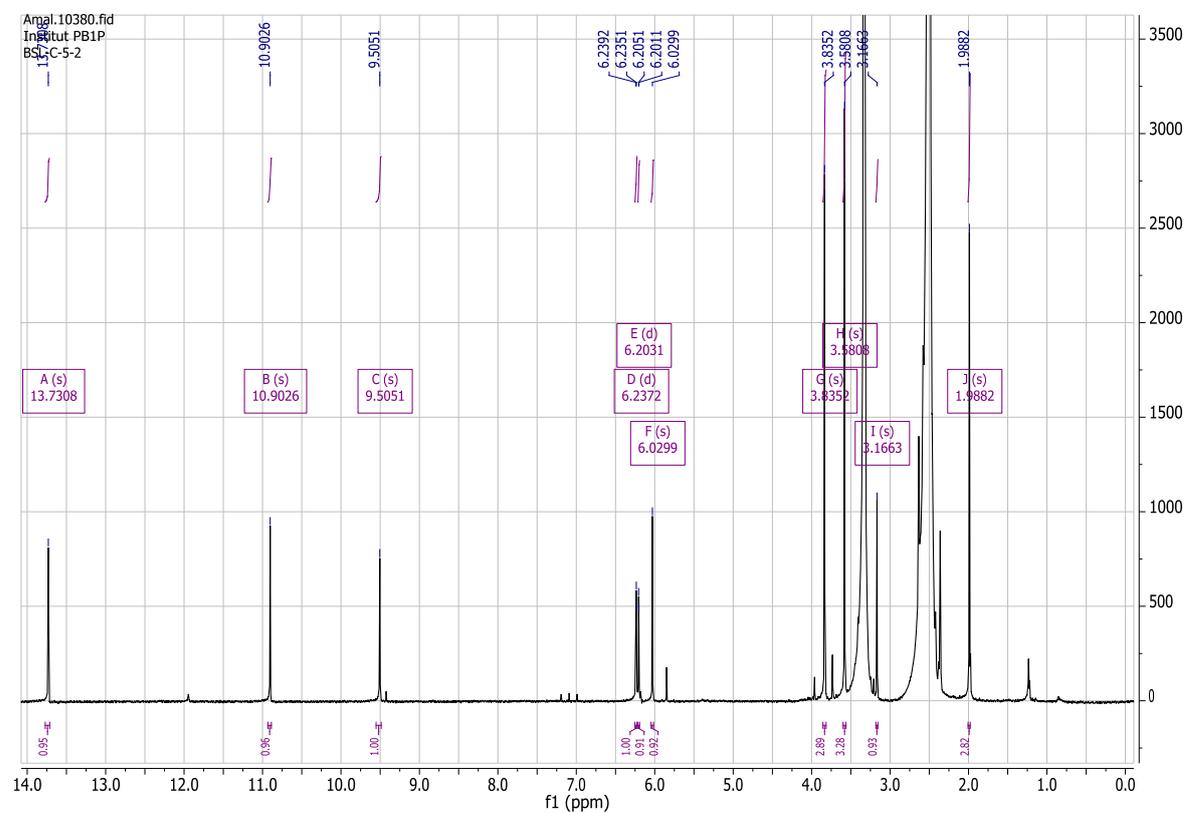


Anhang 45:  $^1\text{H}$  NMR von Questinol gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$

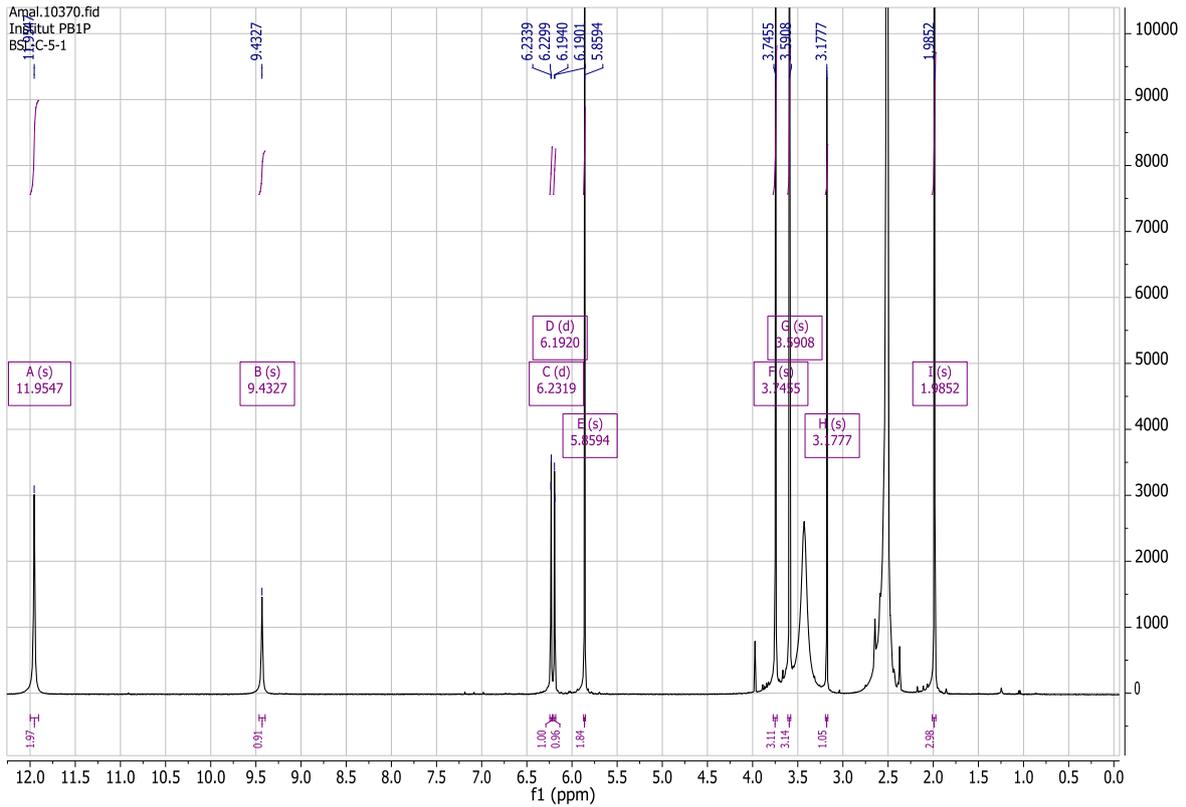


Anhang 46:  $^1\text{H}$  NMR von Griseofulvin gemessen bei 500MHz in  $\text{CDCl}_3$

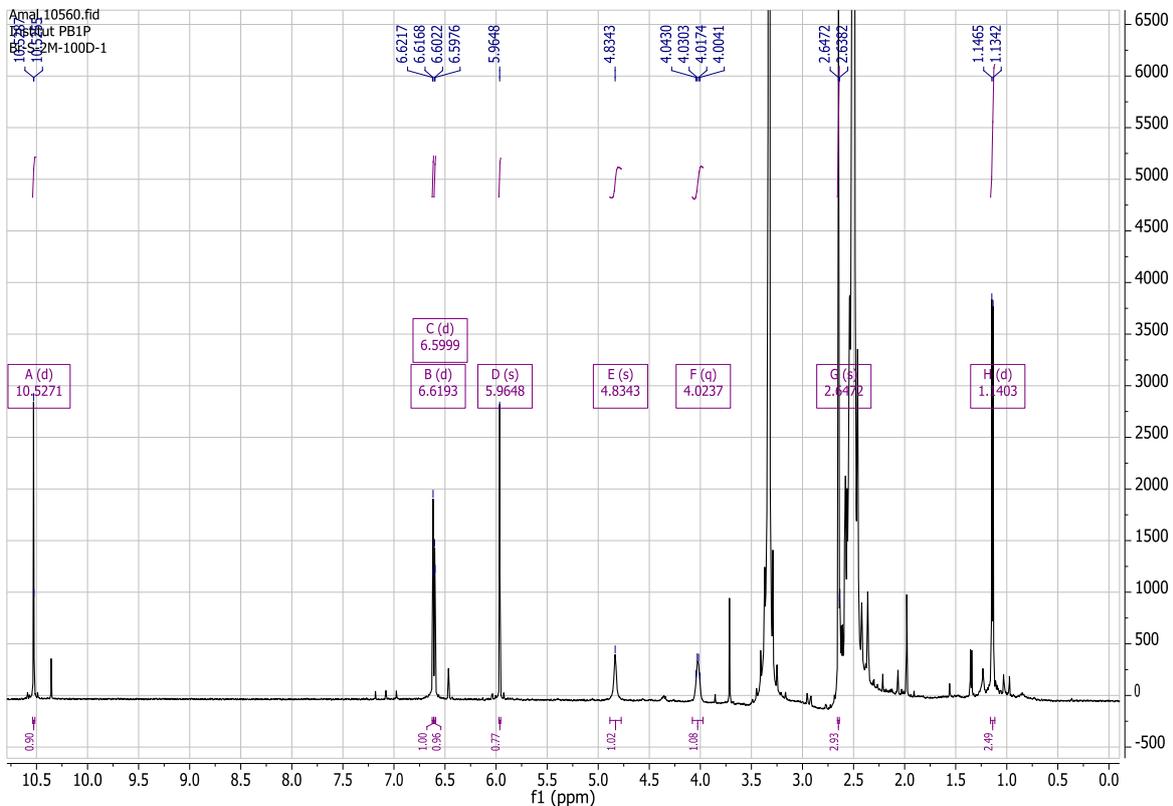


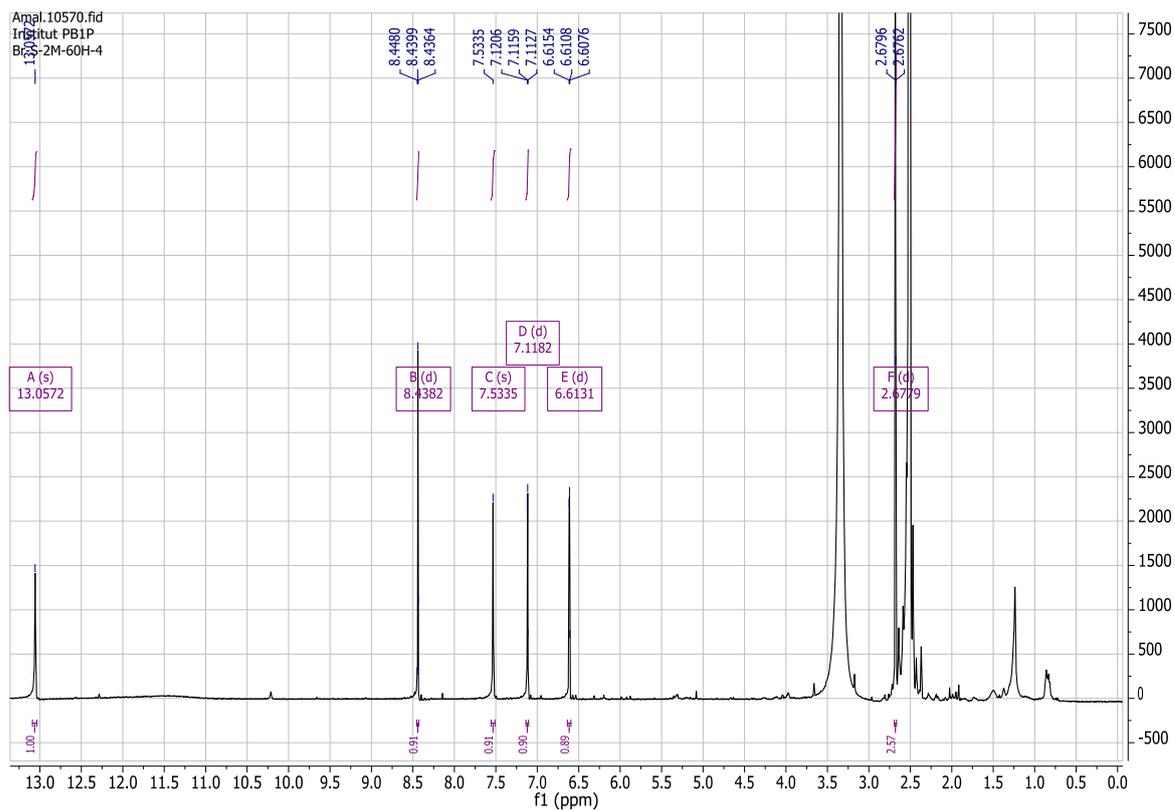
Anhang 47:  $^1\text{H}$  NMR von Dechlorogriseofulvin gemessen bei 500MHz in  $\text{CDCl}_3$ Anhang 48:  $^1\text{H}$  NMR von Griseophenon B gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$ 

Anhang 49:  $^1\text{H}$  NMR von Griseophenon C gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$



Anhang 50:  $^1\text{H}$  NMR von 7-hydroxy-2-[(2S)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-4H-1-benzopyran-4-on gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO}-d_6$



Anhang 51:  $^1\text{H}$  NMR von Acylmacrosporin gemessen bei 500MHz in  $\text{DMSO-}d_6$ 

### 9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Möglichkeit nutzen mich bei all denen zu bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit durchzuführen.

- Herrn Prof. Peter Prokech für die Überlassung des Themas, die stimulierenden Gespräche und Anregungen und die zahlreichen Möglichkeiten durch Aufenthalte im Ausland meinen Erfahrungshorizont zu erweitern und für die Förderung in allen wissenschaftlichen Bereichen.
- Herrn Prof. Matthias Kassack für die Übernahme des Korreferats.
- Frau Dr. Alexandra Hamacher, Laura Engelke und Kathrin Christoph für die Durchführungen der zytotoxischen Assays und die geduldige Beantwortung aller Frage zum MTT Assay.
- Der Arbeitsgruppe von Prof. Werner E.G. Müller für die Durchführung der zytotoxischen Assays mit L5178Y.
- Heike Goldbach-Gecke für die Durchführung der antibakteriellen Testungen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Heike Brütz-Oestereich. Thomas Gecke für die exzellente Bewirtung bei gemeinsamen Abendessen.
- SeaLife Pharma für die Durchführung der antibiotischen Testungen.
- Dr. Marc Diederich und Dr. Barbara Orlikova für die Durchführung der NF $\kappa$ B Assays.
- Prof. Ahmed Chadli für die Durchführung des HSP90 Rekonstitutionsassays.
- Dr. David Rönberg, Dr. Bartosz Lipowicz und Dr. Mirko Bayer für die schöne Zeit im PBIII Praktikum und das gemeinsame Probekochen von Analysen.
- Prof. Claus Passreiter für die Beratung zu allen studentischen Angelegenheiten und die fachliche Beratung.
- Die „Guten Seelen“ des Instituts: Waltraud Schlag, Simona Miljanovic, Katja Friedrich, Eva Müller und Dieter Jansen für das stets offene Ohr in allen Angelegenheiten, die Hilfe bei allen Laborangelegenheiten, die gemeinsamen Mittagessen und schöne gemeinsame Zeit. Danke!
- Claudia Eckelskemper für die gute Organisation aller administrativen Angelegenheiten und Erinnern an alle Anträge, die man vergessen hat auszufüllen.
- Allen ehemaligen Kollegen und Gästen, Mustapha ElAmrani, Dr. Robert Bara, Dr. Wesam Ebrahim, Dr. Daniela Ackermann, Dr. Abdessamad Debbab, Dr. Yaming Zhou, Dr. Serif Ebbada, Dr. Festus Okoja, Gideon Agdala, Matthias Agbo, Arta Kuci, Dr. Fatima Kabbaj, Dr. Cong-Dat Pham und Nihal Aktas für die schöne Zeit im Labor.
- Den jetzigen Kollegen Antonius Ola, Rini Muharini, Rudi Yansyah, Huiqin Chen, Yang Liu, Catalina Perez Hemphill, Amin Mokhlesi, Dr. Fang Lu, Sergi Herve Akone, Sathishkumar Arumugam, Georgios Dalotos, Marian Frank, Shuai, Liu, Dr. Yangbo Zeng und Mousa Al Tarabeen für die schöne gemeinsame Zeit.
- Meinen beiden WPP Gruppen Nikolai Ulbricht, Elisabeth Böser, Katharina Smolka und Sevin Jued Mahko.
- Dhana Thomy, Catherine Schumacher, Izzan Malik, Clemens Lux, Katharina Arenz, Dr. Peter Sass und Dr. Anne Berscheid, nicht nur für die schöne Atmosphäre zwischen den Arbeitsgruppen, sondern auch für die vielen gemeinsamen Abende!
- Hendrik Niemann, Ingo Kolb, Mi-Young Chung und Imke Form für die nette Laborgemeinschaft und gemeinsame Freizeit!
- Lena Hammerschmidt, für die schöne Zeit im Labor, die schöne gemeinsame Freizeit, die vielen nicht nur wissenschaftlichen Diskussionen und die einmalige Reise nach China! Insbesondere die nächtliche Wanderung durch Peking und die „Beer Street“!
- Allen die mir an dieser Stelle leider entfallen sind.

- Meinen Eltern Gabriele und Rolf Marmann, meinen Großeltern Ingeborg und Helmut Göritz für die Unterstützung und alles was sie für mich getan haben. Ohne sie wäre ich nicht so weit in meinem Leben gekommen.
- Meinen verstorbenen Großeltern Ingeborg und Paul Marmann, die mich in meiner Kindheit und Jugend geprägt haben.
- Kirsten Famulla, die mir seit dem Abitur immer Kraft und Unterstützung in allen Lebenslagen gegeben hat.

### 10. Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

---

Name: Marmann, Andreas  
Adresse: Richard-Wagner-Str. 54, 40724 Hilden  
Geburtsdatum: 12.12.1984 in Haan  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Telefon: +49 176 32622754  
E-mail: A.Marmann@gmx.de

#### Studium:

---

Seit 08/2010 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
21.7.2010 3. Staatsexamen Pharmazie und Approbation zum Apotheker  
04/2005-05/2009 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abschluss: 2. Staatsexam Pharmazie

#### Berufserfahrung:

---

12.5.2012 – 15.5.2012 Akkreditierung des Studiengangs „Biotechnology“ an der GUC, ACQUIN  
15.10.2011 – 23.10.2011 Forschungsaufenthalt an der University Mohammed V Agdal, Rabat, Marokko  
1.9.2011 – 2.10.2011 Forschungsaufenthalt am State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, China  
1.12.2009 – 30.5.2010 Pharmaziepraktikant am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
1.6.2009 – 31.11.2009 Pharmaziepraktikant, Fortuna Apotheke, Düsseldorf

#### Berufliches Engagement:

---

Seit 08/2010 Betreuung und Organisation des Blockpraktikums „Pharmazeutische Biologie III“ für Pharmaziestudenten  
Seit 08/2010 Betreuung des Praktikums „Arzneipflanzensexkursion und Bestimmungsübungen“ für Pharmaziestudenten  
Seit 08/2010 Betreuung und Organisation des Blockpraktikums „Toxikologie pflanzlicher Arzneistoffe“ für Toxikologiestudenten

Seit 01/2014 Vorlesung „Grundzüge der Biotechnologie und Molekularbiologie für Pharmazeuten“

---

**Schulische Ausbildung:**

08/2002-06/2004 Dietrich-Bonhoeffer Gymnasium, Hildesheim  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

08/1995-06/2002 Hermann von Helmholtz Gymnasium, Hildesheim  
Abschluss: Fachoberschulreife

**Weitere Kenntnisse:**

---

**Fortbildungen:** Fortbildung zur Vermittlung der Sachkunde nach §13 Abs. 2 S. 1 Nr. 3, Abs. 4 Gentechnik-Sicherheitsverordnung bei Advo Gen Consult Bender & Knack GbR

Teilnahme am Workshop der HHU „Von der Idee zum Projekt – Finanzierung von Forschungsprojekten durch Drittmittel“

Teilnahme am Workshop der “Interdisciplinary Graduate and Research Academy Duesseldorf” (iGRAD): “Introduction to good scientific practices”

**Sprachkenntnisse:** Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (fließend)  
Latein (großes Latinum)

**EDV-Kenntnisse:** MS-Office, Chromeleon, MestreNova, Xcalibur, BioEdit, AntiMarin, AmitBase, MariaLit, DNP, ChemBioOffice

**Publikationen:**

---

**Paper:**

1. Sheridan H, Krenn L, Jiang R, Sutherland L, Ignatova S, Marmann A, Liang X, Sendker J. (2012) The potential of metabolic fingerprinting as a tool for the modernisation of TCM preparations. *J Ethnopharmacol.*;140(3):482-91.
2. Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Prokisch P (2014) Co-Cultivation – A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. *Mar Drugs*; in print

**Poster:**

David Roesberg, Andreas Marmann, Abdessamad Debbab, Atila 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, Sebastian Wesselborg, Tibor Kurtán, Amal H. Aly, Peter Prokisch.

„Antitumor and Immunostimulating Tetrahydroxanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phaeoacremon longicollis*“, 26. Irsee Naturstofftage, Irsee, Deutschland

Vorträge:

- 16.2.2014 16. Irsee Naturstofftag, Irsee, Deutschland: Posterpräsentation „Antitumor and Immunostimulating Tetrahydroxanthone dimers from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis longicaulis*“
- 20.10.2011 2ème Colloque International sur Chimie, Environnement et développement Durable Rabat, Marokko: Bioactive secondary metabolites of *Rhizoctonia* sp.
- 18.09.2011 5<sup>th</sup> Asian-Link Workshop on Natural Product Chemistry & Annual Meeting of NSFC Major International Joint Project, Qingdao, China: Bioactive secondary metabolites of *Rhizoctonia* sp.